

SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO, COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SACARASE E ISOMALTASE VISANDO UTILIZÁ-LAS COMO COADJUVANTE NA TERAPIA DA INTOLERÂNCIA A SACAROSE, ISOMALTOSE E AO AMIDO

Kelly Fortalesa Rodrigues¹; Elinalva Maciel Paulo²; Sandra Aparecida Assis³; Patrícia Pereira Lopes⁴

1- Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail kekel_fsa@hotmail.com

2-Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elinalvamaciell@yahoo.com.br

3- Pesquisadora Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sandrinhaassis@yahoo.com.br

3-Mestranda, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail pml.pereira@hotmail.com

Palavras-chave: sacarase-isomaltase, atividade enzimática, intolerância ao amido.

INTRODUÇÃO

A sacarase-isomaltase é uma enzima que catalisa a sacarose e certas partes do amido. A sua deficiência no organismo causa a Intolerância à sacarose-isomaltose que constitui uma anomalia congênita, cuja transmissão se dar através de caráter autossômico recessivo que constitui a segunda deficiência primária de dissacarídeos mais frequente na espécie humana com prevalência entre 0,1 e 0,5%. Não existe cura para esta doença, mas a mesma pode ser controlada através da introdução na dieta das enzimas sacarase, isomaltase ou amilases. As leveduras normalmente sintetizam estas enzimas. Elas catalisam a hidrólise e fermentação das α -1,4-glucosídeos e α -1,6-glucosídeos (TESTE, et al., 2010). A utilização de leveduras com perfil metabólico para a produção destas enzimas atua como coadjuvante no tratamento da intolerância a sacarose, isomaltose e ao amido. Assim, é de grande interesse a seleção de leveduras produtoras das enzimas aminolíticas, visando a sua utilização futura como agente controlador e/ou minimizador dos efeitos maléficos causados pela deficiência da sacarose-isomaltose e amilases em indivíduos portadores desta anomalia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados cinco tipos de extratos purificados de leveduras, previamente isoladas em etapas anteriores deste projeto. Estes extratos foram submetidos à determinação de atividade enzimática. Para a determinação da atividade enzimática utilizou-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) baseado no método de Miller (1959), utilizando como substrato solução de amido 1%. O extrato enzimático que apresentou maior atividade enzimática sobre o amido foi utilizado para maximizar esta atividade, realizando um planejamento experimental pelo Método de Superfície de Resposta (MSR), utilizando o modelo Dorrert. No presente estudo as variáveis avaliadas foram os diferentes níveis de temperatura (55° C, 65° C e 75° C) e pH (4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0). Os resultados foram analisados pelo programa estatístico *STATISTIC* 6.0, em que se chegou aos parâmetros ótimos para a atuação das enzimas sobre o amido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cerca de 100 espécies de leveduras são capazes de hidrolisar o amido, e a degradação destes em oligossacarídeo depende de amilases extracelulares produzidas (SILLS et al., 1984). Esta característica está associada com a produção de pelo menos dois tipos de amilases, α -amilase e a glucoamilase. Segundo os resultados constatados (Figura 1), o extrato enzimático (E33D) da levedura *Rhoduthurola mucilaginosa* degradou a molécula do amido de forma mais eficiente quando comparado com os extratos das outras leveduras, razão pelo qual esta levedura foi escolhida para prosseguir com o experimento. Do mesmo modo Púglia (2006) observou que uma levedura nomeada como J07 degradou elevada concentração de amido.

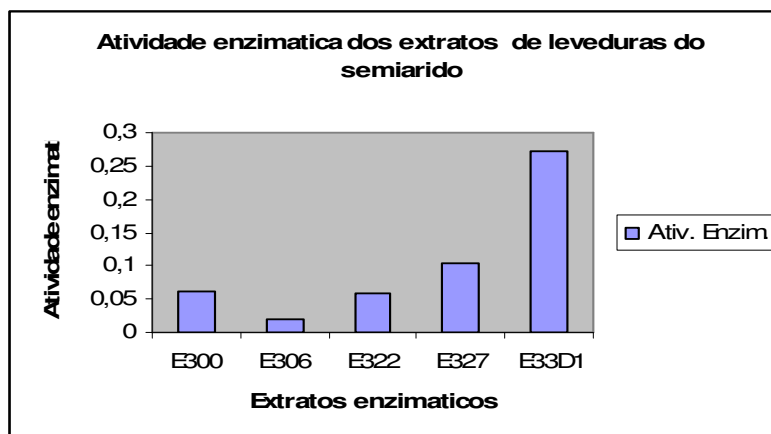


Figura 1. Atividade enzimática dos extratos de leveduras produzidos por leveduras isoladas do semiárido baiano.

Utilizando a ferramenta de planejamento experimental e análise de superfície de resposta é possível investigar a influência de determinadas variáveis em um processo, e a forma de interação entre estas variáveis, bem como obter o valor das variáveis que maximizem os resultados esperados (BARROS NETO, 1995). A Tabela 1 mostra os resultados experimentais da atividade enzimática com a variação dos níveis de temperatura e pH no processo da reação enzimática

Tabela 1. Níveis diferentes de temperatura e pH utilizados para maximizar a atividade enzimática do extrato produzido pela levedura *Rhoduthurola mucilaginosa*

Ensaio	T °C	pH	Atividade enzimática (U) (mmol de glicose/mg/min)
1	75°C	4,5	3,32
2	75 °C	5,5	3,45
3	65 °C	4,0	3,00
4	65 °C	5,0	3,53
5	65°C	5,0	3,55
6	65°C	5,0	3,65
7	65°C	5,0	3,56
8	65°C	6,0	3,58
9	55°C	4,5	0,91
10	55°C	5,5	0,96

A partir da regressão múltipla realizada pelo software Statistic 7.0 obtidos com os resultados experimentais, determinou-se os coeficientes de regressão para atividade amilásica. Analisando os dados encontrados pelo teste de t-Student, das variáveis temperatura e pH,

obteve-se como significativo ($p > 0,05\%$) os parâmetros lineares (L) e os termos quadráticos (Q) das duas variáveis estudadas. ($R^2 0,9965$). Este valor de R indica que os resultados foram explicados pela equação empírica ($z = -68,012343749997 + 1,8459374999999 * x + 0,13393749999998 * x^2 + 2,8225000000005 * y + 2,8249999999989 * y^2 + 0,003499999999757 * x * y + 0$) proposta com 99% da variabilidade dos dados.

Tabela 2. Coeficiente de regressão : Atividade enzimatica (U); $R^2 = 0,99676$; (planejamento experimental pH x temp.) Erro residual = 0,0084563.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro	t	p
Media	-68,0123	4,505848	-15,0942	0,000012
Temperatura (L)	1,8459	0,090356	20,4296	0,000034
Temperatura (Q)	-0,0134	0,000597	-22,4244	0,000023
pH (L)	2,8225	0,997153	2,8306	0,047318
pH (Q)	-0,2825	0,079638	-3,5473	0,023856
Temp (L) x pH(L)	0,0035	0,009196	0,3806	0,722843

L – linear, Q- quadratica

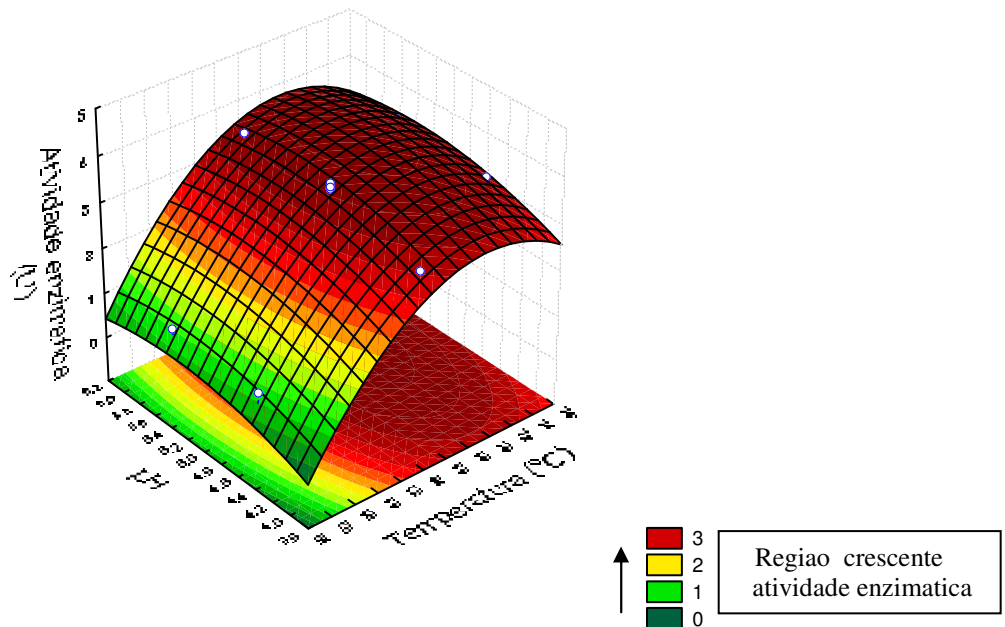


Figura 2. Gráfico da superfície de resposta

O gráfico de superfície de resposta corresponde à descrição gráfica do modelo, o que simplifica a interpretação dos resultados. Quanto mais intensa for a área de coloração melhor será a resposta obtida (BARROS NETO, 1995).

A Figura 2 apresenta a superfície construída para a atividade das enzimas catalisadoras do amido variando os níveis temperatura e pH. Nela observa-se que a máxima atividade ocorre no ponto central correspondendo aos valores de temperatura 69,6° C e de pH 5,4, apresentando como atividade enzimática 3,89U, corroborando com os dados gerados pelo programa estatístico demonstrados na tabela 3.

Tabela 3. Valores críticos; Atividade enzimática (U) (planejamento experimental pH x temp) . Valor máximo da atividade enzimática predito: **3,895297**

Fatores	Limite minimo	Valor critico	Limite maximo
Temperatura (° C)	55,0	69,6	75,0
pH	4,0	5,4	6,0

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho constata-se que a levedura *Rhoduthurola mucilaginosa* apresenta-se como um micro-organismo que tem atividade enzimática sobre o amido, podendo inferir a sua utilização como coadjuvante na terapia da intolerância a sacarose-isomaltose, pois o amido encontrado nos alimentos também está envolvido nesta anomalia.

Agradecimentos: Universidade Estadual de Feira de Santana/LAMASP/LAEN, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

REFERÊNCIAS

- BARROS NETO, B. N.; SCARMINIO, I. P.; BRUNS, R. E. 1995. *Planejamento experimental e otimização de experimentos*. Editora Unicamp, Campinas, SP, 278p.
- LUIZ, VFC et al. Terapia Nutricional nas Intolerâncias e Alergias Alimentares. *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*. V. 93, 2005.
- MILLER, G. L. , 1959. “Use of dinitrosalicilicacid reagent for determination of reducing sugar”, *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428.
- PÚGLIA, A. L. 2006. Desempenho de leveduras selvagens com potencial de produção de enzimas amilolíticas em processo fermentativo. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2006. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- SILLS, A.M.; SAUDER, M.E.; STERWART, G.G. 1984. Isolation and characterization of the amynolytic system of *Schwanniomyces castelli*. *Journal of the institute of Brewing, London*, v. 90, n. 6, p. 311-314.
- TESTE, M.A; FRANÇOIS, J.M; PARROU, J.L. 2010. Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA family. *Journal of Biological Chemistry*. 27;285(35):26815-24.