

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS QUANTO A PRODUÇÃO DE
POLIGALACTURONASE**

ANA PAULA FERNANDES¹, SARA MARIA CHALFOUN²

RESUMO

A utilização de enzimas em processos industriais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, especialmente nas indústrias de alimentos e bebidas. Entre essas enzimas, destacam-se as enzimas pectinolíticas ou pectinases, que atuam sobre as substâncias pécnicas. As enzimas pectinolíticas são produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras, nematóides, insetos e plantas. O estudo das pectinases tem sido considerado de grande importância, em razão da aplicação nas indústrias que processam matéria-prima vegetal, para remoção de substâncias pécnicas, as quais inviabilizam o produto desejado e também quanto a sua produção por microrganismos visando o aproveitamento de resíduos agro-industriais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de fungos filamentosos quanto à produção de poligalacturonases. O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do EcoCentro/EPAMIG, situado no Campus da Universidade Federal de Lavras. As colônias puras dos fungos foram cultivadas em placas de Petri, contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura MEA e mantidas durante cinco dias em BOD 25°C. Após este período, as colônias foram repicadas para o centro da placa de Petri contendo meio de cultura específico para a detecção da produção de poligalacturonase, com 3 repetições. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado. Dentre os fungos testados todos produziram a enzima poligalacturonase, porém apenas duas espécies podem ser consideradas como potenciais enzimáticos, pois atingiram o índice enzimático de referência.

Palavras-chave: microrganismos, enzimas, poligalacturonases, índice enzimático.

INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em processos industriais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, especialmente nas indústrias de alimentos. Entre essas enzimas, destacam-se as enzimas pectinolíticas ou pectinases, que atuam sobre as substâncias pécnicas, que fazem parte da composição da parede celular dos vegetais, provocando a sua despolimerização e desesterificação. A produção de pectinases pode ser feita em meios que contem uma fonte indutora de atividade enzimática (pectina), os testes quanto à produção de pectinases podem ser realizados em meio sólido ou líquido (FONTANA, 2009).

As enzimas pectinolíticas são produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras, plantas (GAINVORS et al., 1994; TSUYUMU et al., 1989), nematóides e insetos (PILNIK & ROMBOUTS, 1981). 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).

Pectinases correspondem a um grupo que atuam sobre as substâncias pécnicas através de reações de hidrólise e de trans-eliminação, provocando a despolimerização das moléculas, e através de reações de desesterificação, hidrolisando a ligação éster entre os grupos carboxila e metil das pectinas (KASHYAP et al. 2001). Podem ser classificadas em pectinesterase e despolimerase, sendo que esta última é subdividida em hidrolases e liases.

As poligalacturonases são hidrolases que atuam mais em pectato que em pectina e resultam em mono ou dissacarídeos. Quanto aos mecanismos de ação sobre o substrato, essas enzimas são

¹ Doutoranda em Ciência dos Alimentos, DCA/ UFLA, anynhafbio04@yahoo.com.br

² Pesquisadora Dr^a da Empresa de Pesquisas Agropecuária de Minas Gerais, Lavras, chalfoun@ufla.br

classificadas em dois grupos: endopoligalacturonase, que promovem a hidrólise ao acaso da cadeia de pectato (endo-PG, E.C.3.2.1.15), e exopoligalacturonase, que hidrolisam a cadeia de pectato a partir da extremidade não redutora (exo-PG, E.C.3.2.1.67) (SAKAI et al., 1993), KASHYAP et al., 2001).

O estudo das pectinases tem sido considerado de grande importância, em razão da aplicação nas indústrias que processam matéria-prima vegetal, para remoção de substâncias pécticas, as quais inviabilizam o produto desejado (GHILDYAL et al., 1981; WHITAKER, 1984) e também visando a sua produção por microrganismos utilizando como substrato resíduos agro-industriais. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de fungos filamentosos quanto à produção de poligalacturonases em meio de cultura sólido.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do EcoCentro/EPAMIG, situado no Campus da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Foram utilizados 35 isolados fúngicos, estes foram cedidos pela Micoteca da EPAMIG.

As colônias puras dos fungos foram cultivadas em placas de Petri, contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura MEA (20 g de extrato de malte, 1 g de peptona bacteriológica, 20 g de glicose, 20 g de ágar e 1L de água destilada), durante cinco dias em BOD 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Após este período, as colônias foram repicadas para o centro da placa de Petri contendo meio de cultura específico para a detecção da produção de poligalacturonase, com 3 repetições. Foi utilizado meio de cultura de acordo com a metodologia proposta por HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) utilizando pH 5,0. Em seguida as placas de Petri foram incubadas em BOD 25°C por cinco dias. Após este período foram feitas medições do diâmetro da colônia. 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 E ANAGNOSTAKIS, 1975). O índice de atividade enzimática (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2000). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação do potencial de produção de poligalacturonase foram testados 35 isolados, cujos resultados referentes aos potenciais de produção da enzima encontram-se apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 Produção de poligalacturonase por fungos filamentosos avaliados pelo índice enzimático (IE)

Código	Espécie	IE
00040	<i>Fusarium sp.</i>	3,42a*
00029	<i>Penicillium crustosum</i>	2,25b*
00015	<i>Aspergillus versicolor</i>	1,68c
00022	<i>Paecilomyces sp.</i>	1,45c
00017	<i>Curvularia sp.</i>	1,27c
00016	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,19c
00037	<i>Pestalotia sp.</i>	1,09c
00011	<i>A. ochraceus</i>	1,05c
00036	<i>P. verrucosum</i>	1,04c

...(Cont.)...

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

TABELA 1, Cont.

00031	<i>P. glandicola</i>	1,04c
00012	<i>A. sclerotiorum</i>	1,03c
00001	<i>A. auricomus</i>	1,03c
00010	<i>A. niger agregados</i>	1,01c
00005	<i>A. flavus</i>	1,00c
00013	<i>A. sulphureus</i>	1,00c
00006	<i>A. foetidus</i>	1,00c
00004	<i>A. dimorphicus</i>	1,00c
00003	<i>A. clavatus strict sensu</i>	1,00c
00009	<i>A. niger</i>	1,00c
00008	<i>A. melleus</i>	1,00c
00007	<i>A. lanosus</i>	1,00c
00014	<i>A. tamarii</i>	1,00c
00033	<i>P. roqueforti</i>	1,00c
00032	<i>P. italicum</i>	1,00c
00030	<i>P. expansum</i>	1,00c
00039	<i>Talaromyces sp.</i>	1,00c
00035	<i>Penicillium sp.</i>	1,00c
00034	<i>P. solitum</i>	1,00c
00023	<i>P. aurantiogriseum</i>	1,00c
00021	<i>F. verticillioides</i>	1,00c
00018	<i>Epiccocum sp.</i>	1,00c
00027	<i>P. commune</i>	1,00c
00026	<i>P. citrinum</i>	1,00c
00025	<i>P. chrysogenum</i>	1,00c
00002	<i>A. carbonarius</i>	1,00c

**CV(%)=29,82

* Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

** CV= coeficiente de variação mede a dispersão dos dados em relação a média aritmética, quanto menor melhor é a precisão dos dados.

Conforme resultados da Tabela 1, pode-se observar que os fungos apresentaram variação quanto à produção da enzima, sendo que, destacaram-se os fungos *Fusarium* sp. (00040) IE = 3,42 e *Penicillium crustosum* (00029) IE = 2,25. Os demais fungos testados não atingiram o índice enzimático (IE) igual ou superior a 2,00, estes fungos podem ser considerados como produtores da enzima, porém não podem ser considerados produtores potenciais da enzima poligalacturonase.

Teixeira (1994) avaliou a produção qualitativa de pectinases, amilases, celulasas e proteases por diferentes espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia. A autora constatou que os maiores halos de atividade enzimática foram produzidos pelas espécies de *Aspergillus niger* para as enzimas pectinases, amilases, celulasas enquanto *A. flavus*, *A. zonatus*, *A. oryzae* e *A. sydowii* para protease. Neste trabalho não foi utilizado o índice enzimático $\geq 2,00$ como padrão e sim o tamanho do halo formado na colônia.

Terra (2008) constatou a atividade potencial de poligalacturonase em cinco isolados, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* sp. sendo que a espécie *P. sclerotiorum* apresentou o maior índice enzimático.

CONCLUSÃO

Dentre os fungos testados todos produziram a enzima poligalacturonase, porém apenas duas espécies podem ser consideradas como potenciais produtores enzimáticos, pois atingiram o índice enzimático de referência.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C.; Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochem.** 2001, v. 37, n. 5, p. 497- 503, 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para a análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Anais...** São Carlos: Universidade de São Carlos, 2000. p. 255-258.

FONTANA, R. C. **Estudo da produção de poligalacturonase em processo submerso em biorreatores de agitação mecânica e airlift.** 2009. 155p. (Tese na área de concentração em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, n. 10, p. 1311-1319, 1994.

GHILDYAL, N.P.; RMARKKRISHNA, S.V.; DEVI, P. N.; LOSANE, B. K.; ASTHANA, H. N. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. **Journal Food Science Technology**, Lansing, v.18, p.248-251, 1981.

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

KASHYAP, D. R. ; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**. v.77, n. 2, p. 215-227, 2001.

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F. M. Pectic enzymes. In: Birch, g. C.; Blakebrough, N.; Parker, k. J. Enzymes and Food processing. **Appl. Science**. London. P. 105-128, 1981.

SAKAI, T. et al. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied microbiology**, v. 39, n. 2, p. 213-294, 1993.

TEIXEIRA, M. F. S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos.** 1994. 85p. (Dissertação na área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus.

TERRA, M. F. **Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de cavernas da caatinga brasileira.** 2008. 60p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TSUYUMU, S., ISHII, S.; NAKAMURA, M. Plate assay for differentiation of different pectinases. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, n. 9, p. 2509-2511, 1989.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and formation in fruit juices. **Enzyme Microbial Technology**, Washington, v. 6, p. 341-349, 1984.