

INVESTIGAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASES, PECTINASES E LIPASES POR FUNGOS LEVEDURIFORMES ISOLADOS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU

Emília Carolina da Cruz Lisboa¹; Marcielle dos Santos Silva²; Eleni Anjos dos Santos³; Marília Lordêlo Cardoso Silva⁴.

1. Bolsista PROBIC, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: emilia_lisboa@hotmail.com.br;
2. Participante do projeto, Mestre em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. e-mail: marcielles@yahoo.com.br;
3. Participante do projeto, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana. e-mail: ni.anjos@gmail.com;
4. Orientador, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marilialordelo@uefs.br;

PALAVRAS-CHAVE: enzimas, microrganismos, cacau.

INTRODUÇÃO

As enzimas apresentam propriedades que tornam o seu uso altamente desejável como catalisadores. Elas são ativas e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas (Dziezak, 1991; Patel, 2002; Pizarro & Park, 2003). As leveduras, devido às características peculiares como alta capacidade de adaptação às condições do meio, crescimento em meios simples e de maneira satisfatória em pouco tempo, tem sido alvo de inúmeras pesquisas direcionadas à produção de enzimas para aplicação industrial (Lock, 2007). A fermentação do cacau é um processo fermentativo onde as leveduras atuam diretamente e fornecem as enzimas necessárias para obtenção final do sabor de chocolate (Levanon et al, 2001).

Dentre as enzimas de importância industrial, foram abordadas neste trabalho as proteases e lipases e as pectinases. As proteases são hidrolases classificadas de acordo com seu modo de ação e natureza química do seu sítio 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 panificação, dentre outros (Koblitz, 2008). As enzimas pectinolíticas formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécnicas. Podem ser obtidas a partir de vegetais ou porá partir de microrganismos 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 dentre outros. As lipases têm a função natural de catalisar a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. Sendo que as de origem microbiana constituem um grupo de valiosas enzimas muito estudadas devido à estabilidade e a ampla perspectiva de aplicação industrial e biotecnológica, principalmente na indústria alimentícia, uma vez que permite maior controle e maior eficiência (Jesus et al., 1999; Alves et al., 2002 apud Gonçalves, 2007). O presente estudo teve por objetivo investigar a produção de enzimas extracelulares por leveduras provenientes fermentação de cacau utilizando a metodologia do cup plate para as enzimas pectinases, proteases e lipases.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 73 leveduras obtidas de coletas realizadas em fazendas dos municípios de Ilhéus e Una, na região sul do Estado da Bahia. As leveduras foram repicadas em Agar Sabourand e incubadas a 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), durante 24h horas, para realização dos testes.

SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DAS ENZIMAS DE INTERESSE

Os testes foram realizados segundo o método de *cup plate*. Inicialmente, os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 ml dos meios de indução, composto de

fosfato de amônio; fosfato dibásico de potássio; cloreto de cálcio; sulfato de magnésio; solução traços de sais (sulfato ferroso; cloreto manganoso; sulfato de zinco em água destilada); e água destilada. A esse meio foram adicionados os substratos de indução, a saber: gelatina (proteases), pectina cítrica (pectinases), manteiga de cacau, gordura do dendê ou óleo de mamona (lipases), tendo o pH do meio sido ajustado para 7,0. As amostras foram padronizadas pela escala McFahrland correspondente a 3,0 e foram transferidas para o meio de indução e incubadas em shaker a 28°C por 2 dias, sob rotação de 150 RPM. Uma alíquota de 1,5 ml do meio de indução foi centrifugada a 3500 (RPM) por 20 minutos sob refrigeração (4°C). Em seguida, foram transferidos 150 uL do sobrenadante para perfurações circulares com diâmetro de 6 mm (0,6cm) nos meios de caracterização. O meio para a caracterização era composto de: 2% de ágar e 1% de um dos diferentes substratos de acordo com a enzima (pectina cítrica – pectinase, leite desnatado e gelatina – protease e óleo de mamona, gordura de dendê ou manteiga de cacau – lipase). Os meios de caracterização foram ajustados para três valores de pH (5; 7 e 9). As placas foram incubadas em B.O.D. a 37°C por 24h. Para visualização do halo de descoloração por pectinases, adicionou-se o revelador HCl. As placas para os testes de lipase foram reveladas em Transiluminador na luz ultravioleta de 310 nm com auxílio do indicador Rodamina B (0,3%), sendo a atividade enzimática evidenciada pela presença de halo fluorescente ao redor do ponto de aplicação. Todos os testes para cada enzima foram realizados em triplicata.

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DE LIPASE PELO MÉTODO TITULOMÉTRICO

Para quantificar a atividade de lipase foram utilizados três diferentes substratos: óleo de dendê, manteiga de cacau e óleo de mamona. O meio reacional consistiu de: 1g de substrato 4 ml de água destilada, 10 pérolas de vidro e 1mL do extrato enzimático. O meio foi colocado em frasco Erlenmeyer de 125 mL e submetido a banho de aquecimento a 50°C sob agitação de 150 rpm por 30min. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida e os ácidos graxos extraídos pela adição de 10 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos foram, então, titulados com uma solução de NaOH (0,05M) adicionados de 3 gotas de fenolftaleína como indicador de pH. Os brancos reacionais foram preparados da substituindo a solução enzimática por 1ml de água destilada. O cálculo da atividade foi feito com a média das triplicatas. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mol de ácido graxo por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as 73 leveduras testadas por *cup plate*, 32 apresentaram (43,84%) resultados negativos e 41 (56,16%) resultados positivos, sendo 17 para pectinase, 25 para protease e 13 para lipase. Os melhores resultados estão na Tabela 1. No teste quantitativo (titulométrico) para lipase, 61 (83,56%) leveduras apresentaram resultado positivo e apenas 12 (16,44%) apresentaram resultado negativo. Os melhores resultados são mostrados na Tabela 2. Com isso, é possível afirmar que o teste titulométrico foi mais sensível que o teste em placa para detectar a produção dessa enzima. Contudo, a concentração de Rodamina pode ter dificultado a visualização dos halos de degradação. Maciel *et al* (2010) constatou que a concentração de Rodamina interfere diretamente na visualização dos resultados e que não foi possível visualizar o quando a concentração de Rodamina foi superior a 0,007%. Vale ressaltar que a o pH exerceu influência na caracterização das enzimas e que os melhores resultados foram encontrados em pH 7 e 9 para pectinase, em pH 5,0 e 9,0 para protease e em pH 5,0 para lipase em óleo de dendê. Isto se deve ao fato de que o pH interfere na atividade enzimática de forma particular para cada enzima.

Tabela 1. Halos de degradação (em cm) do meio de caracterização para as leveduras testadas

Leveduras	Substrato														
	P			L+G			M			D			C		
	5	7	9	5	7	9	5	7	9	5	7	9	5	7	9
1	---	1,0	2,8	1,7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,0
16	---	---	---	2,1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1,4	---	0,9	---	1,7	---	1,6	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1,5	---	---	3,1	---	---	1,2	---	---	---	---	---	---	---	---	---
15	---	---	3,1	---	---	1,0	---	---	---	---	---	---	---	---	---
14,1	---	---	2,1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3,2	---	---	1,9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C-1.30	---	3,1	2,5	---	---	---	---	---	---	0,9	---	---	---	---	---
C-1.83/2	---	3,0	3,3	---	---	---	---	---	---	1,1	---	---	---	---	---
C-2.85	---	2,6	2,9	---	---	---	---	---	---	1,1	---	---	---	---	---
C-2.94	---	3,5	---	---	---	---	---	---	---	1,0	---	---	---	---	---
C-1.78	---	3,8	2,0	---	---	---	---	---	---	1,0	---	---	---	---	---
C-1.33/2	---	3,0	1,2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

P (pectina), L+G (leite e gelatina), M (óleo de mamona), D (óleo de dendê), C (manteiga de cacau)

Tabela 2. Atividade de lipase das leveduras que apresentaram melhores resultados no teste titulométrico.

Leveduras	Substrato		
	Mamona (U/ml)	Dendê (U/ml)	Cacau (U/ml)
1	0,22	1,43	0,37
1,8	0,25	2,05	0,40
2,4	1,25	2,25	0,52
C- 2.21/1	0,41	1,35	0,15
C-2.33/2	1,75	2,38	0,25
C-1. 78	0,23	1,38	0,33
C-2. 4/2	0,18	1,48	0,60
C-1. 72	0,31	1,33	0,28
C-1. 63	0,16	1,35	0,31
C-1. 27/2	0,30	1,36	0,23
C-2. 71	0,28	1,63	0,23
C-1. 156	0,28	2,25	0,23
C-1. 161	0,23	2,21	0,51
C-2. 118	0,23	2,00	0,23

CONCLUSÃO

Com 56,16% dos resultados positivos, podemos considerar que as leveduras testadas são boas secretoras de proteases e pectinases. A metodologia *cup plate* com uso de indicador Rodamina se mostrou pouco eficaz na detecção da secreção de lipase pelas leveduras. Contudo, o teste quantitativo revelou que estes microrganismos são bons secretores de lipases, já que foi possível detectar a atividade desta enzima em 83,56% das leveduras testadas pelo método titulométrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. UFMG, 2006. 206p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós – Graduação em Ciência de alimentos da faculdade de Farmácia da universidade Federal de Minas Gerais. Orientador: Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos.
- LOCK, L.L. Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81.125p. Dissertação(Mestrado)Microbiologia Agrícola-Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.
- LEVANON, Y.; ROSSETINI, S. M. O. Cacau. In: Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos. 1 Ed. Volume 4. Ed.Edgard Blucher Ltd.387-420, 2001.
- KOBLITZ, M. G. B. (Org.). Bioquímica de alimentos. Teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p., 2008.
- SILVA, E. G.. Seleção de leveduras pectinolíticas isoladas de frutas tropicais. 79 p. Dissertação (Mestrado) Microbiologia Agrícola- Universidade Federal de Lavras, 2003.
- GONÇALVES, F. A. 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.
- 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.
- MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S. Belém. Padronização do uso do Corante Rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas. Comunicado Técnico 05(EMBRAPA) Brasília, DF. ISSN 2177-4447. 2010