

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE AMOSTRAS ALIMENTARES E PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Emília Mendes da Silva Santos (1); Ariosto Afonso de Morais (2); Isabela Regina Alvares da Silva Lira (3); Diogo Guimarães (4) Juliana Moura de Luna (5)

<sup>1</sup> Universidade Católica de Pernambuco. emiliamendes.farma@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Católica de Pernambuco. arisotodireito@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Universidade Católica de Pernambuco. enf.isabelalira@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Católica de Pernambuco. diogounicapbio@gmail.com

<sup>5</sup> Universidade Católica de Pernambuco. julianamouraluna@gmail.com

### Resumo

As enzimas constituem um grupo de macromoléculas necessário para inúmeros eventos biológicos. Além disso, são úteis em muitos processos industriais, sobretudo nas áreas de biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos. As enzimas podem ser obtidas de várias fontes, animal, vegetal ou de micro-organismos. As enzimas microbiológicas possuem vantagens sobre as de origem animal ou vegetal, pois possuem menor custo em sua produção e a possibilidade de produção em larga escala, oferecendo um amplo espectro de características físico-químicas. A pesquisa de novas fontes microbianas é de interesse estratégico, pois garante o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornando possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi isolar micro-organismos de amostras de frutas em decomposição com potencial de produção das enzimas celulase, amilase e protease. Este trabalho fez parte da disciplina de microbiologia da Universidade Católica de Pernambuco e os resultados obtidos mostram que os fungos isolados apresentaram atividade enzimática positiva, o que apresenta potencial biotecnológico de produção.

**Palavras-chaves:** atividade enzimática, celulase, amilase, protease, micro-organismos.

### Introdução

Os processos biotecnológicos vêm adquirindo grande destaque na área industrial, visto que exibem aspectos econômicos e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos tradicionais (FLORÊNCIO, 2011). Esses bioprocessos tornam possível a produção de uma grande variedade de metabólitos, tais como enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos entre

outros (WOICIECHOWSKI, 2013). Dentre estes principais bioprodutos, evidenciam-se as enzimas como ativos funcionais e inovadores nesse processo. As enzimas em certas circunstâncias podem substituir compostos sintéticos e contribuir para processos menos agressivos ao meio ambiente devido a sua biodegradabilidade (NATIVIDADE, 2016).

As amilases são bastante utilizadas na indústria do processamento de alimentos, principalmente para modificar as matérias-primas que contêm amido. Sua área de aplicação mais importante é a produção de açúcares, a partir do amido (xarope de glicose, xarope de frutose), que depois se tornam ingredientes de uma ampla variedade de produtos alimentícios, como doces, produtos de panificação, sorvetes e molhos de tomate ketchup. As amilases estão naturalmente presentes em muitas matérias-primas, como cereais e leveduras. No entanto, essa forma de amilase costuma ser insuficiente ou tem um efeito muito lento. Por isso, é comum a adição de amilases produzidas industrialmente, para conduzir ou acelerar a degradação do amido (GOESAERT et al., 2009).

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO; PEREIRA JR., 2009). As celulases são enzimas mais utilizadas na indústria têxtil, sendo aplicadas na lavagem do jeans e de outros tecidos para obtenção de aspecto envelhecido e são utilizadas em novos tecidos sintéticos como o Lyocell, também chamado Tencel (SENAI, 2009).

Por outro lado, as proteases são muito empregadas na indústria alimentícia. As proteases são utilizadas na panificação, alterando a elasticidade e a textura do glúten e melhorando a cor e o sabor do pão. As proteases também estão presentes na indústria de laticínios com a utilização da quimosina, que promove a coagulação do leite (para a produção de queijos), e a lactase, que decompõe a lactose em açúcares mais simples, impedindo assim, a tendência que a lactose possui para adsorção de odores, além de ser higroscópica, causando o endurecimento de laticínios em pó. No amaciamento da carne são usadas proteases como papaína, bromelina e ficina (FERNANDES, 2009).

Esses biocatalisadores de origem microbiana apresentam grande potencialidade para a aplicação industrial, uma vez que podem ser produzidas em larga escala, via fermentações. A

produção de tais metabólitos exige o isolamento e avaliação de micro-organismos capazes de produzir de forma eficiente os bioprodutos de interesse (SENAI, 2009). O presente estudo teve como objetivo isolar micro-organismos através de amostras de frutas mofadas e avaliar o processo de produção das enzimas hidrolíticas protease, amilase e celulase.

## **Metodologia**

### **Coleta**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e Saúde, situado no Campus da Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. Os micro-organismos utilizados para os testes enzimáticos foram isolados de frutas como a banana em processo de decomposição, utilizando a técnica de plaqueamento, em meio saboraud com cloranfenicol onde foram incubados em estufa bacteriológica por 72 horas à 27°C.

### **Atividade amilolítica**

A capacidade de crescer e sintetizar amilases foi observada pela inoculação dos fungos em meio contendo sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), cloreto de sódio ( $NaCl$ ), extrato de levedura, fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ), hidrogenofosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ), no qual foram adicionados ágar bacteriológico, acrescido de 1% de amido. Após a preparação dos meios específicos, seguiram para autoclavagem com duração de 15 minutos a 121°C. A inoculação de micro-organismos em placas de Petri fez-se com 4 pontos da placa e incubados por 72 horas a 27°C. Em seguida foi efetuada a revelação das zonas de hidrólise com adição de uma alíquota de 10 mL de tintura de iodo, composta de 1 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio para cada 300 mL de água destilada, na superfície do meio contendo as colônias. Regiões claras em volta da colônia foi o critério utilizado para atividade amilolítica positiva. As medidas dos diâmetros dos halos e das respectivas colônias foram feitas utilizando um paquímetro e o resultado expresso em milímetros (mm) (SALAHUDDIN et al., 2011).

### **Atividade celulolítica**

Os fungos foram testados quanto a sua capacidade de crescer e hidrolisar compostos celulolíticos em meio contendo sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), cloreto de sódio ( $NaCl$ ), extrato de levedura,

fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidrogenofosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), no qual foram adicionados ágar bacteriológico, acrescido com 1% de carboximetilcelulose (CMC). A inoculação de micro-organismos em placas de Petri fez-se com 4 pontos da placa e incubados por 72 horas a 27°C. Em seguida uma alíquota de 10 mL de vermelho congo a 1% foi adicionada em cada placa deixando-se reagir por 15 minutos em temperatura ambiente (25° C). Depois deste intervalo, o excesso da solução foi descartado e 10 mL de NaCl (1M) foram adicionados em cada placa, deixando-se reagir por 30 minutos em temperatura ambiente (25 °C). Após o descarte da solução salina, foi observada a presença de áreas de hidrólise em volta das colônias, as quais foram indicativos de atividade celulolítica. As medidas dos diâmetros dos halos de hidrólise e das respectivas colônias foram efetuadas (CHARBONNEAU et al., 2012).

### **Atividade proteolítica**

Os fungos foram testados quanto a sua capacidade de crescer e hidrolisar compostos proteolíticos em meio contendo sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), cloreto de sódio (NaCl), extrato de levedura, fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidrogenofosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), no qual foi adicionado ágar bacteriológico, acrescido 2% de leite em pó desnatado. A inoculação de micro-organismos em placas de Petri fez-se com 4 pontos da placa e incubados por 72 horas a 27°C. Em seguida, a revelação do meio protease ocorreu com solução de ácido acético a 5% com a formação de halos transparentes.

### **Índice enzimático**

A determinação enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975); segundo a fórmula abaixo:

$$\text{IE} = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

### **Resultados e Discussão**

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos

alimentos. As enzimas são utilizadas na biologia molecular e na biomedicina, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos. São bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (ORLANDELLI et al., 2012).

Tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, já que podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. A produção de enzimas microbianas é um dos principais setores atual da biotecnologia industrial, sendo que as proteases ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, seguidas pelas amilases (ORLANDELLI et al., 2012).

Bactérias e fungos fazem parte da microbiota dominante de frutas e vegetais em geral (BEUCHAT, 1996). Mais de 20 gêneros de fungos estão envolvidos na deterioração de frutas, como *Alternaria sp.*, *Botrytis sp.*, *Penicillium sp.* e *Phytophthora sp.*, sendo alguns generalizados em várias frutas e outros específicos para determinado tipo de fruta. Em geral, as frutas são mais susceptíveis ao crescimento de fungos ao se tornarem mais maduras ou desidratadas (BRACKETT, 1997).

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de plaqueamento direto para isolamento dos micro-organismos das frutas em decomposição, obtendo 02 isolados, (identificados como A1 e A2). De acordo com Lealem e Gashe (1994), os micro-organismos que apresentarem índices enzimáticos (IE) superiores ou igual a 2,0 são considerados como grandes produtores de enzimas extracelulares em meio sólido. De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que ambos isolados (A1 e A2) apresentaram índices enzimáticos de 9,2 para protease, (figura 1) 6,0 para amilase (figura 2) e 4,8 para celulase (figura 3).

Oliveira Júnior (2014) obteve produção das enzimas CMCase, xilanase, avicelase e FPase usando como substrato o bagaço do coco verde e o pedúnculo de caju seco, utilizando os microrganismos *Penicillium chrysogenum* e um fungo isolado da casca do coco (*Aspergillus fumigatus*).

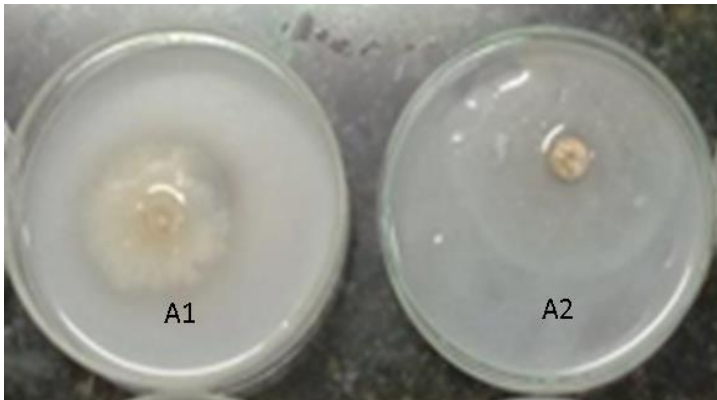
Alexandrino et al. (2007) observou que o resíduo de laranja poderia ser usado como um substrato adequado para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* e produção das enzimas lacase e Mn peroxidase, ambas com grande potencial de uso em diferentes processos industriais, visto que o resíduo de laranja sozinho proporcionou as condições nutricionais necessárias para o crescimento do fungo, não sendo necessária adição suplementar de fonte de carbono ou nitrogênio, e altas atividades das enzimas foram produzidas em períodos relativamente curtos.

Já Stamford et al. (1995) isolou microrganismos endofíticos de tubérculos de jacatupé, os quais apresentaram atividade enzimática em meio sólido. As linhagens endofíticas mais frequentes foram: *Mucor*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Nocardiopsis*. A linhagem de *Nocardiopsis* apresentou atividade amilolítica e lipolítica; a linhagem de *Staphylococcus* apresentou atividade proteolítica, e nenhuma linhagem produziu atividade celulolítica.

Com relação aos resíduos alimentares industriais, Bortolazzo (2011) estudou fungos isolados e selecionados do ambiente agroindustrial, com a capacidade de hidrolisar a fração celulósica do bagaço de cana-de-açúcar e encontrou atividade de endoglucanase e de celulase total. O resíduo do processamento do palmito foi utilizado por Israel (2005) para a produção das enzimas xilanase, carboximetilcelulase e avicelase, pelos fungos *Polyporus tricholoma* e *Polyporus tenuiculus*. Farias et al. (2015) avaliou a produção de pectina liase por linhagens de fungos filamentosos utilizando polpa de maracujá e de buriti como fontes de carbono, constatando que algumas linhagens apresentaram um potencial para a produção da pectina liase e as fontes avaliadas induziram a produção dessa enzima.

As aplicações das enzimas no mercado industrial mundial estão ligadas à biotecnologia, visando o uso de novas matérias-primas e a melhoria de processos e das características físico-químicas de matérias-primas e produtos (ORLANDELLI et al., 2012). Visto que o mercado mundial de enzimas industriais representa 60% do mercado de enzimas (SENAI, 2009), torna-se interessante a pesquisa de enzimas cuja obtenção se dê de forma rápida, eficiente e ambientalmente sustentável. Observamos que frutas em decomposição são uma fonte relevante para a produção de enzimas utilizadas em processos industriais.

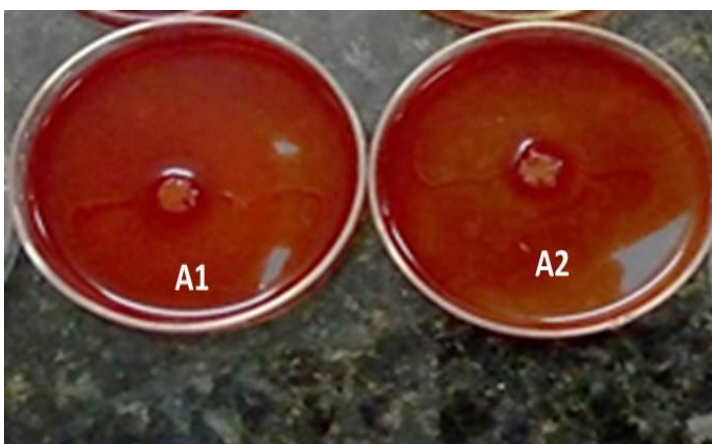
**Figura 1:** Revelação para protease



**Figura 2:** Revelação para amilase



**Figura 3:** Revelação para celulase



## Conclusão

A partir dos resultados obtidos foi observado que os micro-organismos isolados apresentaram-se positivos para a produção das enzimas hidrolíticas protease, amilase e celulase. A microbiota fúngica isolada de frutas em decomposição necessita de mais estudos, uma vez que apresentaram potencial biotecnológico de produção.

## Referências

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.

BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated to fresh product. Journal of Food Protection, v. 59, p. 204-216, 1996.

BORTOLAZZO, N.G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011.

BRACKETT, R.E. Alteración microbiológicas y microorganismos patógenos de frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas. In: WILEY, R.C. Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. Zaragoza: Acribia, p. 263-304, 1997.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Quim. Nova, v. 33, No. 1, p. 181-188, 2010.

CHARBONNEAU, D. M., MOUELHI, F. M., BOISSINOT, M., SIROIS, M., BEAUREGARD, M. Identification of thermophilic bacterial strains producing thermotolerant hydrolytic enzymes from manure compost. Indian Journal of Microbiology, v.52, p. 41-47, 2012.



FARIAS, T.N.; CARVALHO, I.F.; MACHADO, F.P.P.; SANDER, N.L.; SILVA, C.J. Produção de pectina liase por linhagens de fungos filamentosos em polpas de buriti e maracujá como fontes de carbono. *Enciclopédia Biosfera*, v.11, n.22, 2015.

FLORÊNCIO, C. Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma spp.* Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

GOESAERT, H., SLADE, L., LEVINE, H., & DELCOUR, J. A. Amylases and bread firming: an integrated view. *Journal of Cereal Science*, v. 50, n. 3, p. 345-352, 2009.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

ISRAEL, C.M. Utilização do resíduo do processamento do palmito para a produção de enzimas hidrolíticas por fungos do gênero *Polyporus*. Dissertação (Mestrado), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Hidrolíticas Extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.3, 2012.

REVISTA PROCESSOS QUÍMICOS/SENAI. Goiás: Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, v.3, n.5, jan/jun. 2009.

STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M.; STAMFORD, N.P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). Ciênc. Tecnol. Aliment., vol.18, n.4, p.382-385, 1998.

SUBRAMAN, R.; AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. Microbiological Research, v. 167, p. 571–580, 2012.

WOICIECHOWSKI, A.L Emprego de Resíduos Agroindustriais em Bioprocessos Alimentares. Biotecnologia dos alimentos. Biotecnologia de Alimentos, 1ª Edição, Capítulo 6, Editora Atheneu, 2013.