

Isolamento de micro-organismos produtores de transglutaminase com características de interesse para aplicação na indústria de alimentos

Luhara F. Ascioni¹; Hélia H. Sato²

Resumo

A transglutaminase é uma enzima capaz de catalisar a transferência de grupos acil formando ligações intra e intermoleculares entre proteínas, peptídeos e amins primárias. A transglutaminase é utilizada nas indústrias de processamento de alimentos para a reestruturação de aparas de carne, desenvolvimento de novos produtos protéicos e modificações de suas características. Entre os 84 actinomicetos isolados, as linhagens B3 e B6 apresentaram maior produção de transglutaminase (1,918 U/mL e 2,956 U/mL), respectivamente. Foi estudada a produção da enzima pela linhagem B6 em diferentes meios de cultivo.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar novas linhagens de bactérias filamentosas do gênero Actinomicetos, com a capacidade de produzir transglutaminase extracelular para aplicação em processos industriais. A bactéria maior produtora de transglutaminase foi utilizada para o estudo do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais na produção da enzima, em frascos agitados.

Material e Métodos

Coletas das amostras

As amostras de solo foram coletadas nas proximidades de lavouras, terrenos baldios e de rios e lagos nas regiões dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Ceará. As amostras coletadas foram armazenadas sob-refrigeração à 4°C até a sua utilização.

Isolamento de bactérias filamentosas do gênero Actinomicetos

As amostras de cerca de 2,0 g de solo foram transferidas para placas de Petri e incubadas em estufa a 40°C por 6 horas. Em seguida foram maceradas e misturadas com 2,0 g de carbonato de cálcio. Posteriormente, foram incubadas em estufas por 7 dias a 30°C e em seguida transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada estéril. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 180 rpm, 30°C por 60 minutos. As suspensões foram diluídas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e alíquotas de 200 µL foram transferidas para placas de Petri contendo meio Agar amido. As placas foram incubadas a 30°C e 40°C por 3 dias. As colônias apresentando características do gênero actinomicetos, foram transferidas para placas de Petri contendo Agar extrato de malte-extrato de levedura e novamente incubadas a 30°C e 40°C por 7 dias. Os micro-organismos foram reisolados até a obtenção de culturas puras.

As bactérias isoladas foram cultivadas em placas de Petri contendo Agar extrato de malte-extrato de levedura e cilindros do meio de cultivo de 0,6 cm de diâmetro recobertos com a cultura foram preservados em criotubos contendo uma solução de glicerol 20% a -80°C.

Produção de transglutaminase por fermentação dos micro-organismos em frascos de Erlenmeyer agitados

Para a seleção das linhagens produtoras de transglutaminase, os micro-organismos foram inoculados em placas de Petri contendo Agar extrato de malte-extrato de levedura, e incubados por 6 dias à 30°C e 40°C em estufa. Para a inoculação, 6 cilindros de 0,6 cm de diâmetro do meio de cultura das placas de petri recobertos com o micro-organismo foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo composto de 1% de peptona, 2,5% de farelo de soja, 2% de amido de batata, 0,1% de glicose, 0,2% de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (m/v) e 0,4% $KH_2PO_4 \cdot 7 H_2O$. Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm. Em intervalos pré-determinados, alíquotas de 2,0 mL do meio foram coletadas para a determinação da atividade de transglutaminase.

Determinação da atividade de transglutaminase

A atividade de transglutaminase foi determinada no sobrenadante das culturas utilizando-se o substrato N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (CBZ-glutaminil-glicina) (Grossowicz et al. 1950 e Folk & Cole, 1966).

Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais na produção de transglutaminase em frascos Erlenmeyer agitados

Os efeitos das fontes de carbono, nitrogênio e sais no meio de cultivo foram investigados com intuito de promover o aumento da atividade de transglutaminase pelo micro-organismo selecionado. Foram analisadas diversas fontes de nitrogênio, carbono e sais. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Resultados e Discussão

Isolamento e seleção de linhagens produtoras de transglutaminase por fermentação em frascos Erlenmeyer agitados

Dentre as 84 linhagens de bactérias formadoras de colônias características do gênero Actinomicetos, de amostras de solo, coletadas no Estado de São Paulo, Minas Gerais e Ceará, as linhagens B3 e B6 se destacaram pela maior produção de transglutaminase (1,918 U/mL e 2,916 U/mL), respectivamente após 72 horas de incubação. A linhagem B6 foi escolhida para a próxima etapa do trabalho devido a sua maior produção da enzima em relação à linhagem B3.

Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais na produção de transglutaminase pela linhagem B6 em frascos Erlenmeyer agitados.

Foi obtido maior atividade de transglutaminase (2,78U/mL) usando a mistura de 2% de amido de batata e 0,1% de glicose como fonte de carbono (Figura 1) e peptona bacteriológica 1% + peptona de caseína 1% como fonte de nitrogênio (Figura 2). A Figura 3 mostra que a adição de sais no meio de cultivo não aumentou a atividade de transglutaminase.

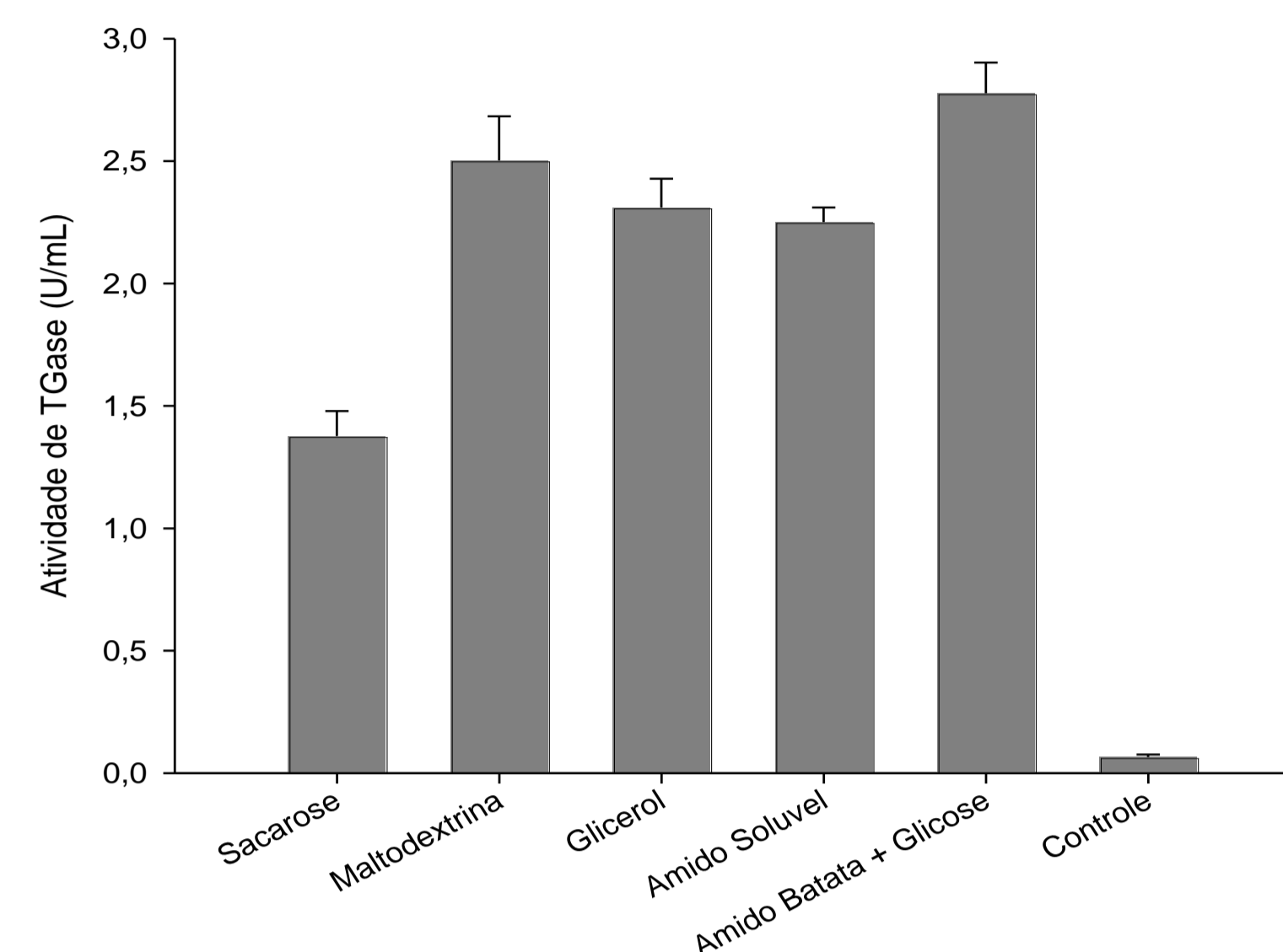


Figura 1- Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de transglutaminase pela linhagem B6

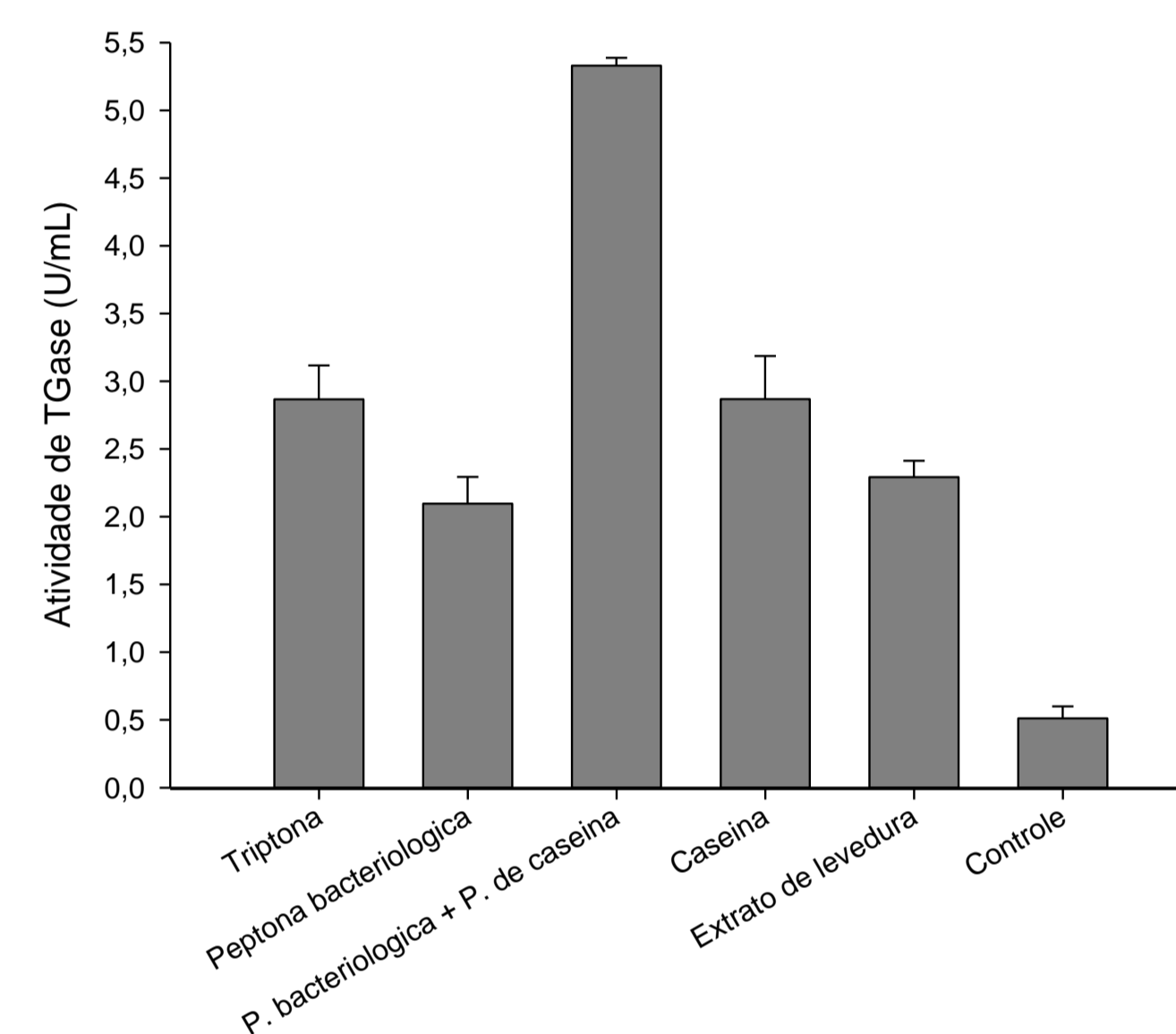


Figura 2 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de transglutaminase pela linhagem B6.

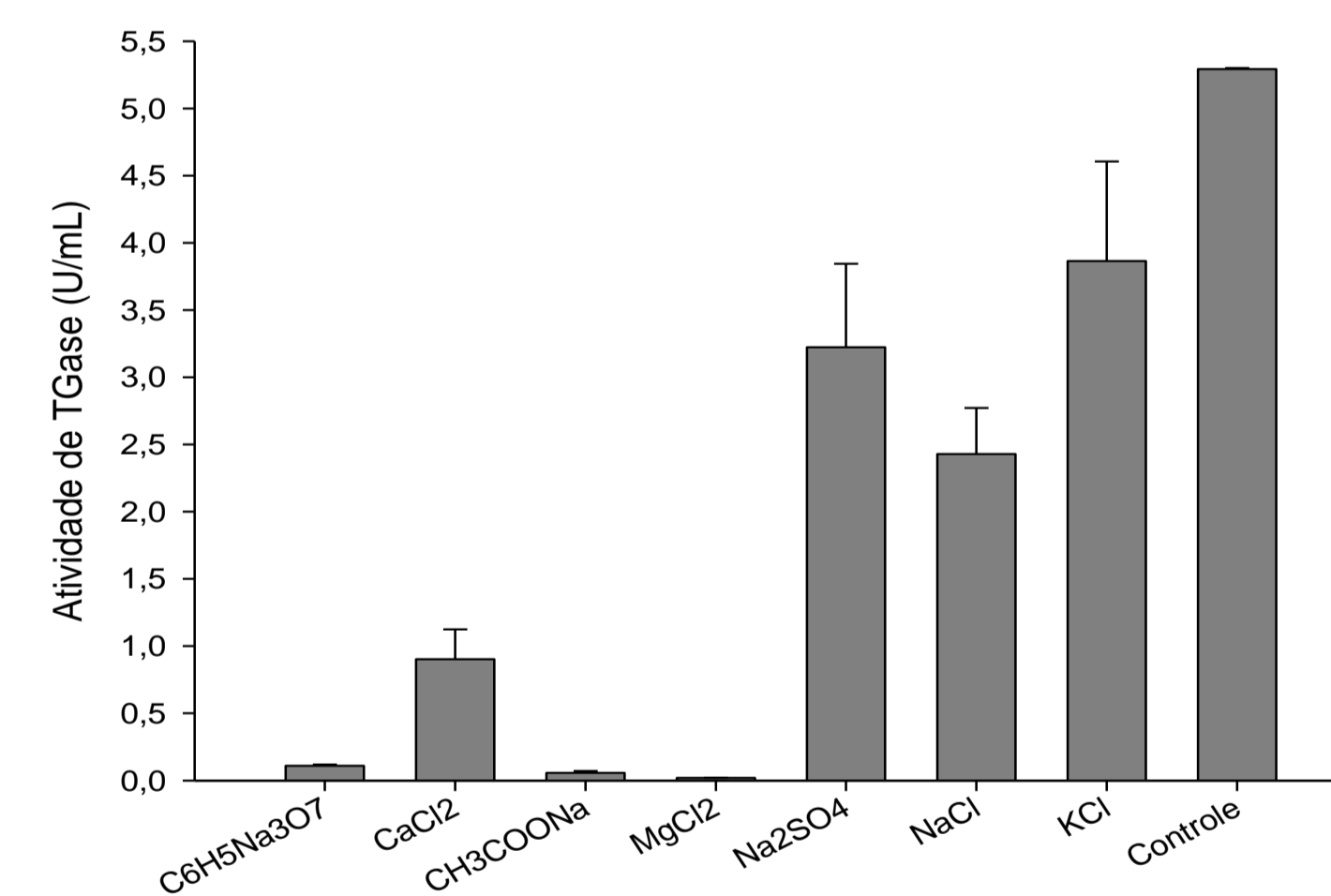


Figura 3 - Efeito de diferentes sais na produção de transglutaminase pela linhagem B6.

Conclusões

Entre as 84 linhagens de bactérias do gênero Actinomicetos isoladas foram selecionadas as linhagens B3 e B6 que produziram 1,918 U/mL e 2,916 U/mL de transglutaminase, após 3 dias de fermentação a 30°C, em frascos Erlenmeyer.

O estudo do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais no meio de cultivo permitiu o aumento de cerca 83% na produção da enzima, sendo obtido 5,331 U/mL, em relação à atividade inicial de transglutaminase (2,916 U/mL). Foi obtido maior produção de transglutaminase no meio de cultura composto de 1% (m/v) de peptona bacteriológica; 1% (m/v) de peptona de caseína; 2,5% (m/v); farelo de soja; 2% (m/v) de amido de batata; 0,1% (m/v) de glicose; 0,2% (m/v) de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e 0,4% (m/v) de $KH_2PO_4 \cdot 7 H_2O$.

Agradecimentos

Ao SAE, pela bolsa concedida; ao Laboratório de Bioquímica pelo espaço e equipamentos utilizados, a toda equipe de laboratório envolvida e a minha orientadora Hélia Harumi Sato pelo conhecimento compartilhado.

1. Bolsista SAE: Luhara Ferreira Ascioni, Graduação em Eng. De Alimentos, Unicamp, Campinas-SP
luharaascioni@fea.unicamp.br
2. Orientadora: Pesquisadora, Hélia Harumi Sato, Laboratório de Bioquímica de Alimentos - FEA, Unicamp, Campinas-SP
heliah@fea.unicamp.br