

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR *Penicillium sclerotiorum*.

Rafael Vicente de Paiva, Eleonora Cano Carmona, Leonor Alves de Oliveira e Juliana Ueda Navarro Yaochite – Bioquímica - Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica e Microbiologia – Campus de Rio Claro.

As enzimas têm elevado poder catalítico, sendo muitas vezes superiores aos catalisadores inorgânicos, além de alta especificidade por seus substratos. São proteínas e estão presentes em todas as células vivas, exercendo funções vitais de controle de processos de transformações de nutrientes em energia e em material celular, e também participam dos processos de quebra de nutrientes complexos em substâncias simples (KIRK et al, 2002).

Os microrganismos representam excelente fonte de enzimas devido à sua diversidade bioquímica; crescimento rápido, com requerimento limitado de espaço, o que diminui o custo de produção em relação às enzimas de origem animal ou vegetal; produção independente de variações sazonais e localização geográfica; utilização de substratos baratos, como resíduos agrícolas e agroindustriais; possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo; e pela facilidade de manipulação genética das linhagens (RAO et al, 1998).

A grande maioria das enzimas aplicadas industrialmente, aproximadamente 90%, é de origem microbiana, sendo estimado que os fungos filamentosos constituem fonte de cerca de 40% do total de enzimas comercializadas (SAID & PIETRO, 2004).

Entre estes fungos pode ser citado o gênero *Penicillium* que contém espécies com alto potencial econômico, pois estes microrganismos sintetizam e secretam no meio enzimas de grande interesse industrial tais como amilases, celulasas, pectinases, proteases e xilanases.

Uma linhagem do fungo *Penicillium sclerotiorum* isolada da Estação Juréia – Itatins, SP despertou interesse para o estudo da produção das hidrolases acima citadas.

O componente primordial da hemicelulose é o xilano, que corresponde a até 30% da parede celular de madeiras duras e plantas anuais como milho, rami e cana-de-açúcar, sendo que, depois da celulose, representa o polissacarídeo renovável, mais abundante da natureza. Dessa maneira, quantidades consideráveis de xilano estão presentes em resíduos agrícolas e agro-industriais sólidos, bem como em resíduos líquidos, liberados durante o processamento de madeiras, muitas vezes lançados em mananciais, com grande prejuízo para o ecossistema. Devido à heterogeneidade estrutural dos xilanos, sua hidrólise requer a ação de complexos sistemas de enzimas. Dentre estes sistemas estão as xilanases que agem sobre o xilano, reduzindo este a D-xilose. As xilanases apresentam muitas aplicações quando estão associadas às celulasas ou quando estão agindo sozinhas. Associadas às celulasas, apresentam alta aplicabilidade nas indústrias alimentícias, podendo ser empregadas na melhoria da extração a frio de óleo de sementes, produção de sucos de frutas, melhoramento da reidratação de vegetais secos e fabricação de café solúvel, chá e vinho (FERREIRA FILHO, 2004).

Na indústria de papel, as enzimas xilanolíticas são usadas para a obtenção de polpa de celulose e seu branqueamento, no pré-branqueamento de polpas “kraft”, facilitando a remoção de lignina, e ainda reduzindo o grau de polimerização do xilano residual, com conseqüente redução da demanda de cloro requerido durante o processo, bem como diminuição da liberação de organo-clorados no efluente. Ainda, são usadas no processamento de fibras de plantas como o linho, cânhamo e juta em indústrias têxteis (FERREIRA FILHO, 2004).

As celulasas ou enzimas celulolíticas compõem um complexo enzimático capaz de degradar celulose, o polissacarídeo mais abundante da Terra e o principal constituinte da parede celular das plantas. É um polímero linear de unidades de glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas- β -1,4. O grau de polimerização é da ordem de 10.000 unidades por molécula. Em estado natural, essas moléculas estão associadas em estrutura complexa, e ao mesmo tempo, fibrilar e cristalina. A celulose é insolúvel e, portanto, seu aproveitamento depende da sua degradação em seus monômeros. Para a complexa clivagem da celulose cristalina em glicose, três tipos de enzimas agem sinergisticamente: endo- β -1,4-glucanase que cliva, ao acaso, ligações na cadeia e são usualmente determinadas usando derivados de celulose solúveis

como carboximetilcelulose (CMC); a α -D-glucanase, que retira resíduos de celobiose ou de glicose (menos frequentemente) das extremidades da cadeia de celulose, e a β -glucosidase, que quebra celobiose para produzir glicose (DILLON, 2004).

O principal emprego das celulasas tem sido para facilitar a extração de sucos ou substâncias úteis de tecidos vegetais, onde as celulasas são suplementos ou alternativa para as pectinases. As celulasas são usadas em detergentes para lavagem de roupas, com o objetivo de quebrar as microfibrilas que se separam parcialmente das fibras principais dos tecidos de fibras naturais, e que, como consequência, dão o aspecto desbotado por refletir menos intensamente a luz incidente. Essas microfibrilas são indesejáveis, pois podem reter sujeiras. Por outro lado, na indústria têxtil são usadas no acabamento de jeans com o objetivo de dar o aspecto de superfície gasta. Ainda, as celulasas estão contidas em preparações farmacêuticas como o objetivo de auxiliar a digestão, e em ração animal (DILLON, 2004).

As pectinases, enzimas pécticas ou pectinolíticas compõem o complexo de enzimas que degradam as substâncias pécticas, que são heteropolissacarídeos de peso molecular de 30.000 a 300.000 kDa e que consistem de uma cadeia principal de ácido D-galacturônico, parcialmente esterificado com metanol. As substâncias pécticas estão presentes na lamela média e parede primária das células de vegetais superiores. As pectinases aplicadas industrialmente são produzidas por fungos, leveduras e bactérias. Comercialmente, as pectinases são utilizadas para desintegrar tecidos vegetais, particularmente em processos que manufaturam frutas e legumes nas indústrias de alimentos, aumentando a produção de sucos, reduzindo a viscosidade nos concentrados por modificar e solubilizar as estruturas pécticas. Contudo, é na indústria de sucos que as pectinases encontram seu maior mercado, atuando em várias fases do processo como na recuperação de óleos essenciais, na estabilização da turbidez e na concentração do suco (COELHO, 1995).

As amilases ou enzimas amilolíticas são aquelas que degradam o amido. São obtidas de malte ou produzidas por bactérias e fungos em processos fermentativos. Portanto, sua origem pode ser vegetal ou microbiana. O amido, o substrato das amilases, é constituído de dois polissacarídeos homogêneos de alto peso molecular: a amilose e a amilopectina, que diferem, principalmente, nas suas estruturas básicas. A amilose é constituída de uma cadeia linear composta de resíduos de D-glicose com ligações- α -1,4; enquanto que amilopectina é uma molécula ramificada com ligações- α -1,4 na cadeia principal e ligações- α -1,6 que ligam as cadeias laterais, constituindo as ramificações da molécula. As amilases atuam sobre o amido de maneira endo, resultando em produtos com configuração α no átomo de carbono anomérico. A ação das amilases sobre uma solução de amido provoca rápido decréscimo da viscosidade dessa solução. As amilases são usadas principalmente na indústria do amido obtido do milho, trigo e batata. Esta constitui, sem dúvida, uma das maiores áreas de utilização de enzimas, e isso se deve ao fato de que os xaropes de hidrolisados de amido são usados em inúmeros produtos alimentícios tais como refrigerantes, produtos de confeitaria, panificação, carnes, sorvetes, frutos enlatados, alimentos para bebês entre outros (MORAES, 2004).

As proteases não podem ser facilmente enquadradas no sistema de nomenclatura atual, que contém a maioria das enzimas. Elas são importantes tanto pelo aspecto fisiológico quanto pelos biotecnológicos. Enzimas proteolíticas como a papaína (EC 3.4.4.10) e a quimiotripsina (EC 3.4.4.5) são conhecidas e usadas há muitos anos. Classificá-las e nomeá-las, de maneira sistemática, como as outras enzimas, é no entanto, difícil, porque todas catalisam essencialmente a mesma reação: a hidrólise de ligações peptídicas. Entretanto, as proteases podem ser do tipo que quebram as proteínas no interior da cadeia de aminoácidos, em fragmentos grandes, ou do tipo que quebra polipeptídeos em aminoácidos individuais (FELIX et al, 2004).

As proteases e as amilases constituem as enzimas produzidas e comercializadas em maior escala, à razão de mais de 500 ton/ano cada tipo. As proteases que podem ser obtidas de tecidos animais, vegetais, ou de microrganismos, podendo ser classificadas pelo seu pH ótimo e pela natureza química de seu sítio ativo. Distinguem-se, dessa forma, quatro grupos: proteases serina (alcalinas), proteases tiol ou sulfidrílica (neutras), proteases carboxílicas (ácidas) e metaloproteases (neutras). Dentre os principais usos de proteases, está a indústria de detergentes, para remover resíduos protéicos de sangue, ovo e suor humano,

que aderem firmemente às fibras do tecido, agindo como uma cola que impede que os sistemas de lavagem comum eliminem as manchas por eles causadas. Essas proteases, geralmente procedentes de *Bacillus sp*, são especialmente tolerantes a altos pHs, e razoavelmente estáveis às temperaturas de lavagens. Os detergentes para máquinas de lavar louça usavam, até há pouco tempo, cloro como alvejante; atualmente, o uso de enzimas foi introduzido para substituir o cloro e outros componentes que são prejudiciais ao meio ambiente. As proteases são também usadas na indústria do couro, durante a purga, isto é, o processo pelo qual o couro é submetido para torná-lo macio; no reaproveitamento de sobras de carnes e ossos e na indústria do peixe onde estas enzimas são usadas na produção de concentrado de proteína de peixe (farinha de peixe), reduzindo os custos de energia com a evaporação da água de prensagem, além de serem amplamente utilizadas em medicamentos e terapêuticas médicas (FELIX et al, 2004).

Neste trabalho o fungo *Penicillium sclerotiorum* foi cultivado por 7 dias a 28°C em meio sólido de Vogel e utilizado como fonte de esporos. Suspensões de conídios em água destilada estéril, contendo 10⁷ esporos/mL, foram inoculadas em meio líquido de Vogel contendo 1% (m/v) de fonte de carbono, sendo a cultura incubada por 5 dias em condição estacionária. Como fontes de carbono foram utilizadas, farelo de trigo, pectina, gelatina e xilano. O micélio foi separado por filtração a vácuo e o filtrado de cultura foi utilizado como fonte de enzimas extracelulares.

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

A atividade xilanase foi determinada utilizando-se uma solução 1% (m/v) de xilano de vidoeiro como substrato em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0, incubada em banho-maria a 50°C. A reação foi interrompida em intervalos de tempo determinados pela adição do reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS).

A atividade amilase foi determinada do mesmo modo, porém o substrato usado foi amido solúvel e o tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5.

Para a atividade celulolítica foram utilizados como substrato a celulose microcristalina (Avicel) e a carboximetilcelulose (CMC) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, sendo que a reação foi interrompida em tempos determinados pela adição do reagente de ADNS.

Para a medida de atividade poligalacturonase utilizou-se uma solução de 1% de ácido poligalacturônico (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, incubando-se a 50°C. A reação foi interrompida com o reagente de ADNS e a leitura da absorbância foi feita a 540nm.

A atividade protease ácida foi determinada utilizando-se uma solução de hemoglobina a 2% como substrato e tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0, incubados a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 10% m/v (TCA). Depois da centrifugação, foi retirado um volume do sobrenadante e adicionado a este uma solução de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio, sulfato de cobre 1% e tartarato de sódio e potássio 2,7%. Por fim, foi adicionado reagente Folin diluído (1:1) e a leitura foi feita a 770nm. Para as proteases alcalina e neutra foram empregados os mesmos métodos, porém com uso do tampão glicina 0,1M pH 9,5 para a alcalina e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 para a neutra.

Para as atividades descritas acima, a unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de grupos redutores por minuto para as carboidrases, e 1µmol de equivalente a tirosina por mL de amostra, por hora, para as proteases.

Os resultados obtidos para determinação de proteínas extracelulares foram: 0,55 ± 0,01 mg/mL para meio com xilano de aveia, 4,37 ± 0,07 mg/mL , para meio com gelatina, 1,23 ± 0,09 mg/mL para meio com farelo de trigo e 0,52 ± 0,02 para meio com pectina.

No meio com farelo de trigo como fonte de carbono, verificou-se o valor de atividade de 0,17 ± 0,04 U/mL e 0,16 ± 0,03 U/mg para amilase e 3,27 ± 0,55 U/mL e 2,42 ± 0,65 U/mg para xilanase.

No meio com xilano de aveia como fonte de carbono, obteve-se atividade de 15,184 ± 1,763 U/mL e 23,715 ± 3,521 U/mg para xilanase, não tendo sido detectada nenhuma atividade de celulase.

No meio com gelatina não foi detectada atividade para as proteases ácida, neutra e alcalina.

No meio com pectina verificou-se atividade poligalacturonase de $2,93 \pm 0,40$ U/mL e atividade específica de $4,68 \pm 0,23$ U/mg. Portanto, essa linhagem de *Penicillium* se mostrou boa produtora de xilanase, quando cultivada em xilano de aveia como substrato.

Referências Bibliográficas

COELHO, M. A. Z., MEDRONHO, R. A., LEITE, S. G.F. AND COURI, S., **Partial purification of a polygalacturonase produced by solidstate cultures of *Aspergillus niger* 3TSB8**. Revista de Microbiologia (Journal of the Brazilian Society for Microbiology) 1995, 26:318–322.

DILLON, A.J.P. Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 243-270.

FELIX, C.R; NORONHA, E.F; DE MARCO, J.L. Proteases: Características e aplicações industriais. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 327- 347.

FERREIRA FILHO, E.X. Xilanses. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 138 – 148.

FERREIRA FILHO, E.X. Pectinases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 307-325.

KIRK, O., BORCHERT T.V; FUGLSANG.C.C. **Industrial enzyme applications**. Current Opinion in Biotechnology, v.13:345–351, 2002.

MORAES, L.M.P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. P.223- 242.

RAO, M.B; TANKSALE, A.M; GHATGE,M.S; DESHPANDE,V.V. **Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases**. Microbiology and molecular biology reviews, v.62, n ° 3, p. 597–635, Sept. 1998.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos, 2002. p.1-9.