

## SCREENING DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS EM MEIO À BASE DE PALMA FORRAGEIRA

Vanessa Lemos de Lima<sup>1</sup>; Ana Maria Souto-Maior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Química Industrial- CTG – UFPE; E-mail: vlemosdelima@gmail.com,

<sup>2</sup>Docente do Departamento de Antibióticos – CCB – UFPE. E-mail: soutomaior@ufpe.br.

**Sumário:** A palma forrageira é uma cactácea com potencial para aplicação em processos biotecnológicos, devido à rica composição em carboidratos, como a pectina, podendo, em princípio, ser utilizada como substrato para a indução da produção de pectinases por micro-organismos. O objetivo do trabalho foi realizar a seleção de um micro-organismo e investigar a produção de pectinases em meio à base de palma. Inicialmente, foi realizada uma triagem de bactérias do gênero *Bacillus* e actinobactérias em meio de cultura sólido contendo pectina comercial. Tendo como critério o valor do índice enzimático (relação entre os diâmetros dos halos de degradação e da colônia), selecionou-se a linhagem de actinobactéria JUA 168 para cultivo submerso em biorreator instrumentado (0,5 L, 37°C, 0,5 vvm e pH 7), contendo meio à base de pectina extraída de palma miúda (*Nopalea cochenillifera*). Durante o processo, determinaram-se a concentração celular (peso seco), as concentrações de açúcares e ácido galacturônico (cromatografia líquida de alta eficiência) e atividade pectinolítica. A produção de pectinases não foi significativa nas condições às quais a linhagem selecionada foi submetida. Isso ocorreu, provavelmente, devido à presença, além da pectina, de diversos açúcares livres no meio de cultivo, capazes de inibir a produção de enzimas por repressão catabólica.

**Palavras-chave:** actinobactérias; *Bacillus*; palma forrageira; pectinases;

### INTRODUÇÃO

A palma forrageira é uma cactácea cultivada no Semiárido brasileiro, e é basicamente utilizada para alimentação animal, porém, suas diversas aplicações ainda não foram potencialmente exploradas. A composição dessa forrageira apresenta polissacarídeos como a pectina o que confere, a princípio, grande potencial para aplicabilidade em diversas outras áreas, podendo ser utilizada, por exemplo, como substrato capaz de induzir a produção de enzimas pectinolíticas por micro-organismos (CHIACCHIO *et al.*, 2006).

A pectina é um polissacarídeo complexo formado, basicamente, por resíduos de ácido galacturônico. Está presente na parede celular primária e lamela média de células vegetais, atuando como componente na formação e desenvolvimento da parede celular (JAYANI, *et al.*, 2005; VORAGEN *et al.*, 2009). É formada por três estruturas: homogalacturonana, ramnogalacturonanas I e II. A homogalacturonana é a principal subestrutura da pectina e é formada por uma cadeia linear de resíduos de ácido D-galacturônico com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. A ramnogalacturonana I é uma cadeia formada por resíduos de ácido galacturônico e ramnose, às quais se ligam açúcares, arabinanas e galactanas. A ramnogalacturonana II, por sua vez, é considerada a subestrutura mais complexa da pectina. Essa subestrutura é formada de no mínimo oito unidades monoméricas, contendo cadeias laterais de até 12 monossacarídeos raros, tais como apiose, ácido acérico, dentre outros.

As pectinases são enzimas que catalisam a degradação da pectina, por mecanismos de hidrólise e transeliminção. Pectina esterase, pectina liase e

poligalacturonase são as enzimas que auxiliam na degradação do substrato. A pectina esterase, por hidrólise, promove a desesterificação da pectina. A poligalacturonase catalisa a despolimerização da pectina, por hidrólise, liberando sacarídeos de ácido galacturônico de diferentes tamanhos, conforme o sítio de atuação da enzima. A pectina liase, por sua vez, auxilia na despolimerização da pectina, pelo mecanismo da transeliminação, promovendo a formação de sacarídeos de resíduos de ácido galacturônico e composto insaturado (JAYANI *et al.*, 2005).

Pectinases são utilizadas em vários processos industriais, e a maior aplicação encontra-se na indústria de alimentos no processamento (extração e clarificação) de sucos para diminuição da viscosidade (JAYANI *et al.*, 2005). É necessário verificar alternativas que aperfeiçoem e otimizem a produção de pectinases, aliando a seleção de linhagens de micro-organismos à escolha dos substratos e às condições de cultivo (PARK *et al.*, 2005). O objetivo do trabalho foi realizar a seleção de um micro-organismo e investigar a produção de pectinases em meio à base de palma miúda (*Nopalea cochenillifera*).

### MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, realizou-se o “screening” dos micro-organismos em meio sólido à base de pectina solúvel como única fonte de carbono. Foram testados, ao todo, 23 micro-organismos pertencentes ao gênero *Bacillus* e actinobactérias, pertencentes à Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA). As linhagens de *Bacillus* foram incubadas a 30 °C, e as linhagens de actinobactérias a 37 °C. Para selecionar a linhagem a ser utilizada, verificou-se a degradação da pectina pelo aparecimento de halo de degradação do substrato diante da presença de solução corante reveladora específica, composta por iodo. A seleção foi feita baseando-se no índice enzimático (relação entre o diâmetro do halo de degradação e diâmetro da colônia).

Após isso, o micro-organismo selecionado foi cultivado em biorreator de bancada, com volume de trabalho de 0,5 L, temperatura de 37°C, aeração de 0,5 vvm e pH 7, utilizando-se meio à base de pectina extraída (com água, a 60 °C, por 60 minutos) de cladódios de palma miúda. Amostras foram retiradas em intervalos adequados para o acompanhamento do crescimento, consumo de substrato e produção de pectinases.

A concentração de biomassa foi determinada após filtração da amostra, lavagem com EDTA para solubilização de pectina remanescente e secagem em estufa (80 °C) até peso constante (24 horas). O líquido foi utilizado para a determinação de açúcares redutores por metodologia proposta por Miller (1959) e atividade pectinolítica, como descrito por Baladhandayutham e Thangavelu (2011). A concentração de ácido galacturônico foi determinada conforme metodologia proposta por Sluiter *et al.* (2008).

### RESULTADOS

Os resultados dos índices enzimáticos para as linhagens que apresentaram halo de degradação são mostrados na Tabela 1, sendo três linhagens pertencentes ao gênero *Bacillus* e nove linhagens de actinobactérias.

**Tabela 1.** Índices enzimáticos para as linhagens estudadas.

---

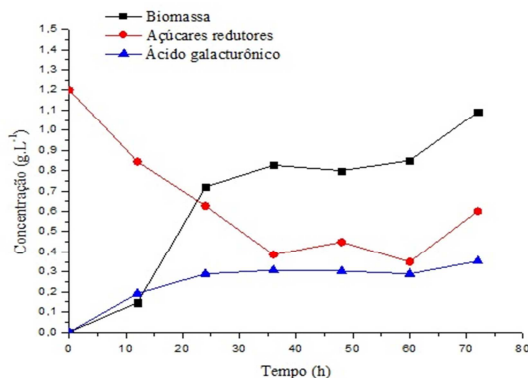
*Bacillus*

Actinobactérias

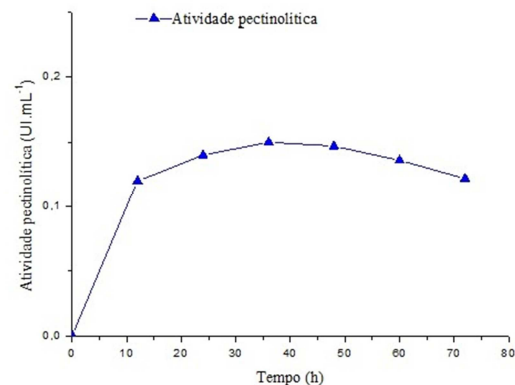
Linagem	Índice Enzimático	Linagem	Índice Enzimático
<i>Bacillus pumilus</i> (UFPEDA 448)	3,6 ± 0,8	JUÁ 168	7,7 ± 1,3
<i>Bacillus</i> sp C77 (UFPEDA 461)	2,5 ± 1,3	JUÁ 171X	6,7 ± 0,2
<i>Bacillus</i> sp C201 (UFPEDA 472)	2,06 ± 0,07	JUÁ 178X	5,1 ± 1,3
		JUÁ 180	5,0 ± 1,3
		JUÁ 825	4,55 ± 0,05
		JUÁ 172	3,7 ± 0,5
		JUÁ 169	3,6 ± 0,3
		JUÁ 164A	3,2 ± 0,4
		JUÁ 178	1,95 ± 0,08

Os perfis de crescimento celular, consumo do substrato e a produção de pectinases em meio à base de palma forrageira são mostrados nas Figuras 1-2.

**Figura 1.** Perfil de crescimento microbiano, consumo de substrato e produção de ácido galacturônico em meio à base de palma forrageira.



**Figura 2.** Perfil de produção de enzimas em meio à base de palma forrageira.



## DISCUSSÃO

Como pode ser visto na Tabela 1, a linhagem de actinobactéria JUÁ 168 apresentou o maior valor de índice enzimático, igual a 7,7 ± 1,3, sendo, portanto, o micro-organismo utilizado para a pesquisa quanto à produção das pectinases em biorreator em meio à base de palma forrageira.

A partir das Figura 1 e 2, observa-se que, nas condições experimentais a que o micro-organismo foi submetido, a produção de enzimas pectinolíticas pela linhagem de actinobactéria JUA 168 não foi significativa. A produção de enzimas pectinolíticas é induzida pelo polissacarídeo pectina, a qual está presente na composição da palma. Contudo, a produção das pectinases pode ser reprimida pela presença de glicose e de outros açúcares. O extrato possuía em sua composição não só a pectina, mas também outros açúcares, o que promoveu o crescimento inicial da linhagem no meio. A linhagem utilizou a fonte de carbono que fornece rapidamente energia para seu crescimento. Com isso, a indução na produção de enzimas extracelulares por outros substratos pode ter sido reprimida pela presença de fontes de fácil assimilação.

## CONCLUSÃO

A produção de pectinases em meio à base de palma não foi significativa nas condições às quais a linhagem selecionada foi submetida. Isso ocorreu, provavelmente, devido à presença, além da pectina, de diversos açúcares livres na composição do extrato.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa IC e pelo auxílio financeiro (Processo 407918/2013-2), o qual possibilitou a realização deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

BALADHANDAYUTHAM, S.; THANGAVELU, V. Optimization and kinetics of solid-state fermentative production of pectinase by *Aspergillus awamori*. **International Journal of Chemistry Technology Research**, v. 3, n. 4, p.1758-1764, Oct-Dec 2011.

CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, p. 39-49, nov. 2006.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, set. 2005.

PARK, C.-S. et al. Cloning and sequencing of an exoglucanase gene from *Streptomyces* sp. M23, and its expression in *Streptomyces lividans* TK-24. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 434-436, abr. 2005..

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, mar. 1959.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Jan. 2008.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263-275, mar. 2009.