

Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil

BARATTO, César Milton^{*}; SALAMONI, Sabrina Pinto^{**}; COSTA, Ricardo^{***};
OLIVEIRA, Carolina Borges de^{****}; LOCATELLI, Gabriel Olivo^{*****}

Resumo

A tecnologia enzimática vem sendo utilizada por oferecer vantagens no estabelecimento de um processo tecnologicamente limpo. Enzimas hidrolíticas estão entre os principais alvos da pesquisa biotecnológica pelo grande potencial de aplicação no setor industrial. Com o objetivo de selecionar e caracterizar microrganismos amilolíticos, pectinolíticos e xilanolíticos utilizaram-se solos e resíduos agroindustriais como fonte para o isolamento. Como resultados, dezoito cepas produtoras de amilase foram isoladas. Destas, onze apresentaram Índice Enzimático (IE) superior a 2.0 e foram determinados os perfis de regulação por repressão catabólica, sendo que três apresentaram características desejadas. Estes foram cultivados em meio líquido e tiveram a atividade de amilase sacarificante determinada. Também foram selecionados quatro microrganismos produtores de pectinase, que em cultivo em meio líquido confirmaram produção das enzimas pectina liase (PMGL) e de poligalacturanase (PG). Da mesma forma, a partir de cultivo em meio sólido, foram isolados treze microrganismos produtores de xilanases, sendo onze bactérias e dois fungos filamentosos. Cinco dos microrganismos que se destacaram quanto ao IE foram cultivados em meio líquido e analisados quando à produção da enzima, assim, um fungo filamentoso e uma bactéria, originários de solo, destacaram-se como produtores de xilanase. Apesar de haver a necessidade de aprofundamentos nos estudos quanto à caracterização desses isolados e das enzimas produzidas, os resultados positivos das atividades enzimáticas demonstraram que as metodologias utilizadas e os microrganismos selecionados são promissores na obtenção das respectivas enzimas com potencial para aplicação na indústria.

Palavras-chave: Enzimas hidrolíticas. Isolamento de Microrganismos. Microbiologia Aplicada.

^{*} Doutor em Biologia Celular e Molecular, professor e pesquisador da Universidade do Oeste de Santa Catarina - Unoesc - Núcleo Biotecnológico, Bloco K, Laboratório de Biologia Molecular; cesar.baratto@unoesc.edu.br

^{**} Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, professora e pesquisadora Núcleo Biotecnológico - Unoesc campus de Videira/SC. sabrina.salamoni@unoesc.edu.br

^{***} Bacharel em Ciências Biológicas - Unoesc campus de Videira/SC.

^{****} Pós-graduanda em Microbiologia Industrial e Ambiental - Unoesc campus de Videira/SC.

^{*****} Mestrado em Biotecnologia Industrial; Departamento de Antibióticos; Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. gabriel.locatelli@hotmail.com

Selection of microorganisms hydrolytic enzymes producer isolated from the midwest region of Santa Catarina, Brazil

Abstract

The enzyme technology has been used by offering advantages in establishing a clean process technology. Hydrolytic enzymes are among the principal targets of biotechnological research for the potential application in industry. In order to select and characterize amylolytic, pectinolytic and xylanolíticos microorganisms were used soils and agro-industrial residues as a source for the isolation. As a result, 18 amylase-producing strains were isolated, these 11 had IE higher than 2.0. Was determined the regulation profile by catabolic repression, and 3 exhibited the desired characteristics. These were grown in liquid medium and the activity of saccharificant amylase were determined. Were also selected 4 producer microorganisms of pectinase which grown up in liquid confirmed the production of pectin lyase (PMGL) and poligalacturanase enzymes (PG). Likewise, from culture on solid medium were isolated 13 xylanase-producing microorganisms, where 11 were bacteria and 2 filamentous fungi. Five microorganisms which stood out as the IE, was cultivated in liquid medium and analyzed when the enzyme production, therefore, one filamentous fungus and one bacteria originating from the soil should out as producers of xylanase. Although there is a need for deepening the studies on the characterization of these isolates and of produced enzymes, the positive results of enzyme activities showed that the methodologies used and the selected microorganisms are promising in obtaining the enzymes respective with the potential for application in industry.

Keywords: Hydrolytic enzymes. Isolation of Microorganisms. Applied Microbiology.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas nas indústrias é indispensável, pois através dela pode-se melhorar a qualidade de um produto ou tornar mais fácil a obtenção do mesmo. Essa capacidade deve-se ao fato de que as enzimas atuam sobre as substâncias que compõem um determinado produto, sendo que, para cada substância, existem enzimas específicas que a degradam (LIMA *et al.*, 2001).

O Brasil, atualmente, importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las. Essa potencialidade é evidenciada pela grande diversidade biológica, ainda pouco explorada, que serviria como fonte para a obtenção de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial e pela abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como, a palha de arroz, o bagaço de cana, dentre outros) que constitui substrato de baixo custo para as fermentações (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiológica, sendo esta última, a fonte mais recorrida na obtenção de enzimas para aplicação biotecnológica por terem menores custos na sua obtenção, além da possibilidade de produção em larga escala (PANDEY *et al.*, 2005).

Segundo Bon, Ferrara e Corvo (2008), as enzimas podem ser aplicadas nos mais diversos setores agroindustriais, incluindo as indústrias de alimentos, papel, têxtil e farmacêutica. Entre as vantagens da utilização enzimática destaca-se o fato de ser um produto natural, que apresenta um alto grau de especificidade nas reações, contribuindo para a eficiência do processo, e ainda, por apresentar a atividade que pode ser regulada, atuando em baixas concentrações e sob condições brandas de pH e temperatura.

São inúmeras as enzimas com importância para a indústria, mas devido à grande demanda e perspectivas de expansão da aplicação no setor agroindustrial têm se destacado as amilases, pectinases e xilanases (UENOJO; PASTORE, 2007; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; MILAGRES; MAGALHAES; FERRAZ, 2005; LIMA *et al.*, 2001).

As amilases são enzimas responsáveis pela degradação das moléculas de amido. O amido é encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, trigo, cevada e arroz e em tubérculos como batata e mandioca (BULÉON, 1998). As enzimas amilolíticas são amplamente aplicadas em processos biotecnológicos, tais como nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA *et al.*, 2003). Sendo disponível comercialmente, as amilases microbianas têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias que processam este polímero (PANDEY *et al.*, 2005).

As enzimas pectinolíticas, por sua vez, são capazes de degradar as substâncias pécicas, componentes da parede celular dos vegetais superiores. A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de microrganismos, mas os fungos são os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (BLANDINO *et al.*, 2001). As pectinases microbianas possuem grande potencial e têm grande importância na era biotecnológica atual, devido as suas variadas aplicações, como na extração e clarificação de sucos de frutas, processamento do algodão, degomação de fibras de plantas, extração de óleo vegetal, chá e fermentação de café, clareamento de papel, como aditivo em ração animal, em indústrias de bebidas alcoólicas e de alimentos (UENOJO; PASTORE, 2007; JAYANI *et al.*, 2005).

Outro grupo de enzima hidrolítica com grande demanda e potencial está a xilanase. As enzimas xilanolíticas, capazes de degradar a xilana, podem ser produzidas por uma variedade de microrganismos, no entanto os fungos filamentosos, também se destacam entre os maiores produtores (HALTRICH *et al.*, 1996). De acordo com Haltrich e colaboradores (1996), a produção de xilanases em escala industrial é dominada por *Aspergillus* sp e *Trichoderma* sp. O princípio de sua utilização nos processos baseia-se no fato de que a xilana é o principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico das plantas e consiste em uma cadeia principal formada por resíduos de xilopiranosil, unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (BIELY, 1985).

Xilanases apresentam grande importância comercial devido a sua aplicabilidade no setor industrial. Destaca-se seu emprego nas indústrias de papel, como auxiliares no branquiamento de polpas Kraft; seu uso na indústria alimentícia, na fabricação de pães de melhor qualidade; no processamento de sucos, frutas e vegetais, visando à clarificação de sucos e vinhos; assim como, na etapa da filtração da cerveja rompendo sólido em suspensão (BECKER; BARATTO; GELINSKI, 2009; BAJPAI, 1997; VIKARI *et al.*, 1994).

A ampla diversidade quanto às características das enzimas potencializa sua aplicação em diferentes processos na indústria, assim, frente à demanda por novas hidrolases com prospecção de aplicabilidade no setor, há um estímulo natural pela exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas.

O presente estudo parte da necessidade do setor agroindustrial em obter enzimas com novas características, assim como, novas fontes de enzimas, especialmente de menor custo. Dessa forma, buscou-se a avaliação de técnicas de isolamento e o isolamento de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas, pectinolíticas e xilanolíticas com potenciais de aplicação em biotecnologia, a partir de fontes naturais e agroindústrias da região de Videira, Santa Catarina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia da Unoesc campus de Videira. O isolamento de microrganismos produtores de enzimas foi a partir de diferentes amostras obtidas de fontes agroindustriais e de solos da região.

2.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS EXCRETORES DE ENZIMAS

A partir das diferentes amostras coletadas, foram realizadas diluições decimais seriadas e efetuado o plaqueamento em meio sólido indicativo para a atividade enzimática específica (amilase, pectinase e xilanase). As placas foram incubadas a 30°C por 2 a 4 dias e as colônias foram avaliadas quanto à capacidade de hidrólise dos respectivos substratos (amido, pectina cítrica e xilana) a partir da produção de halo de degradação, evidenciado por apresentarem zonas claras em sua volta.

Os microrganismos foram repicados em placas com meio de cultivo Ágar nutriente (extrato de carne 0,3%, peptona bacteriológica 0,5% e Ágar 1,5%; HIMEDIA) e mantidos em culturas puras. Estes também foram cultivados, acrescidos de glicerol 20% e mantidos à temperatura de -20°C, conforme metodologia de Demain e Davies (1999).

2.1.1 Microrganismos amilolíticos

O isolamento dos microrganismos produtores de amilase foi realizado a partir de milho moído, de restos da lavoura, de resíduos de fábricas de ração e de amostras de solo da região de Videira, SC. As amostras foram plaqueadas em meio sólido contendo amido como indutor e indicador de atividade (peptona 0,5%, extrato de carne 0,3%, amido 0,5%, e ágar 1,5%; (HANKIN; ANAGNOST AKIS, 1975). A presença da atividade amilolítica foi evidenciada pela adição de iodo.

2.1.2 Microrganismos pectinolíticos

As amostras foram coletadas a partir de bagaço de uva e frutas cítricas encontradas no solo já em estado de decomposição. Os microrganismos foram inoculados em meio sólido de acordo com a metodologia proposta por Uenojo e Pastore (2007), contendo meio Ágar nutriente e 1,25 % de pectina cítrica (Sigma). Para a detecção dos isolados pectinolíticos seguiram-se as metodologias proposta por Hankin e Anagnostakis (1975), com revelação das placas em uma solução aquosa de 1% de brometo hexadeciltrimetilamonia e a sugerida por Uenojo e Pastore (2007), onde as placas foram reveladas com uma solução de vermelho rutênio 0,05 % e lavadas com água destilada.

2.1.3 Microrganismos xilanolíticos

Os microrganismos foram isolados de amostras de madeira em decomposição de amostras de solo. A seleção de microrganismos produtores de xilanase foi realizada em meio de cultura sólido (0,2g de extrato de levedura, 4g de Ágar, 0,2 g de xilana, 4mL de soluções de sais, 0,08mL de elementos traços e 200mL de água), seguindo sugestão de Maciel (2006). Após as colônias estarem visíveis nas placas, estas foram embebidas em lugol a 0,5% por 5 minutos e depois lavada com água destilada.

Para fins comparativos nos cultivos em meio sólido, foram utilizadas como substrato tanto xilana purificada (MACIEL, 2006) como xilana comercial (Birchwood-Sigma).

2.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE)

As cepas que apresentaram halo em torno da colônia tiveram sua atividade avaliada pelo índice enzimático (IE), dado pela relação do diâmetro médio do halo de degradação do substrato pelo diâmetro médio da colônia (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998).

2.2.1 Análise da regulação de expressão de amilase

Especificamente os microrganismos produtores de amilases foram analisados, também em meio sólido, quanto ao perfil de regulação das amilases por repressão catabólica, onde foi utilizado o meio LB (Luria-Bertani) com a adição de amido (0,5%); amido (0,5%) + glicose (0,2%); amido (0,5%) + glicose (1%). Após a inoculação, os isolados foram cultivados por 72 horas e analisados qualitativamente. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.3 FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO LÍQUIDO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Os microrganismos que apresentaram maior IE para cada enzima foram utilizados para cultivos em meio líquido e posterior análise quanto da presença da respectiva atividade em sobrenadante dos cultivos.

Os isolados produtores de amilase pré-selecionados foram cultivadas em meio líquido contendo a mesma formulação que o meio para isolamento, mas sem a adição de ágar. Os isolados que apresentaram possível produção de enzimas pectinolíticas foram inoculados em meio líquido, seguindo a metodologia de Uenojo (2003). A fermentação submersa em meio indutor para a produção de xilanase (contendo xilana purificada) foi realizada em meio líquido contendo a mesma formulação que o meio sólido, entretanto, sem a adição de ágar (MACIEL, 2006).

Cem mL de cada meio de cultivo foram autoclavados em frascos de *Erlenmeyer* de 500mL e inoculadas com as respectivas cepas selecionadas. Após, foram cultivadas em *shaker* rotatório a 30°C, a 130 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas e centrifugadas (3600 rpm por 5 minutos). O meio sobrenadante foi utilizado para determinação da respectiva atividade enzimática.

2.4 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

As análises para determinação das atividades enzimáticas (amilase, pectinase e xilanase) nos sobrenadantes de cultivo foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos representam as médias aritméticas obtidas.

A atividade de pectina liase (PMGL) foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Albershein (1966) com algumas modificações. Nas reações foram utilizados 1mL de substrato (pectina cítrica) e 1,0mL de extrato enzimático e incubados *overnight* a 40°C e a reação foi paralisada com a adição de 3,5mL de HCl 0,5M. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 235nm contra o branco. O coeficiente de extinção molar dos produtos insaturados $e_{235} = 5550 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo de atividade $UA = (DA/e_{235}) \cdot 10^9$ (hmol/mL/min), onde DA é o aumento de absorvância por minuto (UENOJO, 2003).

As atividades de amilase sacrificante, de poligalacturanase (PG) e de xilanase (Endo-1,4- β xylanase) foram determinadas pela medida da liberação de grupos redutores, utilizando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Seguiu-se o procedimento descrito por Fernandes e colaboradores (2007), Biely (1985) e Uenojo (2003).

As reações continham 0,2mL da solução enzimática bruta, 0,1mL do substrato (amido solúvel, xilana ou pectina cítrica) a 1,0% e 0,2mL de tampão acetato 0,1M pH 5,5. Estas foram incubadas por 10 min a 37°C. As reações foram paralisadas com adição de 0,2mL de DNS e fervidas em banho-maria por 5 min. Após estas serem resfriadas, foi adicionado 1,3mL de água destilada. Depois de homogeneizadas foi determinada leitura em espectrofotômetro a 540nm. Como havia açúcar redutor no substrato bruto (sobrenadante dos cultivos) foi realizado, além do branco da reação, um branco da amostra (SPIER, 2005).

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto, segundo uma curva padrão da glicose, de acordo com Miller (1959). Como controle positivo da reação foi utilizada uma α -amilase fúngica comercial (Novozyme) diluída 100 vezes.

2.5 IDENTIFICAÇÃO PARCIAL DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos foram previamente identificados por suas características morfológicas e por microscopia ótica. A técnica de coloração de Gram aliada à observação de lamina a fresco foi utilizada para diferenciar os grupos de bactérias (FREITAS; PICOLI, 2007). Os microrganismos foram identificados parcialmente a partir da morfologia das colônias e de suas características morfológicas em microscopia ótica. A análise microscópica dos fungos filamentosos baseou-se na descrição macromorfológica das colônias em meios de culturas (GUERREIRO; SILVEIRA, 1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inúmeras metodologias foram descritas de forma a facilitar a seleção e o isolamento de microrganismos excretores de hidrolases. Estas metodologias são principalmente baseadas em cultivos dos microrganismos em meio sólido, onde o meio específico apresenta a capacidade de identificar a produção de uma determinada enzima (MACIEL, 2006; STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998; HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). No presente trabalho, algumas destas metodologias foram utilizadas para o isolamento de microrganismos produtores de amilases, pectinases e xilanases, a partir de várias amostras oriundas da região de Videira, SC. Assim, foram isolados 18 microrganismos produtores de amilase, 4 produtores de pectinase e 13 de xilanase.

Com os experimentos para seleção de microrganismos produtores de amilase foram obtidos 18 isolados (denominados de cepa 1 - 18). Destes microrganismos, 2 eram leveduras e 16 eram bactérias, das quais, 10 sendo Gram-positivas e 6-Gram negativas. Os isolados foram analisados quanto à capacidade de produzir amilase por índice enzimático (IE), sendo as medidas realizadas em períodos de 24, 48 e 72 horas (Tabela 1). Observa-se que 11 isolados (61%) apresentaram IE superior a 2,0, após 72 horas de incubação. Os valores encontrados foram superiores aos descritos por Oliveira e outros (2007), que identificaram atividade enzimática maior que 2,0 somente em 37% das cepas isoladas. Demonstrando os potenciais desses isolados na produção da enzima, assim como a adequação das fontes para o isolamento.

Tabela 1- Atividade amilolítica dos isolados determinada por Índice Enzimático (IE) (continua)

Isolados	IE 24 horas	IE 48 horas	IE em 72 horas	Origem
Cepa 1	1,44	1,09	1,28	Ração
Cepa 2	-	1,36	1,58	Ração
Cepa 3	1,20	1,20	1,20	Ração
Cepa 4	2,71	2,86	2,86	Solo

(conclusão)

Isolados	IE 24 horas	IE 48 horas	IE em 72 horas	Origem
Cepa 5	2,31	1,88	1,89	Solo
Cepa 6	-	2,70	2,86	Solo
Cepa 7	-	-	1,00	Milho
Cepa 8	1,57	2,06	1,89	Solo
Cepa 9	-	2,87	2,2	Milho
Cepa 10	-	-	1,10	Milho
Cepa 11	1,89	2,10	2,51	Solo
Cepa 12	1,47	1,93	2,33	Solo
Cepa 13	1,36	2,06	2,2	Milho
Cepa 14	2,37	3,3	3,85	Milho
Cepa 15	-	-	1,00	Solo
Cepa 16	4,13	4,19	3,83	Milho
Cepa 17	2,00	3,27	3,5	Milho
Cepa 18	-	1,50	1,94	Solo

Fonte: Os autores.

Os isolados que apresentaram um IE superior a 2,0 foram analisados quanto ao perfil de regulação da expressão e secreção de amilase frente à presença de glicose (Tabela 2). Quando adicionado no meio apenas o amido, todos apresentaram a excreção de amilase, como era esperado. Já em presença de amido e glicose em concentração final de 0,2% houve inibição de quatro isolados, entretanto, com a adição de glicose em concentração de 1,0%, apenas três isolados apresentaram o halo de degradação (cepas 4, 14 e 17).

Esses microrganismos foram considerados os mais indicados para análise de produção da enzima em cultivo líquido por não sofrerem repressão catabólica com o aumento da concentração de glicose (MONTEIRO; ULHOA, 2006). Em meio de cultivo, a produção ou a liberação da glicose, ocorre devido à degradação do amido utilizado como indutor e como fonte de carbono, pela ação de amilases excretadas pelos microrganismos, que pode inibir a produção da enzima (FERNANDES *et al.*, 2007). A liberação de glicose foi evidenciada a partir da determinação de açúcar redutor presente em meio de cultivo líquido (dados não demonstrados).

Tabela 2- Perfil de expressão e secreção de amilase frente ao repressor catabólico

Isolados	Amido (0,5%)	Amido + Glicose (0,2%)	Amido + Glicose (1,0%)
Cepa 4	X	X	X
Cepa 5	X	X	-
Cepa 6	X	X	-
Cepa 8	X	-	-
Cepa 9	X	-	-
Cepa 11	X	X	-
Cepa 12	X	X	-
Cepa 13	X	-	-
Cepa 14	X	X	X
Cepa 16	X	-	-
Cepa 17	X	X	X

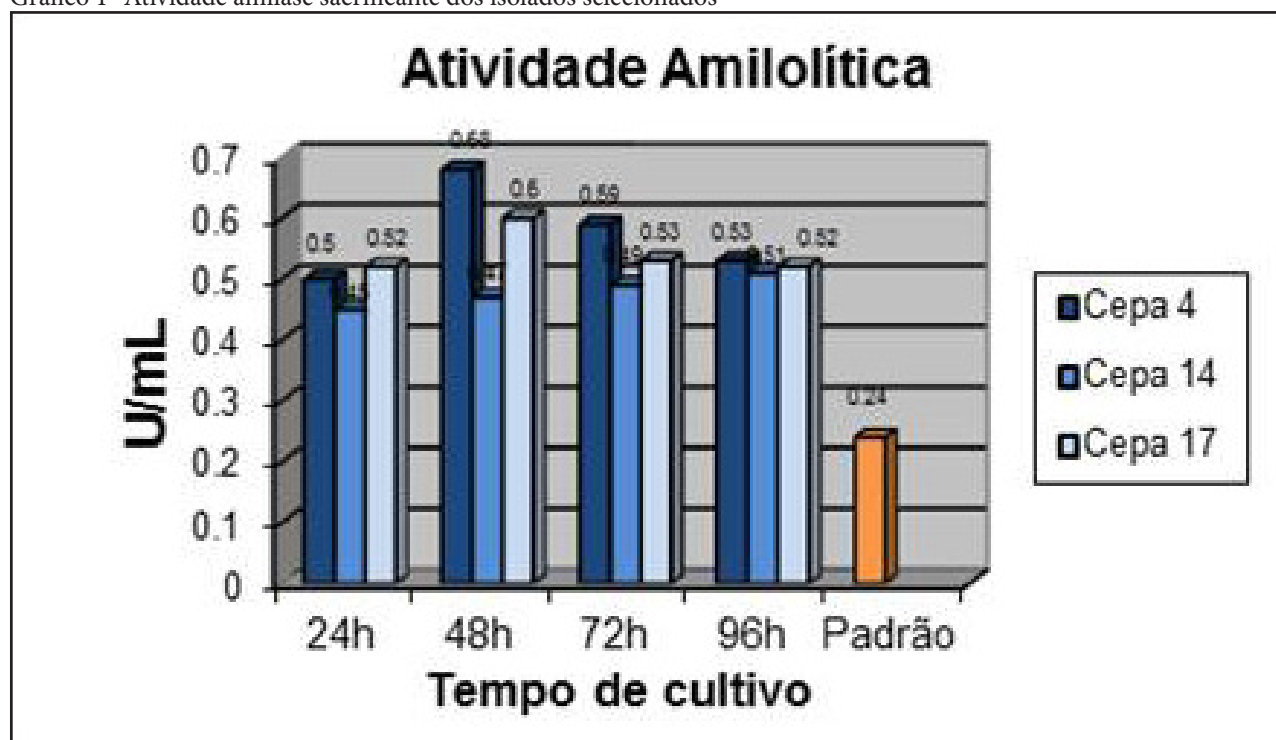
(X) Presença de halo de degradação; (-) ausência de halo de degradação. Sombreados os isolados utilizados para os cultivos em meio líquido.

Fonte: Os autores.

Com a análise do cultivo em meio líquido dos três isolados selecionados (cepas 4, 14 e 17), foi possível confirmar a atividade amilolítica (amilase sacrificante) conforme apresentado no Gráfico 1. Corroborando que a estratégia de pré-seleção por cultivo frente à glicose é interessante, pois com a sequência do cultivo não houve uma repressão da expressão enzimática, como normalmente ocorre (MONTEIRO; ULHOA, 2006; FERNANDES *et al.*, 2007). As cepas 4 e 17 apresentaram os picos de atividade em 48 horas de cultivo, enquanto à cepa 14, apresentou um aumento na atividade com o aumento do tempo de cultivo, entretanto, a atividade foi inferior à apresentada pelos demais isolados.

Apesar de as atividades no sobrenadante dos cultivos serem inferiores aos descritos em outros trabalhos (FERNANDES *et al.*, 2007; MONTEIRO; ULHOA, 2006; SPIER, 2005), é importante considerar que esses foram obtidos a partir de fermentações em estado sólido de fungos filamentosos, sendo interessante nos casos de cultivo em meio líquido incluir etapas de concentração e purificação parcial da enzima, quando há perspectiva de aplicação em processos biotecnológicos (GUPTA *et al.*, 2003). Além disso, as α -amilases fúngicas possuem pH ótimo entre 5,0 e 6,0 e diminuem sua atividade rapidamente em temperaturas acima de 50°C, enquanto as enzimas bacterianas podem apresentar uma tolerância maior a temperaturas mais altas (até 70°C) e um pH ótimo mais elevado, o que propiciaria um maior potencial de aplicação biotecnológica (GUPTA *et al.*, 2003; REED, 1975).

Gráfico 1- Atividade amilase sacrificante dos isolados selecionados



Fonte: Os autores.

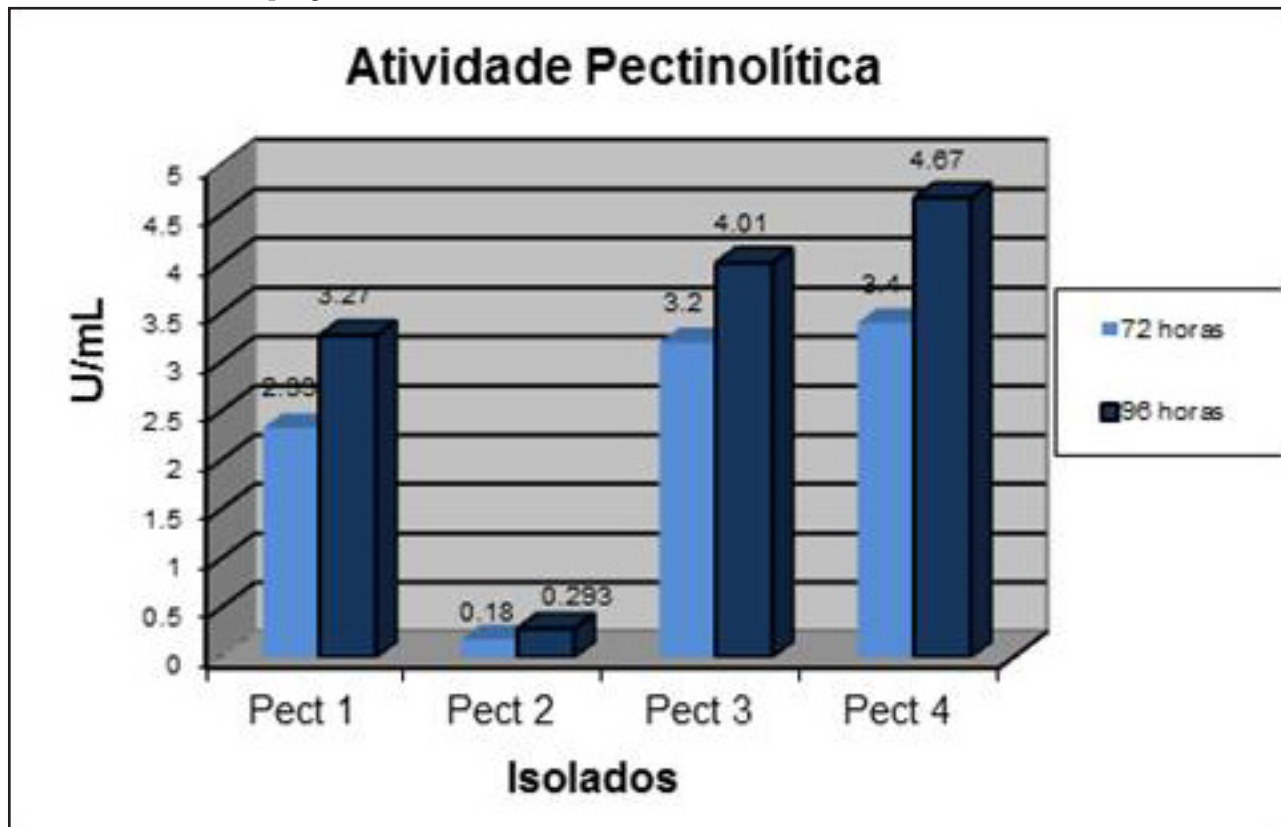
A partir dos trabalhos de isolamento de microrganismos pectinolíticos e as respectivas análises enzimáticas de poligalacturanase (PG) e pectina liase (PMGL), foi possível obter 4 microrganismos (denominados Pect 1 – 4), entretanto neste caso, todos eram fungos filamentosos característicos (GUERREIRO; SILVEIRA, 1996).

Baseando-se nas características morfológicas microscópicas e macroscópicas apresentadas pelos microrganismos foram identificados como *Aspergillus* sp. Observam-se que os principais grupos de produtores de

enzimas pectinolíticas pertencem ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* (DE GREGORIO *et al.*, 2002; MALLER, 2008), e segundo De Gregorio *et al.* (2002) e Maller (2008) os gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* são frequentemente usados, devido à alta atividade pectinolítica exibida nos extratos produzidos.

Todos os isolados foram cultivados em meio líquido para análise de atividade da enzimática, entretanto não foi detectada atividade de PG em cultivos de 24 e 48 horas, sendo esta detectada a partir de 72 horas, indicando uma expressão tardia das enzimas (Gráfico 2). Os resultados mostram uma diferença de produção entre as quatro cepas, sendo que o isolado Pect 3 e 4 tiveram melhores índices de atividade, enquanto o Pect 2 apresentou a menor atividade.

Gráfico 2 - Atividade de poligalcturanase dos isolados



Fonte: Os autores.

Nos testes de PMGL, apenas o Pect 4 apresentou atividade de 264,2 η mol/mL/min, entretanto, o resultado apresentado é baixo comparado aos obtidos por Naidu e Panda (1999) com *Aspergillus niger* que chegaram à casa dos 2400 η mol/mL/min. Ressalta-se, por outro lado, que a fonte das amostras para isolamento remete a uma aplicação no aproveitamento de resíduos como bagaços de uva, maçã e de frutas cítricas, que serviriam como substratos para o cultivo de microrganismos, e ainda, sua utilização seria uma forma de agregar valor a resíduos agroindustriais produzidos e facilmente obtidos na região de Videira, SC. De acordo com Niture e Pant (2004), resíduos como cascas de laranjas e outras frutas têm apresentado resultados iguais ou até superiores às pectinas comerciais, assim, conclui-se que o uso de resíduos não aproveitáveis pela indústria, além de ser uma fonte barata de energia para o cultivo de microrganismos, também pode ser mais eficiente.

Os microrganismos isolados com atividades de xilanase foram selecionados por apresentarem capacidade de degradação tanto de xilana comercial (Sigma) como de xilana purificada a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados quanto ao desenvolvimento de halo de degradação não mostraram diferenças entre os meios contendo um tipo ou outro de xilana, indicando que a xilana purificada foi eficiente para o isolamento de microrganismos, como sugerido por Maciel (2006).

No total foram obtidos 13 microrganismos, sendo 5 a partir de madeira (denominados de XM 1 – 5) e 8 do solo (Tabela 3). Os isolado do solo eram 6 bactérias (denominados XS 1-6; todos com forma bacilar, sendo 4 Gram-positivas e 2 Gram-negativas) e 2 fungos filamentosos (XSF 1 e 2; pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium*; GUERREIRO; SILVEIRA, 1996).

Tabela 3 - Atividade xilanolítica (IE) das cepas selecionadas

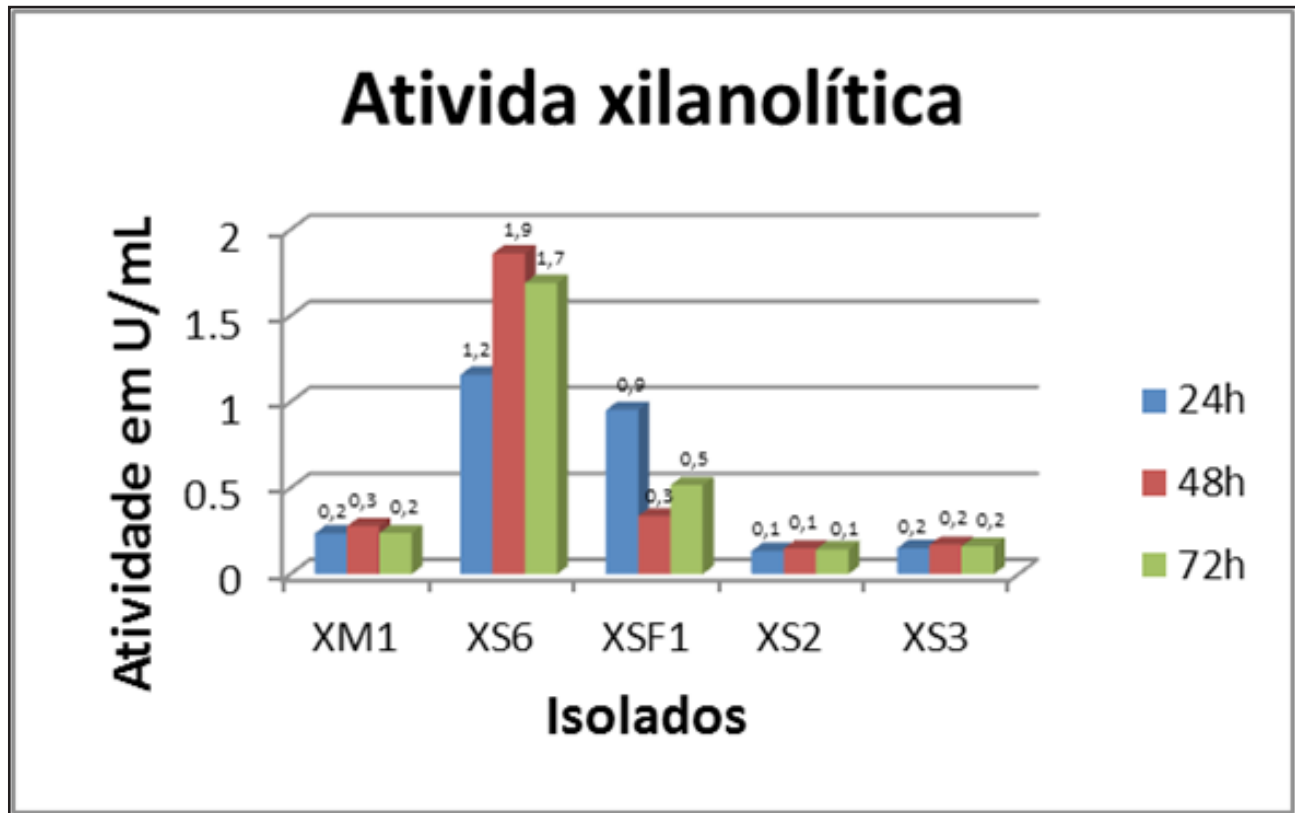
Isolados	IE 24 horas	Origem
XS 1	1,75	Solo
XS 2	2,85	
XS 3	2,85	
XS 4	2,4	
XS 5	2,75	
XS 6	2,85	
XSF1	2,0	
XSF2	1,0	
XM 1	3,0	Madeira
XM 2	0,5	
XM 3	0,5	
XM 4	1,33	
XM 5	0,5	

Fonte: Os autores.

Baseando-se na metodologia de Oliveira e outros (2007), as cepas que apresentaram atividade xilanolítica em meio sólido foram avaliadas quanto ao índice enzimático (IE) em cultivos de 48 horas (Tabela 3). Dos microrganismos isolados da madeira, menos da metade destes apresentaram um IE maior ou igual a 2,0, enquanto dos oriundos do solo, a maioria apresentou IE maior que 2,0. Indicando este último como uma fonte interessante para obtenção de isolados com atividade xilanolítica.

A partir dessa análise, cinco dos isolados que se destacaram quanto ao IE (XM1, XSF1, XS2, XS3 e XS6) foram selecionados para cultivo em meio líquido com o objetivo de determinar seu potencial de produção de xilanase. Os resultados estão apresentados no Gráfico 3. Destacaram-se por atividade maior, os isolados XS6 e XSF1, bactéria e fungo filamentoso, respectivamente. Entretanto, apesar dos isolados do solo analisados neste trabalho terem se destacado como produtores de xilanase, comparando-os com resultados de outros trabalhos, a atividade enzimática em unidade (U) foi relativamente baixa (MACIEL, 2006). Todo interesse no estudo dos sistemas de enzimas xilanolíticas vem sendo estimulado pela sua utilidade em uma variedade de processos biotecnológicos, por isso estudos de termoestabilidade e pH ótimo destas enzimas são propriedades de importância particular (BAJPAI, 1997), indicando a necessidade de aprofundar os estudos.

Gráfico 3 - Atividade de xilanase em sobrenadantes de cultivo dos isolados selecionados



Fonte: Os autores.

De acordo com as análises prévias, a partir das enzimas produzidas (amilase, pectinase e xilanase), estas apresentam potenciais de utilização em alguns processos, tais como, na produção de pão, ração animal, liquefação e sacarificação do amido ou utilização em detergentes (BECKER; BARATTO; GELINSKI, 2009; PANDEY *et al.*, 2000). Entretanto, é necessária a identificação completa destes isolados, assim como a otimização das condições de cultivo para a purificação de cada enzima. Entre as características enzimáticas que devem ser analisadas são, quanto a sua funcionalidade, estabilidade e quanto alguns aspectos bioquímicos, assim como as melhores condições reacionais em diferentes faixas de pH e de temperatura, com a finalidade de, a partir destes parâmetros, inferir as reais potencialidades de sua aplicação biotecnológica (POLIZELLI *et al.*, 2005).

4 CONCLUSÃO

As técnicas de isolamento, assim como, as fontes das amostras de microrganismos mostraram-se efetivas para a obtenção de microrganismos produtores das respectivas enzimas, amilases, pectinases, xilanases, de forma que, foram isolados 18 microrganismos amilolíticos, 4 pectinolíticos e 13 xilanolíticos, a partir de amostras de solo e fontes agroindustriais da região do meio Oeste catarinense. As técnicas de determinação do índice enzimático e de regulação de amilase, frente ao repressor catabólico, mostraram-se importantes formas de direcionar a pesquisa aos isolados mais promissores para a produção da enzima. Os isolados obtidos, apesar de apresentarem bons resultados, precisam ser analisados mais detalhadamente. Por esse motivo, as enzimas desses microrganismos pré-selecionados serão futuramente purificadas e caracterizadas quanto a diversas propriedades bioquímicas, de modo a determinar suas formas mais prováveis de aplicações em processos biotecnológicos.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina – FAPESC (Contrato nº 6404/2011-1), pelo suporte financeiro, à Unoesc, e ao Governo do Estado de Santa Catarina pela bolsa de iniciação científica Art. 170 e ao CNPq pela bolsa PIBIC.

REFERÊNCIAS

- ALBERSHEIN, P. Pectin lyase from fungi. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 628-631, 1996.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Advance in applied Microbiology*. vol. 43, p. 141-194, 1997.
- BECKER, N. B.; BARATTO, C. M.; GELINSKI, J. M. L. N. Propriedades das enzimas α -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma. **Evidência**. v. 9, n. 1-2, p. 67-82, 2009.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.
- BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains . *Process Biochemistry*. 37(5), n. 20, p. 497-503, 2001.
- BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia** – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, 506p.
- BULÉON, A. Starch granules: structure and biosintesis. **Internacional journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.
- DE GREGORIO, A.; MANDALANI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; Lo CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresour Technology**, v. 83, n. 2, p.89-94, 2002.
- DEMAIN, A.L.; DAVIES, J. E. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Second Edition, ASM Press, Washington, D.C.,1999, 830p.
- FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista eletrônica de Farmácia**. v. IV (1), p. 43-51, 2007.
- FREITAS, R. F.; PICOLI, S. U. **A coloração de Gram e as variações na sua execução**. Centro Universitário de Feevale – Laboratório de Biomedicina. *News Lab*, Ed. 2007, p.82.
- GUERREIRO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. **Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados a micologia**, Ed. Universidade/ UFRGS, 1996.
- GUPTA, R. ; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HALTRICH, DIETMAR; NIDETZKY, BERND; KULBE, KLAUS D.; STEINER, WALTER; ŽUPANČIČ, SILVIA. Production of fungal xylanases. **Biores. Technol.**, v.58, n. 2, p.137-161, 1996.

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycological Society of America**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

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

LIMA, U. A.; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. ; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001, 593 p.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006.133p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MALLER, A. **Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

MILAGRES, A. M. F.; MAGALHAES, P.O.; FERRAZ, A. Purification and propeerts of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, n.2, p. 267-272, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.

MONTEIRO, V.N.; ULHOA, C.J. Biochemical Characterization of a β -1,3 Glucanase from *Trichoderma koningii* Induced by Cell Wall of *Rhizoctonia solani*. **Current Microbiology**. v. 52, p. 92-99, 2006.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Performance of pectolytic enzymes during hydrolysis of pectic substances under assay conditions: a statistical approach. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, n. 1-2, p. 116-124, 1999.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. **Microbiol. Res.** v.159(3), p. 305-3014, 2004.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. ; SOCCOL, V.T. ; SINGH, D. ; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 31, p. 135-152, 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760p.

POLIZELLI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** (Mini Review), v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2. ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido.** 2005. 178p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

UENOJO, M. **Produção e caracterização de aromas de frutas por microrganismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais.** 2003, Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2003.

UENOJO, M; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VIIKARI, L.; KANTELINEM, A.; SUN QUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: from idea to the industry. **FEMS Microbial Rev.**; Amsterdam, v. 13, p. 335-350, 1994.

Recebido em 17 de abril de 2012

Aceito em 19 de maio de 2012