

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR *Aspergillus giganteus*.

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

Aspergillus constitui um gênero de fungo mitospórico que apresenta cerca de 150 espécies conhecidas, sendo a primeira descrição feita por Michelli em 1719. A grande maioria é de saprófitos, porém algumas espécies são parasitas de insetos, plantas e animais, incluindo o homem. Neste gênero, encontramos algumas espécies bastante importantes do ponto de vista econômico, uma vez que são utilizadas na fabricação de diversos alimentos fermentados e como fonte de enzimas, mas há também aquelas não desejáveis devido à produção de toxinas potentes, enquanto outras são importantes como agentes de biodeterioração (KLICH & PITT, 1988).

Aspergillus giganteus é uma espécie caracterizada por muitas estipes longas e colônias de diâmetro ligeiramente menor que as de *Aspergillus clavatus*. Podem ser encontrados no solo de regiões tropicais e em alimentos como cereais, desenvolvendo-se sobre esterco de vários animais, e sua presença no solo está freqüentemente associada a esses substratos (RAPPER & FENNELL, 1965).

As enzimas atualmente comercializadas para uso industrial são de origem celular, mais especificamente produzidas por microrganismos, plantas e animais. No entanto, ainda que poucas espécies de microrganismos sejam produtoras de enzimas industriais, a grande maioria (90%) destas é de origem microbiana (SAID & PIETRO, 2004).

O objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial de produção das seguintes hidrolases: amilases, xilanases, celulasas, poligalacturonases, proteases neutra, alcalina e ácida, pelo fungo *Aspergillus giganteus*. São denominadas amilases ou enzimas amilolíticas aquelas capazes de degradar o amido, e podem ser classificadas como endo-amilases, exo-amilases e enzimas desramificadoras.

O amido é o produto de reserva de muitas plantas importantes como o trigo, arroz, milho, mandioca e batata. Os primeiros procedimentos para a hidrólise do amido empregavam ácidos, entretanto esse procedimento não era econômico, além de ser altamente poluente, com baixo rendimento em glicose, sendo que o produto final continha muitos componentes indesejáveis que tinham que ser removidos por cromatografia. Nas últimas décadas, houve uma mudança da hidrólise ácida para o uso de enzimas que hidrolisam o amido. Atualmente, estas enzimas compreendem 30% da produção mundial de enzimas e com o progresso da biotecnologia estão sendo consideradas para aplicações farmacêuticas. As amilases podem ser encontradas em microrganismos, plantas e animais. Linhagens de *Aspergillus sp* e *Bacillus sp*, especialmente *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis* são as mais utilizadas em aplicações industriais. As amilases são usadas principalmente na indústria do amido obtido do milho, trigo e batata. Estas indústrias constituem uma das áreas principais de utilização de enzimas, e isso se deve ao fato de que os xaropes de hidrolisados de amido são utilizados em muitos produtos alimentícios tais como refrigerantes, produtos de confeitaria, panificação, carnes, sorvetes, frutos enlatados, alimentos para bebês, entre outros. Além da indústria de alimentos, as amilases são também utilizadas na indústria de detergentes, para remoção de resíduos de alimentos que contenham amido; na indústria têxtil, para remoção da goma que reveste os fios da trama após a tecelagem; e na indústria de papel, para o tratamento com adesivos de amido para revestir e impermeabilizar parcialmente o papel. Elas também são utilizadas para clarificação de sucos e cerveja e no pré- tratamento de ração animal para melhorar a digestibilidade (MORAES, 2004).

As xilanases são enzimas capazes de degradar o xilano. O xilano é um componente que, junto com a manana, galactana e arabiana, constituem a porção hemicelulósica da parede celular. As hemiceluloses compreendem 30% a 40% dos carboidratos totais das paredes das células vegetais, além de corresponder a 40% do peso seco da biomassa vegetal. Todos os xilanos de plantas terrestres são heteropolissacarídeos compostos de uma cadeia principal de resíduos de xiloses unidos por ligações β -1,4, contendo diferentes grupos substituintes ou ramificações. A degradação enzimática de xilanos naturais requer a ação de duas enzimas principais, as endo- β -1,4 xilanases e as β -xilosidases. As xilanases são bem difundidas na natureza, estando presentes em bactérias, protozoários, fungos filamentosos, leveduras (menos comumente), caracóis, crustáceos, insetos, algas marinhas e sementes

de plantas terrestres durante a fase de germinação. A ocorrência de múltiplas xilanases tem sido relatada em muitos microrganismos. Preparações comerciais de xilanases tem sido obtidas em escala industrial para diversas aplicações, principalmente de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, por diversos países como Finlândia, Canadá, Dinamarca, Japão e Irlanda. Aplicações comerciais para as xilanases envolvem a hidrólise enzimática do xilano, que está presente nos resíduos agrícolas e agroindustriais, sendo convertido a xilose e outros açúcares que podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos, para a obtenção de proteínas celulares, combustíveis líquidos e outras substâncias químicas. As xilanases são usadas também no processamento de fibras de plantas como linho, cânhamo e juta em indústrias têxteis, bem como para obtenção de polpa de celulose e seu branqueamento na indústria de papel. Quando associadas as celulasas tornam-se capazes de remover paredes celulares vegetais, liberando o seu conteúdo para o meio externo. Isto possibilita a extração de polissacarídeos e proteínas de sementes e folhas, bem como a produção de substâncias aromatizantes e protoplasma de plantas superiores, para o uso em pesquisas genéticas (FERREIRA FILHO, 2004).

O complexo celulolítico é constituído de um conjunto de hidrolases glicosídicas, secretadas por microrganismos, plantas e alguns animais. Estas enzimas são, em geral, glicoproteínas de peso molecular entre 50 e 90 kDa, capazes de romper as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 das microfibrilas de celulose, principal polímero presente nas células vegetais, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose. Para a completa clivagem da celulose em glicose, três tipos de enzimas agem sinergicamente: endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase e β -glicosidase. A fonte de celulase mais comum provém de espécies do gênero *Aspergillus*. O principal emprego das celulasas tem sido o de facilitar a extração de sucos ou substâncias úteis de tecidos vegetais, onde as celulasas são suplementos ou alternativas para as pectinases. Há interesse em que a celulose seja degradada, e seus açúcares utilizados como substratos em processos fermentativos para a obtenção de álcool, proteínas de unicelulares e antibióticos, ou outros produtos químicos. As celulasas também são usadas em detergentes para lavagem de roupas; na indústria de jeans para dar aspecto de superfície gasta e dissolução da tinta azul índigo do brim; em preparações farmacêuticas, como auxiliar na digestão de animais monogástricos; em aditivos para silagem; e para aumentar o rendimento da extração de óleos vegetais (DILLON, 2004).

As substâncias pécicas estão presentes na lamela média e parede primária das células vegetais superiores. As pectinases desempenham um papel importante no crescimento da planta, amadurecimento do fruto e na modificação da biomassa. As pectinases são produzidas por várias espécies de plantas e microrganismos, destacando-se as espécies dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*. As enzimas são classificadas de acordo com o modo de ação (hidrólise ou trans-eliminação) e preferência pelo substrato (pectina, ácido pécico ou oligo-galacturonato). As pectinases constituem um grupo de enzimas utilizadas principalmente na indústria de alimentos para processamento de frutos e legumes, para extração, clarificação e despectinização de sucos. Além disso, as pectinases são úteis na extração de óleo vegetal; nas indústrias têxteis, no preparo de fibras naturais e nas indústrias de celulose e papel. Atualmente, as pectinases estão sendo bastante estudadas porque estão envolvidas nos processos de fitopatogenicidade causados, principalmente, por fungos, os quais atuam desintegrando os tecidos vegetais e favorecendo a penetração do patógeno no tecido hospedeiro (FERREIRA FILHO, 2004).

As proteases são tradicionalmente conhecidas como enzimas degradativas que hidrolisam proteínas a peptídeos e aminoácidos. Elas são amplamente distribuídas na natureza e podem ser classificadas quanto à natureza química de seu sítio ativo, como: serino proteases, cisteíno proteases, aspártico proteases, e metaloproteases. As proteases são uma importante ferramenta na análise de seqüências de proteínas, na identificação e no isolamento de domínios de enzimas multifuncionais mais complexas. As proteases representam 60% do total de enzimas produzidas pela indústria mundial, utilizadas nas áreas de alimentação, para fabricação de pão com alto teor de glúten, amaciamento de carnes, produção de gelatina e enriquecimento de ração animal; detergentes para remoção de resíduos protéicos como sangue, ovo e suor humano das fibras dos tecidos; couros, durante os processos de purga, remolho e depilação do couro; e farmacêutica (FELIX *et al*, 2004).

A linhagem de *A. giganteus* foi cultivada em meio sólido de Vogel contendo glicose 1,5% (m/v) e ágar 1,5% (m/v) a 28°C, por 7 dias, para ser utilizada como fonte de esporos. O cultivo em meio líquido de Vogel foi feito a 28°C, pH 6,5, durante 5 dias, sob condições estacionárias. Foram

utilizadas uma das fontes de carbono: farelo de trigo, xilano de aveia, pectina, amido ou gelatina, a 1% (m/v). Suspensões de conídios em água estéril contendo $1,0 \times 10^7$ esporos/ml foram inoculadas nesse meio. Após cultivo, o micélio foi separado por filtração a vácuo e o filtrado de cultura utilizado como fonte de enzimas extracelulares.

A quantificação de proteínas totais das amostras utilizadas foi feita segundo o método de Lowry, utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

As atividades das hidrolases estudadas foram determinadas utilizando-se protocolos específicos para cada uma delas.

Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de grupos redutores por minutos para as carboidrases e 1 μ mol/min de equivalente de tirosina para as proteases.

Os resultados obtidos para determinação de proteínas extracelulares totais nos diferentes meios podem ser observados na Tabela 1. As atividades das diferentes hidrolases em U/ml e U/mg de proteína estão mostradas na Tabela 2.

Pela análise dos valores obtidos das atividades estudadas, pode-se concluir que o fungo *Aspergillus giganteus* é um bom produtor de xilanases, tanto quando cultivado em meio com farelo de trigo, quanto em meio com xilano de aveia, além de protease ácida, quando cultivado em meio com gelatina, e de poligalacturonase quando cultivado em meio com pectina.

Tabela 1. Teor de proteínas (mg/ml) nos meios de cultivo com diferentes fontes de carbono

Fonte de carbono	Concentração de proteínas extracelulares (mg/ml)
Farelo de trigo	$0,631 \pm 0,035$
Xilano de aveia	$0,524 \pm 0,033$
Pectina	$0,680 \pm 0,017$
Gelatina	$4,249 \pm 0,071$
Amido	$0,429 \pm 0,022$

ND: não detectado

Tabela 2. Produção de hidrolases por *A. giganteus*, cultivado em diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	Enzima	Atividade (U/ml)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
Farelo de trigo	Xilanase	$3,045 \pm 0,257$	$4,701 \pm 0,402$
	Amilase	$0,545 \pm 0,035$	$0,816 \pm 0,009$
	AVICELase	ND	ND
	CMCase	ND	ND
	Poligalacturonase	$0,103 \pm 0,018$	$0,195 \pm 0,008$
	Protease alcalina	ND	ND
	Protease neutra	ND	ND
	Protease ácida	ND	ND
Xilano de aveia	Xilanase	$30,088 \pm 2,464$	$59,008 \pm 7,467$
Pectina	Poligalacturonase	$3,325 \pm 0,255$	$4,872 \pm 0,205$
Gelatina	Protease ácida	$33,349 \pm 1,207$	$7,916 \pm 0,162$
	Protease alcalina	$15,379 \pm 1,415$	$3,666 \pm 0,013$
	Protease neutra	ND	ND
Amido	Amilase	$0,316 \pm 0,022$	$0,665 \pm 0,021$

ND: não detectado

Referências Bibliográficas:

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. Xilanases. 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.

KLICH, M. A; PITT, J.I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. **Commonwealth Scientifica and Industrial Research Organization**. 120p, 1988.

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.

RAPER,K.H; FENNEL, D.I. **The genus *Aspergillus***. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA, 670p, 1965.

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