

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS LEVEDURIFORMES ISOLADOS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU

Emília Carolina da Cruz Lisboa¹; Maria Gabriela Bello Koblitz²; Marcelle dos Santos Silva³.

1. Bolsista PROBIC, Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: emilia_lisboa@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, e-mail: mkoblitz@gmail.com
3. Participante do projeto, Mestranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana.

PALAVRAS-CHAVE: alimentos, “Cup Plate”, micro-organismos.

INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente requisitadas. Além de serem muito ativas e versáteis, elas executam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. Outra vantagem na utilização de enzimas é a facilidade em se regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação ou alterar o pH. Além disso, toda enzima catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (Dziezak, 1991; Patel, 2002; Pizarro & Park, 2003 apud GONÇALVES, 2007).

As enzimas possuem destacado papel no setor alimentício, pois podem influir na composição, processamento e deterioração dos alimentos. A fermentação do cacau é um processo fermentativo onde os micro-organismos atuam diretamente sendo que a fermentação da polpa não afeta diretamente a amêndoa. A morte do embrião resulta apenas do desenvolvimento das leveduras que quando chegam à fase estacionária morrem e ocorre a autólise da célula, o que fornece as enzimas necessárias para obtenção final do sabor de chocolate (LEVANON et al, 2001). A diversidade e potencialidade dessas leveduras foram ainda pouco investigadas e podem, possivelmente, apresentar a produção de enzimas com aplicabilidade industrial. As pesquisas que envolvem o estudo e a produção de enzimas com potencial industrial são importantes, em virtude da constante busca por produtos novos, diversificados e facilmente acessíveis para um mercado exigente (MOLINA *et al.*, 2001 apud LIMA, 2006).

Dentre as enzimas de importância industrial, produzidas por fungos leveduriformes, e de interesse na área de alimentos, seriam abordadas neste trabalho as proteases as lipases e as pectinases, mas por dificuldades na obtenção do substrato específico para testar as lipases os testes para esta enzima não foram feitos, com isso so foram realizados os testes para proteases e pectinases.

As Proteases são hidrolases classificadas de acordo com seu modo de ação e natureza química do seu sitio catalítico. É o grupo de enzimas com maior aplicação nas indústrias de alimentos, possuindo papel fundamental na clarificação de cervejas, na produção e na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na fabricação de adoçantes artificiais, como o aspartame (KOBLOITZ, 2008). Os micro-organismos são responsáveis por grande parte da produção das proteases utilizadas industrialmente (GIONGO, 2006).

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

As enzimas pectinolíticas ou pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécicas. Podem ser produzidas, em diferentes combinações, por plantas e por micro-organismos como fungos, leveduras e bactérias. As pectinases microbianas respondem por 25% das vendas de enzimas para alimentos (SILVA, 2003). Enzimas pectinolíticas são amplamente utilizadas no setor de alimentos, no processamento de polpa de frutas e outras estruturas vegetais, na clarificação de sucos de frutas e de vinhos para melhorar a aparência e aumentar o rendimento, isolamento de óleos essenciais e pigmentos de cítricos. O objetivo do presente estudo foi investigar a produção de enzimas extracelulares por leveduras pertencentes à CCMB (Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia) provenientes fermentação de cacau pelo método de 'Cup Plate', os testes foram realizados para pectinases e proteases.

MATERIAL E METODOS

OS MICRO-ORGANISMOS

Foram testados 73 isolados de fungos leveduriformes obtidos de coletas realizadas em fazendas dos municípios de Ilhéus e Una, na região sul do Estado da Bahia. Esses foram repicados para placas de Petri contendo o meio de cultura Agar Sabourand e mantidos a 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), em incubadora tipo BOD, durante vinte e quatro horas, para realização dos testes.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os testes foram realizados segundo o método de "cup plate" (DINGLE; REID; SOLOMONS, 1953).

Inicialmente, os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 ml dos meios de indução que contêm o substrato específico com a finalidade de estimular a secreção das enzimas em estudo. Cada isolado foi individualmente testado para secreção de pectinases e proteases.

O meio base para a indução das leveduras era composto de: 1,4g de fosfato de amônio; 0,3g de fosfato dibásico de potássio; 0,06g de cloreto de cálcio; 0,1g de sulfato de magnésio; 0,5mL de solução traços de sais (0,1g de sulfato ferroso; 0,1g de cloreto manganoso; 0,1g de sulfato de zinco em 100 ml de água destilada); e 200 ml de água destilada. A esse meio foram adicionados 1,0g dos substratos de indução, a saber: pectina cítrica (pectinases), gelatina (proteases), tendo o pH do meio ajustado para 7,0.

Retirou-se uma alçada da cultura pura dos isolados e esta foi inoculada através da calibração de um tubo de ensaio contendo solução salina (0,45%), com intuito de padronizar as amostras pela escala McFahrland em um colorímetro. Uma suspensão de células correspondente a 3,0 nesta escala foi transferida para o meio de indução e incubada, em shaker, a 28°C por 2 dias sob rotação de 150 rpm.

Uma alíquota de 1 ml do meio de indução foi centrifugada a 3500 rotações por minuto (RPM) por 20 minutos sob refrigeração (4°C), em seguida foram transferidos 150uL do sobrenadante para placas contendo meio de caracterização, específico para cada enzima, onde foram feitas perfurações circulares ("cup's"), com diâmetro de 6 mm (0,6cm). As placas foram incubadas em B.O.D. a 37°C por 24h. Após este período foi adicionado o revelador (HCL- pectinase) para visualização do resultado. A produção de enzimas se evidenciou pelo surgimento de halo translúcido ao redor do ponto de aplicação. Quanto maior o halo formado, maior a atividade enzimática.

O meio para a caracterização era composto de: 2,0g de ágar puro e 1,0g dos diferentes substratos (pectina cítrica, gelatina e leite em pó), dissolvidos em 100 mL de

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

água destilada, esterilizados e distribuídos em placas de Petri, onde foram feitas perfurações circulares (“cup’s”), com diâmetro de 6 mm (0,6cm). Os meios de caracterização foram calibrados para três valores de pH distintos, 5,0, 7,0 e 9,0. Todos os testes para cada enzima foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 73 fungos leveduriformes, destes 37 (50,68%) apresentaram resultados positivos e 36 (49,32%) apresentaram resultados negativos, entre os positivos temos 17 para pectinase e 25 para protease. Dentre as leveduras testadas, cerca de 34,25% apresentaram resultados positivos para protease onde apenas uma levedura apresentou halo de 2,1cm, no entanto, os melhores resultados em tamanho de halo degradativo foram verificados para a pectinase que dentre 17 leveduras positivas 10 apresentaram halos maiores que 2,0 cm. Os melhores resultados estão descritos na Tabela 1 (abaixo) e as figuras abaixo são imagens representativas da atividade enzimática, Figura 1 para Protease e figura 2 para pectinase, onde é possível observar o halo de degradação, transparente, formado ao redor do ponto de aplicação da enzima.

Este trabalho foram analisados com dois grupos de enzimas, pectinases e proteases, segundo SILVA (2003), podemos obter atividade de pectinases em valores de pHs distintos, dependendo do tipo de pectinase avaliada. A síntese destas enzimas sofre influência dos componentes do meio de cultivo, particularmente da fonte de carbono, pH, temperatura, agitação e tempo de incubação. Estes são fatores determinantes na caracterização da atividade enzimática.

Segundo GIONGO (2006), todas as enzimas são sensíveis a variações da concentração de Hidrogênio iônico do meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Dessa forma as alternâncias na concentração de H⁺ podem mudar a conformação da enzima e sua capacidade de união com o substrato. Neste projeto, ao aumentar a faixa de detecção da enzima variando o pH de estudo nas análises, também ampliamos as possibilidades de se detectar em qual pH atuam as enzimas que foram testadas.

Diversos autores pesquisaram a atividade pectinolítica de leveduras entre eles, SANCHEZ *et al* (1984) apud Oliveira (2009) constatou que algumas linhagens de leveduras isoladas na Costa do Marfim durante a fermentação do cacau degradaram a pectina do meio de cultura.

Tabela 1. Melhores resultados obtidos para as leveduras testadas tamanho do halo (cm)

Leveduras/pH	Substratos					
	Pectina			Leite + Gelatina		
	5,0	7,0	9,0	5,0	7,0	9,0
3,1	---	---	---	1,8	---	---
1	---	1,0	2,8	1,7	---	---
16	---	---	---	2,1	---	---
1,4	---	0,9	---	1,7	---	1,6
6,1	---	---	---	1,2	---	---
1,5	---	---	3,1	---	---	1,2

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

15	---	---	3,1	---	---	1,0
14,1	---	---	2,1	---	---	---
3,2	---	---	1,9	---	---	---
C-1. 30	---	3,1	2,5	---	---	---
C-1. 83/2	---	3,0	3,3	---	---	---
C-2. 85	---	2,6	2,9	---	---	---
C-2. 94	---	3,5	---	---	---	---
C-1. 78	---	3,8	2,0	---	---	---
C-1. 33/2	---	3,0	1,2	---	---	---
C-2. 42	---	---	---	---	1,6	1,3
C-2. 102	---	---	---	---	1,1	1,0
C-2. 45	---	---	---	---	1,0	1,3

Figura 1: Atividade da enzima, Protease

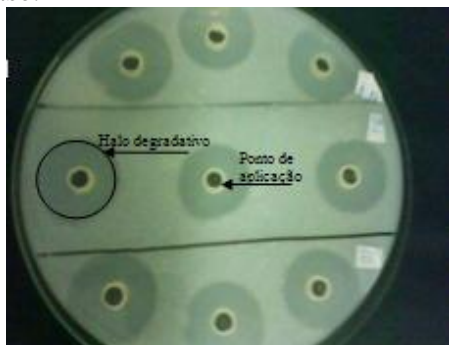
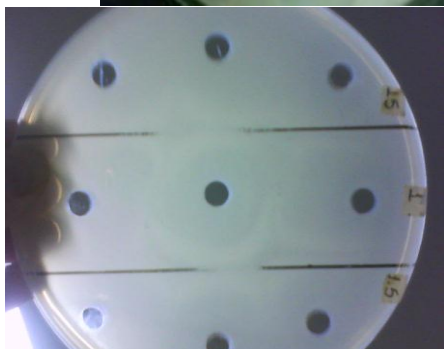


Figura 2: Atividade da enzima, Pectinase



CONCLUSÃO

Com 50,68% dos resultados positivos, podemos considerar que as leveduras testadas secretam quantidades significativas de proteases e pectinases. Foi observado que para pectinase apenas uma levedura apresentou resultado positivo em pH 5,0 para as proteases houve uma variação de resultados positivos em função do pH. Se observarmos a quantidade de leveduras secretoras destas enzimas obtivemos melhores resultados para protease tendo um total de 34,25% positivas já para pectinase obteve-se 23,28% , quando nos referimos ao tamanho do halo degradativo os resultados mais expressivos foram para pectinase, pois de um total de 17 leveduras cerca de 58,82% apresentaram halo maior que 2,0 cm, para protease apenas 4% apresentou halo maior que 2,0cm.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

REFERÊNCIAS

- DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G.L. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the “cup-plate” assay to the estimation of enzymes. *Journal for the Science of Food and Agriculture*, n.4, p.149-155, 1953.
- GIONGO, Janice Luehring. Caracterização e Aplicação de proteases Produzidas por Linhagens de *Bacillus* sp. UFRS, 81p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Microbiologia agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli, 2006.
- GOMES, D. N. F. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal barra das jangadas. Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. 2007. 94f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- GONÇALVES, Flávia Augusta G. Produção de lipase extracelular por levedura em cultivo submerso. UFMG, 67 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Orientador: Prof. Dr. Gecernir Colen, 2007.
- KOBLITZ, M. G. B. (Org.). Bioquímica de alimentos. Teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p., 2008.
- LEVANON, Yehuda; ROSSETINI, Stela Maria Ovinhas. Cacau. In: *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. 1 Ed. Volume 4. Ed. Edgard Blucher Ltd. 387-420, 2001.
- LIMA, Araluce Regina de Souza. Produção de pectinases por *Aspergillus* e Clarificação de suco de Camu-Camu com poligalacturonases e pectinesterases. UFA, Dissertação (Mestrado) – Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. Orientador Prof^a Dr^a Maria Francisca Simas Teixeira, 2006.
- OLIVEIRA, Rodrigo de Queiroz. Bioprospecção de microorganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do semi-arido baiano. Dissertação (Mestrado) Biotecnologia-Universidade Estadual de Feira de Santana, 2007.
- RUEGGER, Marcelo J.S.; TAUKE-TORNISIELO, Sâmia M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, V.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004.
- SILVA, Evânia Geralda. Seleção de leveduras pectinolíticas isoladas de frutas tropicais. 79 p. Dissertação (Mestrado) Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Lavras, 2003.