

OBTENÇÃO DE LACTASE A PARTIR DE FUNGOS ASSOCIADOS A CAULES E FOLHAS DE MANDIOCA

Gabriela Reche Sorbile¹, Andreia de Araújo Morandim-Giannetti¹
^{1,3} Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI
gabi.sorbile@gmail.com e preamorandim@fei.edu.br

Resumo: Estudos relacionados a novas fontes de enzimas têm crescido significativamente sendo, a avaliação da produção dessas enzimas por fungos associados a diversas espécies vegetais uma alternativa. Assim, neste trabalho, foram realizados testes em 14 espécies de fungos encontrados na mandioca. Para cada fungo foi obtido o extrato enzimático e, este, avaliado com relação a presença de lactase sendo verificado maior potencial pelo fungo CA12 (*Diaporthe caatingaensis*).

1. Introdução

Atualmente, muitas pesquisas têm sido realizadas na busca de novas fontes para obtenção de enzimas, primordial em setores industriais como o de alimentos, fármacos, sabões e detergentes, entre outros. Neste contexto, os fungos endofíticos, que são bons produtores de substâncias bioativas, como as enzimas, têm despertado a atenção de pesquisadores, principalmente os associados a resíduos agroindustriais, abundantes no Brasil [1].

Enzimas, por sua vez, são proteínas que atuam na catálise biológica de reações químicas com elevada especificidade, cujo poder catalítico muitas vezes supera os catalisadores sintéticos aplicados em processos. São encontradas na natureza em misturas complexas e podem ser separadas em seis classes distintas.

A lactase, pertencente à classe das hidrolases, é a enzima responsável pela hidrólise da lactose (açúcar do leite), quebrando-a em glicose e galactose [2]. A deficiência da produção desta enzima pelo organismo dificulta a digestão do açúcar do leite e causa a chamada intolerância à lactose, reportada em cerca de 70% da população mundial.

Neste contexto, a busca por processos que reduzam os problemas associados à ingestão de leite e derivados vem crescendo significativamente. Um exemplo é a aplicação de lactase na manipulação de leite e derivados ou a própria co-ingestão desses complexos enzimáticos [3]. Contudo, a aplicação industrial da lactase extrapola a questão da intolerância à lactose: a quebra deste açúcar traz diversos outros benefícios, como a melhora de características físicas de leite e derivados, como o sabor e a cor; incorporação de maior cremosidade aos produtos e a diminuição do tempo de maturação de queijos [4].

A lactase é obtida a partir de microrganismos como fungos, bactérias e leveduras. A produção de lactase por fungos está relacionada ao meio de cultivo e suas condições. O tipo de fonte de carbono, a quantidade de sais e de nitrogênio, o pH, a temperatura e o tempo são alguns dos fatores essenciais para otimizar e suplementar a síntese da enzima nos organismos [5]. Ademais, para a

obtenção e aplicação do produto enzimático, é necessária uma extensa variedade de procedimentos e técnicas de separação, extração e purificação da enzima.

Assim, justifica-se o desenvolvimento do presente trabalho, que visa a indução da produção de lactase por fungos associados a caules e folhas de mandioca, bem como a determinação das condições ideais de crescimento dos fungos visando a potencialização na produção dessa enzima.

2. Materiais e Métodos

Durante o desenvolvimento do presente trabalho estão sendo utilizados para a obtenção da lactase, fungos endofíticos isolados de caules e folhas de mandioca, mantidos a 4°C no Centro Universitário da FEI.

No tocante ao método de avaliação qualitativa da produção de lactase, inicialmente, os fungos foram cultivados em meio batata dextrose agar (BDA) e submetidos a três repiques para ativação do sistema enzimático. Após essa etapa, foram submetidos a um novo repique, porém, utilizando-se um meio composto por BDA suplementado com 0,5 % de lactose e 0,1% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo a 28°C [6]. Após o crescimento dos fungos, o reagente orto-nitro-fenil- β -galactopiranosídeo foi adicionado aos mesmos, e os que mostraram coloração azul foram novamente repicados em meio BDA e submetidos à verificação quantitativa da produção de lactase.

Com relação ao método quantitativo, inicialmente foi realizada a extração enzimática. Para isso, foi realizada a trituração dos fungos na presença de nitrogênio líquido, seguida pela adição de polivilpolipirrolidona (PVPP) e, adição de tampão acetato pH 4,8. Após a obtenção do extrato, o meio foi filtrado utilizando-se gaze e centrifugado a 6000 rpm durante 40 min. Todos os extratos foram avaliados para a determinação da atividade enzimática em duplicata.

Durante a etapa de avaliação da produção de lactases pelos fungos, foi utilizada a metodologia descrita no Food Chemicals Codex e aplicada em trabalhos realizados por Gao e colaboradores (2019) bem como Talbert e Hotchkiss (2012). Assim, 0,10 mL de cada extrato enzimático com concentração total de proteínas previamente definido foram misturados com 0,900 mL de uma solução de orto-nitro-fenil- β -galactopiranosídeo 0,4 % preparada em tampão acetato 0,1 mol/L pH 4 e, a mistura será aquecida a 50°C, sob agitação, durante 15 min. Para a construção da curva de calibração foi utilizado como reagente o o-nitrofenol em diferentes concentrações [6]. Após essa etapa, 0,5 mL de uma solução de carbonato de sódio 10 % e, 1,75 mL de água foram adicionados a mistura sendo, posteriormente,

verificada a absorvância em 420 nm. Como branco foi utilizada uma mistura de orto-nitro-fenil- β -galactopiranosídeo, água e, a solução de carbonato de sódio. A atividade enzimática foi calculada levando-se em consideração a formação do produto por quantidade de proteína presente ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) [7;8].

3. Resultados e Discussões

Inicialmente foi realizado o crescimento dos fungos isolados e identificado durante o desenvolvimento do projeto FAPESP 2015/19273-2 em meio BDA (Tabela 1). Posteriormente, foi realizada a avaliação da atividade de lactase de duas maneiras: qualitativa, por meio de imagens, e quantitativa, por meio de cálculos e gráficos.

Tabela 1 – Fungos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho

Fungo	Identificação
<i>Microdochium lycopodium</i>	CA1
<i>Colletotrichum</i> sp.	CA2
<i>Cladosporium</i> sp.	CA3
<i>Alternaria</i> sp.	CA5
<i>Phomopsis</i> sp.	CA7
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	CA8
<i>Diaporthe endophytica</i>	CA9
<i>Vouchered mycorrhizae</i>	CA10
<i>Phanerochaete australis</i>	CA11
<i>Diaporthe caatingaensis</i>	CA12
<i>Stenocarpella maydis</i>	CA13
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	CA14
<i>Sordariomycetes</i> sp.	CA15
<i>Phanerochaetaceae</i> sp.	CA17

Dessa forma, durante a avaliação qualitativa, foi adicionado o reagente orto-nitro-fenil- β -galactopiranosídeo ao cultivo dos fungos, e observou-se a formação de halos azulados em volta dos fungos que produziram a enzima de interesse, evidenciados com círculos vermelhos na figura 1 em que é possível observar que as espécies intituladas CA7, CA8, CA9, CA11, CA12, CA13, CA15 e CA17 mostraram o acúmulo de lactase. Também é possível verificar que as espécies CA9, CA12 e CA17 foram as maiores produtoras da enzima no método qualitativo.

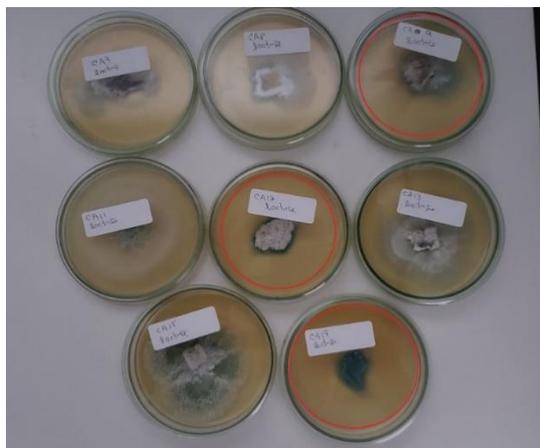


Figura 1 - Espécies com maior produção de lactase destacadas em vermelho.

Já, durante a análise quantitativa, foram realizadas medições da absorvância dos extratos enzimáticos e de

seus respectivos brancos. Com uma curva de calibração construída previamente, foram calculadas as concentrações da enzima produzidas por cada espécie. O resultado pode ser observado na figura 2 em que é possível observar maior produção de lactase pelo fungo CA12, corroborando com os dados qualitativos obtidos.

Dessa forma, durante a continuidade do presente trabalho, pretende-se modificar o meio de crescimento dos fungos visando aumentar a produção da enzima de interesse.

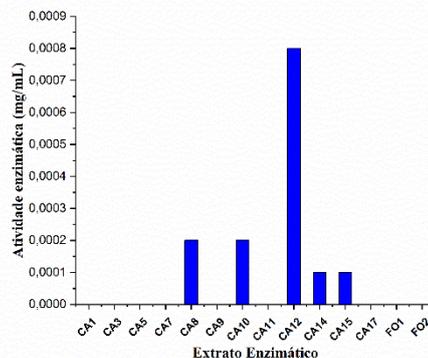


Figura 2 - Comparação da concentração da enzima lactase em cada espécie

4. Conclusões

Após a análise dos resultados obtidos até o momento, pode-se concluir que o fungo que mostrou maior potencial para produção de lactase foi o fungo CA12. Dessa forma, durante a próxima etapa do presente trabalho, serão realizadas modificações do meio de crescimento do mesmo buscando aumentar a produção da enzima de interesse visando aplicação futura em processos biotecnológicos.

5. Referências

- [1] Chapla, V.M.; Biasetto, C.R.; Araujo, A.R. Revista Virtual de Química, **5** (2012) 421-437.
- [2] Nielsen, S.D. et al. International Dairy Journal, **78** (2018) 159-168.
- [3] CHANALIA, P. et al. Bioorganic Chemistry, **77** (2018) 176-189.
- [4] Santiago, P.A. et al. Ciência, Tecnologia e Alimentação, **24** (2004) 567 - 572.
- [5] Viana, C. S. Dissertação (Mestrado) - Ciências e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade do Norte do Paraná, Londrina, 2017.
- [6] ELSAYED, E.A. et al. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, **20** (2019) 101231.
- [7] TALBERT, J.N.; HOTCHKISS, J.H. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **78** (2012) 78- 84.
- [8] TRAFFANO-SCHIFFO. M.V. et al. Food Research International, **100** (2017) 296-303.

Agradecimentos

À instituição Centro Universitário FEI pela bolsa concedida e financiamento do presente trabalho.

¹ Aluno de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 31/07/20 até 30/11/20.