



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



MARCELLE DOS SANTOS SILVA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE
LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DO
CACAU**

Feira de Santana, BA

2011

MARCELLE DOS SANTOS SILVA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE
LEVEDURAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DO
CACAU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rachel Passos Rezende (UESC)
Co-orientadora: Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro (UESC)

Feira de Santana, BA

2011

AGRADECIMENTOS

Deus por me guiar, e me conceder sabedoria, e a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus pais Osvaldo e Maria; e minha irmã Monielle, por me apoiarem, incentivarem e auxiliarem em tudo e por todo amor, confiança e carinho incondicional.

À Prof. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro e a Profa. Dra. Rachel Passos Rezende pela orientação concedida, pelas condições de trabalho que me proporcionaram, pela contínua disponibilidade, pela paciência e, sobretudo, pelos valiosos ensinamentos.

À Prof. Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz pelo auxílio e conhecimentos concedidos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, tendo a frente o Prof. Dr. Aristóteles Góes-Neto pelo apoio e auxílio em todos os momentos.

Às alunas de iniciação científica Emília Lisboa, Eleni Anjos, e Andrea Porto do Laboratório de Tecnologia do Departamento de Tecnologia da UEFS pela colaboração na realização dos experimentos, por me auxiliarem em todos os momentos que precisei e pelo companheirismo durante toda a caminhada.

A minha amiga Rita pela amizade, pelo apoio, pelo convívio constante, pelos conselhos e incentivo, e por dividir comigo todas as dificuldades e alegrias vividas.

As colegas de Pós-Graduação Cíntia Reis e Aline Costa; a aluna de iniciação científica Larissa Costa; e a funcionária Bárbara Letícia do Laboratório de Análise Físico - Química (LAFIQUI) do Departamento de Tecnologia da UEFS pelo auxílio nos ensaios enzimáticos.

Aos colegas de Trabalho do Laboratório de Tecnologia e do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) do Departamento de Ciências Biológicas da UEFS em especial a funcionária Gorette Carmo pelo companheirismo e disposição em ajudar sempre que necessário.

A funcionária Berlene Marques pela amizade e auxílio em vários momentos e a Fátima Albinati pela convivência e apoio.

À Helton, pelo apoio na secretaria da Pós-Graduação.

Aos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela contribuição ao desenvolvimento pessoal, acadêmico, profissional, principalmente aos colegas Janaína e Vitor.

À Adriana Cristina Reis Ferreira da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela gentil cessão dos microrganismos utilizados.

A Prof. Dr. Marília Cardoso e Cíntia Reis pela colaboração na análise estatística dos resultados.

À minha família pela torcida.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), em especial ao Departamento de Ciências Biológicas, pela oportunidade concedida para realização do Mestrado em Biotecnologia com Ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos, sendo que o último citado aqui tem a mesma importância do primeiro.

“Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se eu não tiver amor, não sou nada!”.

I Coríntios 13:2

RESUMO

As enzimas possuem características peculiares, tais como especificidade, diversidade e capacidade de produção em larga escala. Além disso, apresentam potencial biotecnológico amplo, sendo um deles a obtenção de produtos através de processos fermentativos. O presente trabalho teve como objetivo a investigação da produção de proteases, lipases, amilases, celulases, pectinases e fosfolipases por leveduras isoladas da fermentação do cacau. A metodologia utilizada inicialmente foi de *cup plate*, seguida de testes titulométricos para lipases e espectrofotométricos para pectinases e proteases. A partir de 70 leveduras 56 (80%) foram positivas para pelo menos uma das enzimas estudadas nos testes realizados em placa. Treze isolados (18%) foram positivos para as amilases; 35 (50%) para as celulases; 11 (15%) para as fosfolipases; 12 (17%) para as pectinases e 12 (17%) para proteases. Nos testes em placa para as lipases, o substrato óleo de dendê foi o que apresentou o maior número de isolados capazes de utilizá-lo, sendo 24 (34%) leveduras positivas para a atividade lipolítica; 10 (14%) para o óleo de mamona e 8 (11%) para manteiga de cacau. Para os testes titulométricos todas as leveduras foram positivas nos três substratos (óleo de dendê, óleo de mamona e manteiga de cacau), sendo os melhores resultados obtidos para as leveduras testadas com o óleo de dendê. Nos testes quantitativos espectrofotométricos, 62 (88%) leveduras foram positivas para proteases e 68 (97%) para pectinases. Este estudo demonstrou que os microrganismos testados representam uma fonte potencial de enzimas extracelulares de interesse industrial e biotecnológico.

Palavras-chave: Fungos leveduriformes. Amilases. Proteases. Pectinases. Celulases. Lipases. Fosfolipases.

ABSTRACT

The enzymes have peculiar characteristics, such as specificity, diversity and capacity of large scale production. Moreover, its potential biotechnology is great, being one of them the obtaining of products through of the fermentative process. The present work had as objective the investigating the production of proteases, lipases, amylases, cellulases, pectinases and fosfolipases secreted by yeasts isolated from cocoa's fermentation. The methodology used initially was of the cup plate, followed of the titrimetric tests for lipases and spectrophotometric tests for pectinases and proteases. From of 70 yeasts 56 (80%) were positive to the secretion of at least one of the enzymes studied in tests made on board. Thirteen strains (18%) were positive for amylase, 35 (50%) for cellulases, 11 (15%) for fosfolipases; 12 (17%) to pectinase and (17%) for protease. Us tests on board for the lipases the substrate palm oil was what presented largest number of strains able to use it, being 24 (34%) positive yeast for the lipase activity, 10 (14%) were positive for castor oil and 8 (11%) for cocoa butter. For the titrimetric tests all the yeasts were positive in the three substrates (palm oil, castor oil and cocoa butter) being the best results obtained for the yeasts tests with palm oil. In the quantitative spectrophotometric tests, 62 (88%) of the yeasts were positive for protease and 68 (97%) to pectinases. This study demonstrated that the microorganisms tested represent a potential source of extracellular enzymes of industrial and biotechnological interest.

Keywords: Yeasts fungi. Amylases. Proteases. Pectinases. Cellulases. Lipases. Fosfolipases.

LISTA DE FIGURAS

- | | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1. | <p>Figura 1 a. Equação geral para uma reação de transesterificação. b Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.</p> | 28 |
| Figura 2. | <p>2. a. Halos de atividade amilolítica da levedura <i>P. membranifaciens</i> C-2.32/2 obtido a partir do cultivo em meio de indução durante incubação por 48h, a 28°C e 150 rpm, e inoculado em meio sólido a 37°C com 24h, pH 7. b e c representam os halos negativos das leveduras <i>P. kluyveri</i> C-2.47 e <i>P. membranifaciens</i> C-.62, respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.</p> | 46 |
| Figura 3. | <p>b. Halos de atividade pectinolítica da levedura 1 (ainda não identificada), em pH 7, obtido a partir do crescimento a 28°C, durante 48 horas, em meio de indução. a e c atividade enzimática negativa das leveduras 15 e 1.5, respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.</p> | 50 |
| Figura 4. | <p>Halos de atividade proteolítica das leveduras ainda não identificadas a. 1.4 b. 3.1 e c. 16 obtidos a partir de cultivo em meio de indução durante incubação por 48h, a 28°C e 150 rpm, e inoculado em meio sólido a 37°C por 24h, pH 5. Todos os testes foram realizados em triplicata.</p> | 52 |
| Figura 5. | <p>a Halos de atividade lipolítica da levedura <i>C.parapsilosis</i> C-2.68 sobre o substrato óleo de dendê obtido do extrato enzimático após crescimento em meio líquido por 48 h a 28°C. Cada poço representa uma levedura testada em triplicata na horizontal, em pH 5. b e c. Atividade enzimática negativa das leveduras <i>P. membranifaciens</i> C-2.126 e <i>C. krusei</i> C-2.9, respectivamente.</p> | 56 |

Figura 6.

Análise da atividade enzimática extracelular do extrato enzimático livre de células utilizando como substrato a manteiga de cacau, o óleo de mamona e o óleo de dendê cujos ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de NaOH (0,05M), utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador de pH e ponto de viragem detectado pelo surgimento de uma coloração rósea no meio.

58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Porcentagem de leveduras positivas quanto à atividade enzimática verificados pela observação de halo produzido pela atividade do extrato obtido do cultivo a 28°C por 48h e caracterizado a 37°C com 24h. 45
- Gráfico 2.** Porcentagem de leveduras positivas verificadas a partir de testes quantitativos titulométricos nos substratos Óleo de mamona, Óleo de dendê e Manteiga de cacau para atividade lipolítica. 59
- Gráfico 3.** Porcentagem de leveduras positivas verificadas a partir de testes quantitativos espectrofotométrica sobre os substratos Pectina cítrica e Gelatina para as atividades pectinolítica e proteolítica, respectivamente. 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Principais aplicações das enzimas em indústrias e os microrganismos que as secretam.	21
Tabela 02.	Microrganismos produtores de celulases.	31
Tabela 03.	Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de amilases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).	46
Tabela 04.	Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de celulases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).	47
Tabela 05.	Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de fosfolipases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).	48
Tabela 06.	Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de pectinases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).	49
Tabela 07.	Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de proteases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e	51

testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).

- Tabela 08.** Resultados de atividade lipolítica dos extratos enzimáticos obtidos a partir do cultivo submerso por 48h a 28°C nos substratos manteiga de cacau, óleo de mamona e óleo de dendê, revelados em meio sólido sob luz ultravioleta depois de mantidos por 24h a 37°C. 54
- Tabela 09.** Resultados da atividade lipolítica dos extratos enzimáticos obtidos das leveduras isoladas da fermentação do cacau nos substratos manteiga de cacau, óleo de mamona e óleo de dendê, obtido pela titulação dos ácidos graxos solúveis em solução de NaOH e de fenolftaleína como indicador. 60
- Tabela 10.** Resultados das atividades de Pectina metilesterase (U/mL) e a Atividade Específica de Proteases (U/mL) dos extratos enzimáticos obtidos a partir do cultivo das leveduras isoladas da fermentação do cacau em meio de indução suplementado com pectina cítrica e gelatina, respectivamente. 63

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AE	Atividade específica
ANOVA	Análise de variância
CCMB	Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
GYMP	Meio composto de glicose, extrato de levedura, extrato de malte e peptona
g	Gramas
g/L	Relação de gramas por litro
h	Hora
IE	Índice Enzimático
mg	Miligrama
M	Molaridade
LAFIQUI	Laboratório de Análise Físico-química de Alimentos
LAPEM	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia
min	Minuto
mg/mL	Relação entre miligrama e mililitro
mL	Mililitro
MM	Massa molar
mM	Massa milimolar
N	Normalidade
O ₂	Oxigênio
p/v	Relação em porcentagem entre o peso do soluto e o volume da solução
pH	Potencial hidrogeniônico
PME	Pectina metilesterase
PPGBiotec	Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
rpm	Rotações por minuto
TCA	Ácido Tricloroacético
UA	Unidade de atividade
U/mL	Concentração da atividade enzimática, em mililitro

UV	Luz Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
v/v	Relação em porcentagem entre o volume do soluto e o volume da solução
μL	Microlitro
μm	Micrograma
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 LEVEDURAS E SUA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA	19
2.2 ENZIMAS	20
2.3 PROTEASES	22
2.4 AMILASES	25
2.5 LIPASES	26
2.6 PECTINASES	28
2.7 CELULASES	29
2.8 FOSFOLIPASES	31
2.9 ENZIMAS NA FERMENTAÇÃO DO CACAU	32
2.10 ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 PROCEDÊNCIA DAS LINHAGENS DE LEVEDURA	36
4.2 REATIVAÇÃO	36
4.3 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS	36
4.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	37
4.5 CULTIVO EM MEIO DE INDUÇÃO	37
4.6 ENSAIO QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DAS ENZIMAS	38
4.6.1 Atividade de celulase	38
4.6.2 Atividade de amilase	39
4.6.3 Atividade de pectinase	39
4.6.4 Atividade de lipase	39

	16
4.6.5 Atividade de Protease e Fosfolipase	39
4.7 TITULAÇÃO	40
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PECTINA METILESTERASE (PME) EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	41
4.8.1 Preparação das amostras para os ensaios enzimáticos	41
4.9 ATIVIDADE DE PROTEASES EXTRACELULARES PRODUZIDAS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	42
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 ENSAIO QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DAS ENZIMAS (<i>CUP PLATE</i>) PECTINASES, PROTEASES, AMILASES, CELULASES E FOSFOLIPASES	44
5.2 ATIVIDADE DE AMILASE	45
5.3 ATIVIDADE DE CELULASE	47
5.4 ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE	48
5.5 ATIVIDADE DE PECTINASE	49
5.6 ATIVIDADE DE PROTEASE	50
5.7 ENSAIO QUALITATIVO DE <i>CUP PLATE</i> PARA DETECÇÃO DE LIPASES	52
5.8 TESTES QUANTITATIVOS DE DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	57
5.8.1 Testes de Titulação	57
5.8.2 Testes espectrofotométricos de Pectinases e Proteases	62
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
6 CONCLUSÕES	67
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	68

1 INTRODUÇÃO

As enzimas atuam em diversas atividades industriais, como principal produto biotecnológico nas áreas ambiental, alimentícia e da saúde que utilizam a tecnologia enzimática e seus subprodutos em várias de suas etapas. As enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na obtenção de muitos produtos (OLIVEIRA, 2006; SILVA-NEVES et al., 2006). A tecnologia enzimática movimenta, anualmente, bilhões de dólares (COELHO, 2001; SILVA-NEVES et al., 2006). Dessa maneira faz-se necessário que novas espécies de microrganismos produtores de enzimas com potencial biotecnológico sejam estudadas.

Diante da enorme diversidade de organismos sabe-se que apenas 1% dos microrganismos existentes na terra foi identificado pelo homem e o conhecimento da diversidade de enzimas secretadas por eles é bastante escasso. As leveduras tem sido foco recorrente de pesquisas em busca de novos agentes biotecnológicos principalmente devido ao fato da enorme variabilidade e diversidade que ainda não foram descobertos (SILVA, 2010).

As enzimas podem ser de origem microbiana, animal e vegetal (NETO, 2001). O uso de microrganismos como fonte de enzimas vem sendo utilizado em escala industrial por expressarem características desejadas para aplicação biotecnológica permitindo, não só o aumento na produção de enzimas de aplicação conhecida em outros processamentos, mas também a produção de novas enzimas de interesse comercial (GEHARTZ, 1990).

As enzimas são catalisadores biológicos muito eficientes, pois atuam na transformação de moléculas orgânicas sem alterar a proporção entre os reagentes e produtos do processo e nem interferir na constituição destes (MARZZOCO e TORRES, 1999). Além disso, são capazes de atuar em meio extracelular eficientemente, desde que o pH, a temperatura e o substrato estejam em condições adequadas para que ocorra a reação enzimática (COLEN, 2006). Atualmente tem sido empregado o uso de enzimas, secretadas extracelularmente ou imobilizadas, em diversos processos (DALLA-VECCHIA, 2004; COLEN, 2006).

As enzimas são muito utilizadas nas indústrias devido ao alto grau de especificidade das reações que catalisam, pois efetuam conversões eficientes, econômicas, podem atuar em concentrações baixas, sob condições brandas de pH e temperatura e, principalmente, são biodegradáveis. As amilases, celulasas, pectinases, lipases e proteases são muito utilizadas em infindáveis aplicações, sendo úteis em vários setores da economia como nos setores de

detergentes, fármacos, têxtil e alimentício, o que demonstra a sua importância e potencialidade de usos (MACIEL, 2010; SILVA, 2010).

As principais vantagens de se utilizar leveduras como fontes de enzimas em grande escala, quando comparadas aos fungos filamentosos, é a obtenção de elevadas concentrações de enzimas através de manipulação genética e ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de microrganismos produtores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de baixo custo, e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, possibilitando flexibilidade nas condições de uso (REED, 1997; SILVA, 2003).

Devido aos fatores mencionados anteriormente tornou-se imprescindível a busca por outras fontes dessas enzimas e a realização de pesquisas visando à seleção de novas linhagens que secretem enzimas de importância biotecnológica (SILVA, 2010) e industrial (FUNGARO et al., 1994; SILVA-NEVES et al., 2006).

O potencial das linhagens de leveduras obtidas a partir da fermentação de amêndoas do cacau representa uma fonte ainda pouco investigada quanto à produção de enzimas extracelulares. A microbiota que cresce nesse ambiente pode possuir peculiaridades e características de interesse industrial que poderiam ser exploradas na seleção de leveduras que secretem enzimas para aplicação nos mais variados processos industriais.

No presente trabalho leveduras isoladas da fermentação do cacau foram testadas quanto à secreção das enzimas amilases, celulasas, pectinases, lipases, proteases e fosfolipases visando à seleção de microrganismos com potencial de aplicação na obtenção de produtos ou no melhoramento de processos de importância biotecnológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEVEDURAS E SUA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Os fungos eucariotos possuem formas leveduriformes ou filamentosas (ALEXOPOULOS et al., 1996). As leveduras são fungos formados por uma única célula eucarionte, em sua maioria são classificados como ascomicetos, tem forma esférica, oval ou cilíndrica. A reprodução das leveduras pode ser assexuada por brotamento ou podem realizar também a reprodução sexuada quando ocorre a fusão de duas células (MADIGAN et al., 2004; GONÇALVES, 2007).

As leveduras são ubíquas, têm metabolismo peculiar que permite a utilização de nutrientes variados e nas mais diversas condições ambientais. Crescem principalmente onde há presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores, de nutrição quimio-heterotrófico absorvitiva, predominantemente aeróbios, com temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30° C e pH de 4 a 7, sendo que algumas espécies são patogênicas ao homem (MADIGAN et al., 2004).

Devido à sua habilidade de utilizar vários substratos para sua nutrição absorvitiva as leveduras colonizam diversos nichos ecológicos. Essa característica permite que as leveduras secretem enzimas que hidrolisam macromoléculas a moléculas menores principalmente fontes de carbono e hidrogênio, que podem ser incorporadas e utilizadas em sua alimentação. Tem extrema importância econômica, pois produzem bebidas fermentadas como cervejas e vinhos, e outros alimentos, como na produção de pão e queijo cuja espécie mais importante e conhecida é a *Saccharomyces cerevisiae* (ALEXOPOULOS et al., 1996; SANTOS et al., 1996; GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2004; MADIGAN et al., 2004).

São apropriadas para as utilidades industriais, pois podem ser identificadas de maneira rápida devido ao seu crescimento em curto tempo, por absorverem uma enorme variedade de substratos de baixo custo e apresentarem facilidade de recuperação do produto final devido à rápida separação da biomassa. Além disso, são importantes em diversos setores tais como: industrial, pela contaminação e deterioração de produtos, e na medicina, por serem a causa de diversas doenças (SILVA-NEVES, 2006).

As leveduras são capazes de catabolizar diferentes compostos, orgânicos e inorgânicos, extraindo desses nutrientes a energia necessária à sua sobrevivência, essa característica permite sua aplicação como agente biológico na solução dos problemas gerados pelos rejeitos lançados no meio ambiente. A diversidade de substratos nos quais os microrganismos podem crescer resultou, então, no surgimento de enzimas aptas a transformar moléculas orgânicas distintas das já existentes, o que sem dúvida confere algumas vantagens adicionais às células microbianas, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e utilização de diferentes fontes energéticas (FUENTEFRÍA, 2004).

2.2 ENZIMAS

As enzimas são moléculas de natureza protéica com atividade catalítica, embora existam também enzimas constituídas de RNA, as ribozimas ou RNAs catalíticos (FELLOWS, 2006). Enzimas são extremamente importantes para as reações, pois, tem a capacidade de acelerá-las através da diminuição da energia necessária para que se iniciem, e favorecem um aumento considerável da velocidade na qual ocorrem, pois sem a atuação destas, muitos dos processos necessários à vida em que as enzimas atuam seriam muito lentos ou mesmo não aconteceriam, como a respiração e a digestão animal (LENNINGHER et al., 1985; LIMA et al., 2001; SCHMIDELL et al., 2001).

O potencial de aplicação das enzimas nas indústrias é devido as diversas vantagens que possuem como a sua capacidade de atuar em condições brandas de pH, temperatura e pressão atmosférica, apresentar especificidade e enantioseletividade, não causar poluição ambiental e ser rapidamente inativadas nas reações (POROSKE, 1984; XU, 2000; VITOLO, 2001; FELLOWS, 2006).

As enzimas possuem uma enorme aplicabilidade industrial e envolvem muito investimento e retorno financeiro com sua utilidade em indústrias, principalmente devido ao seu potencial em substituição aos processos que utilizam catalisadores químicos convencionais, assim tornam-se uma alternativa imprescindível ao desenvolvimento industrial sustentável (VITOLO, 2001) Tabela 01. Além disso, as reações catalisadas com essa tecnologia geram produtos que podem ser considerados naturais e não tóxicos devido à possibilidade de extrair melhor as matérias primas e facilitar a manipulação dos materiais, o

que além de aumentar a vida de prateleira, gera melhoria das características sensoriais dos alimentos. É por todos esses fatores que as enzimas são atualmente muito utilizadas nas mais variadas aplicações pelas indústrias (POROSKE, 1984; XU 2000; VITOLO, 2001; FELLOWS, 2006).

Tabela 01. Principais aplicações das enzimas em indústrias e os microrganismos que as secretam.

Enzimas	Fonte	Atuação nos alimentos	Aplicação
α -amilase	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Microbacterium imperiale</i>	Hidrólise de goma de trigo, aumento do volume do pão	Amolecimento da massa; auxiliar na produção de açúcares para fermentação
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma</i> spp.	Hidrólise de celulose	Liquefação de frutas para produção de sucos
Lipase	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol;	Tempero em produtos de queijo; modificação da função da gordura por interesterificação
Pectinase	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium funiculosum</i>	Hidrólise da pectina	Clarificação de sucos de frutas por despectinização
Protease	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Cryphomectria parasítica</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Bacillus</i> sp.	Hidrólise de proteínas de animais e vegetais; hidrólise de glúten de trigo	Coagulação do leite para fabricação de queijo; produção de hidrolisados para sopas; melhoria da massa do pão

Fonte: Adaptado de Vitolo, 2001 e Fellows, 2006.

Apesar da enorme diversidade de enzimas que foram investigadas e são conhecidas apenas algumas podem efetivamente ser aplicadas e produzir resultados satisfatórios em escala industrial, pois nem todas as enzimas são eficientes nas condições de processamento em grande escala. As enzimas podem ser inativadas devido às variáveis de temperatura e pH do processo e necessidade de co-fatores para que possam atuar. Além disso, muitas enzimas são intracelulares, o que dificulta a eficiência do processo, pois a necessidade de separação

das enzimas dos componentes celulares encarece e torna inviável o processamento com fins comerciais (VITOLLO, 2001; LIMA et al., 2001).

Para que a secreção das enzimas seja eficiente deve-se maximizar a produção das enzimas pelos microrganismos e minimizar os custos com substrato, meio de cultivo, incubação, bem como procedimentos de recuperação das enzimas (VITOLLO, 2001; FELLOWS, 2006).

As enzimas microbianas têm grande potencial biotecnológico, sendo empregadas na indústria têxtil (amilase, celulase, pectinase), de papel (lipase, xilanase, oxiredutases), de detergentes (celulase, lipase, protease) e alimentícia (pectinase, lipase, protease) (VAN e BEILEN, 2002; OLIVEIRA, 2006) na qual há a necessidade de que o microrganismo não secrete micotoxinas ou outras substâncias tóxicas e nem seja patogênico (FUNGARO et al., 1994).

A necessidade atual do mercado, dos consumidores e de órgãos governamentais por produtos alimentícios com menos aditivos e reduzida aplicação de tratamentos químicos tem aumentado o interesse do uso de enzimas nessas indústrias (TUNGA et al., 2003). Portanto, a tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para a síntese de compostos de alto valor agregado (FERNANDES, 2007).

2.3 PROTEASES

As proteases são enzimas que atuam sobre as proteínas transformando-as em peptídeos de peso molecular menor ou em aminoácidos (LIMA et al., 2001; SCHMIDELL et al., 2001; VITOLLO, 2001). As enzimas proteolíticas catalisam a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas (BERG et al., 2004), e classificam-se quanto ao valor do pH no qual a sua atividade catalítica é máxima, podendo assim ser classificadas em proteases ácidas, neutras ou alcalinas (RAO, 1998; NELSON e COX, 2004).

As proteases alcalinas tiveram sua aplicação aumentada como catalisadores industriais nos últimos anos por oferecerem diversas vantagens em detrimento dos catalisadores químicos convencionais. Dentre as características vantajosas que apresentam encontra-se a alta atividade catalítica, alto grau de especificidade pelo substrato, podem ser

produzidas em larga escala, são economicamente viáveis e biodegradáveis, reduzindo assim, também a poluição ambiental (ANWAR e SALEEMUDDIN, 1998; ESPÓSITO, 2006).

São provenientes de diversas fontes naturais podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. As leveduras são as mais promissoras fontes de enzimas, pois possuem fácil manipulação genética e grande diversidade (RODRIGUES e SANT'ANNA, 2001). As leveduras são boas produtoras de enzimas que podem ser utilizadas inclusive na produção de alimentos (GODFREY e WEST, 1996, RODRIGUES e SANT'ANNA, 2001; NEVES-SOUZA et al., 2006 e SILVA, 2009; BARNETT et al., 1990).

As proteases podem ser diferenciadas de acordo com sua atuação nas cadeias proteolíticas. As enzimas podem ser utilizadas na modificação de materiais de origem protéica através do processo de hidrólise. Essas enzimas atuam de diversas maneiras no ataque as cadeias protéicas e de acordo com a região em que atuam podem ser classificadas em endopeptidases e exopeptidases (SCHMIDELL et al., 2001; LIMA et al., 2001).

Existem diversos processos em que as enzimas proteolíticas podem ser aplicadas (NELSON e COX, 2004), principalmente na indústria alimentícia (SOARES et al., 1999; BIAGGIO et al., 2001; SILVA-NEVES et al., 2006; SILVA et al., 2009), de maturação de couro, química e farmacêutica (BON e PEREIRA, 1999; BIAGGIO et al., 2001; SOARES et al., 2008; SOUZA et al., 2008; SILVA et al., 2009). Na indústria alimentícia, tem aplicação difundida, no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, produção de pães e biscoitos, no processo industrial de produtos como óleos desidratados e leite de soja. No processo de tenderização de carnes as proteases agem degradando as suas fibras através da injeção de enzimas no sistema vascular do animal antes do abate. (CANILHA et al., 2006; ZIMMER et al., 2009).

As proteases podem ser utilizadas no aumento da digestibilidade de alimentos muito ricos em proteínas, como o farelo de soja, nos quais os complementos enzimáticos são utilizados amplamente na indústria, para facilitar a digestão e melhorar o sabor e o valor nutricional dos alimentos (SOARES et al., 2008; LIMA et al., 2003).

Proteínas hidrolisadas vêm sendo aplicadas e desenvolvidas com incrível sucesso na indústria alimentícia como substitutos industriais na dieta de indivíduos que não podem digerir a proteína intacta. São aplicados também em substitutos de produtos lácteos, suplementos protéicos, estabilizadores de bebidas, realçadores de sabor e produtos de

confeitaria, sendo bastante difundida sua aplicação também nos produtos de pesca (NASCIMENTO et al., 2007).

Na indústria de panificação o uso de proteases melhora as características como a elasticidade e a textura do glúten. Essas enzimas são adicionadas durante a fermentação, o que fornece um maior contato com o glúten e atuam hidrolisando a cadeia protéica e reduzindo-a através do realinhamento da molécula, o que torna a massa mais fácil de ser manuseada, reduzindo o tempo de mistura e com isso gera economia de material, equipamento e energia o que reduz o valor do produto final (KOBBLITZ et al., 2008).

As proteases são aplicadas na indústria farmacêutica em medicamentos como digestivos e também no tratamento de ferimentos. Têm uso terapêutico como anticancerígeno, antifúngico, vermífugo, antiinflamatório e anticoagulante (MARQUARDT, 2003).

A hidrólise de proteínas pode ser realizada através de aplicações de métodos químicos convencionais ou através da aplicação de enzimas possibilitando o controle da hidrólise, o que gera melhoria das características do produto final a ser obtido. Além disso, o processo de hidrólise enzimática é mais simples, eficiente e envolve condições que não destroem as proteínas recuperadas (NERY et al., 2000).

Dessa forma, as proteases podem ser aplicadas em diferentes finalidades como na hidrólise de proteínas de origem animal ou vegetal como na remoção de carnes dos ossos de animais abatidos tornando-a matéria-prima para produção de gelatina, que é muito utilizada em produtos dietéticos; além de essas enzimas atuarem também na produção de substâncias que intensificam o sabor de alimentos produzidos nas indústrias como o ácido glutâmico (CARVALHO et al., 2009).

A produção dessas enzimas foi verificada por diversos autores por alguns microrganismos como *Thermomyces lanuginosus* (JENSEN et al., 2002; LI et al., 1997), *Aspergillus* sp. (CORAL et al., 2003; TUNGA et al., 2003), *Penicillium* sp. (GERMANO et al., 2003; HASHEM, 2000), *Mucor* spp. (MAHESHWARI et al., 2000) e *Rhizopus oryzae* (KUMAR et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2002). Buzzini e Martini (2002) verificaram a atividade enzimática proteolítica extracelular de microrganismos leveduriformes como *Pseudozyma Antartica* e fungos filamentosos.

2.4 AMILASES

Amilases são carboidrases e tem a função de hidrolisar as ligações glicosídicas dos monossacarídeos de carboidratos, sobre as ligações α -1,4 e α -1,6 que estão presentes no amido e no glicogênio (OBATA et al., 1977; KOBLITZ, 2008). Representam importantes enzimas industriais, de grande importância biotecnológica, tais como aplicações nas indústrias têxteis, de cervejas, bebidas destiladas, panificação, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2000; OLIVEIRA, et al, 2010).

Dentre as amilases fúngicas, as que apresentam maior interesse industrial são as α -amilase, β -amilase e amiloglucosidase (HARGER et al., 1982; OLIVEIRA, 2010).

Existem diversas aplicações para as amilases nos mais variados setores. Uma aplicação frequente ocorre na indústria têxtil, na qual a resistência dos fios de tecidos é minimizada com a aplicação de goma de amido que é posteriormente eliminada, e para que o tecido não seja prejudicado durante esse processo utiliza-se a aplicação de uma amilase de origem bacteriana, que atua em altas temperaturas (105-110°C) (WISEMAN, 1985). Além disso, na indústria alimentícia eliminam a turbidez produzida pelos amidos e reduzem a viscosidade dos sucos de frutas e do amido de cacau, transformando-o em dextrinas, melhoram a textura da massa de panificação, acelerando a fermentação realizada pelas leveduras (OLIVEIRA, 2010).

As α -amilases atuam sobre o amido gelatinizado e formam como resultado as dextrinas que são então hidrolisadas pelas β -amilases. No processamento da massa de pães a presença de açúcares na massa melhora as características do produto final influenciando a textura e o sabor da massa além da qualidade de tostagem do pão, o que pode ser obtido com a adição de enzimas amilolíticas na massa, principalmente porque não é usual a adição de açúcar nestes processos. As características favorecidas neste processo são a viscosidade e maciez da massa, além de conferir ao miolo um ótimo volume final, sedosidade e textura macia (VITOLLO, 2001; PASTOR et al., 2001; KOBLITZ, 2008).

Devido à produção em larga escala surgiu a necessidade de um processamento de frutos comestíveis em grande quantidade e a realização do armazenamento destes por longos períodos em baixas temperaturas e com isso faz-se necessário o emprego de enzimas

amilolíticas para que não ocorra problemas de turvação ou gelatinização durante o processamento (NEVES-SOUZA et al., 2005).

Podem ser produzidas por diversos microrganismos como bactérias e fungos, porém, as enzimas amilolíticas mais conhecidas são aquelas produzidas por fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus* (PANDEY, 1999 e SOARES, 2010).

Embora sejam diversos os microrganismos produtores de amilases destacando-se as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus* que têm sido empregadas em processos industriais na literatura científica são escassos trabalhos que estudem e verifiquem a secreção de amilases por leveduras por outros pesquisadores. (COSTA, 1996; PANDEY et al., 2000).

2.5 LIPASES

As lipases são triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3) que catalisam a hidrólise, principalmente de triglicerídeos, principais componentes de óleos e gorduras, e atuam muito melhor em substratos insolúveis em água, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol, além de exercerem papel fundamental no metabolismo dos lipídeos presentes nos seres vivos, como as enzimas digestivas (VITOLLO, 2001; KOBLITZ, 2008).

As lipases atuam na maturação de queijos liberando ácidos graxos que garantem as características organolépticas do produto final, reduzindo o tempo necessário para maturação do queijo e consequentemente reduzem o tempo e custos com o processo, fatores que se refletem no produto final (WHITAKER, 1994; ANDRADE, et al., 2002).

Atuam também na fabricação de pães *light*, pois a ação das lipases é capaz de modificar os próprios lipídeos da massa, sem a complementação da produção com gorduras adicionais. A hidrólise de triglicerídeos da massa favorece a capacidade de retenção de ar por esta, o que produz um pão com textura mais macia e fornece uma capacidade de retenção de água à massa, prolongando a vida de prateleira do produto. (GACESA e HUBBLE, 1990).

As lipases também são aplicadas na produção de margarinas por meio da interesterificação de um óleo e devido à mistura de ácidos graxos saturados com insaturados nos triglicerídeos resultantes fornecem um produto com a textura desejada a uma margarina

de boa qualidade, que é o espalhamento eficaz em temperatura de refrigeração e cremosidade (BEISSON, et al., 2000; CONESA, et al., 2002).

A aplicação de lipases na indústria de detergentes é bastante difundida, pois estas moléculas aplicadas nas formulações de sabões e detergentes reduzem o tempo e a temperatura da lavagem dos tecidos, resultando em um processo com menores gastos de energia. Além de serem também aplicadas no tratamento de efluentes de indústrias reduzindo a camada lipídica superficial que fica sobre o efluente e dificulta a aeração nos tanques (GANDHI, 1997).

As lipases também são aplicadas na indústria de alimentos sintetizando aromas a partir de um álcool e de um ácido originando o butirato de etila responsável pelo aroma de morango e acetato de isoamila, que é o aroma de banana (KOBBLITZ, 2008).

As lipases de origem microbiana são muito utilizadas devido às características de estabilidade e crescimento rápido dos microrganismos e devido a esses fatores têm despertado interesse de diversos pesquisadores em descobrir novas fontes através da seleção de microrganismos (GONÇALVES, 2007).

Recentemente, as lipases estão sendo muito estudadas devido ao seu potencial de aplicação na produção de biodiesel através de sua capacidade de realizar reações de transesterificação (Figura 1). A utilização de biodiesel como fonte de bicomcombustível em substituição ou adição aos combustíveis de origem fóssil tornou-se obrigatória a partir da Lei nº 11.097, publicada em 13/01/2005, e desde 1º de julho de 2008, o percentual de biodiesel adicionado ao óleo diesel comercializado em todo o Brasil aumentou de 2% para 3%, regra estabelecida pela Resolução nº 2 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). Na tentativa de produzir um combustível mais sustentável, pesquisas vêm sendo feitas no sentido de viabilizar a transesterificação enzimática em escala industrial a partir dessa enzima através da seleção de microrganismos bons produtores destas, pois originam um produto de alta pureza, de fácil recuperação e de fácil separação do glicerol (PINTO et al. 2005; FALCONE, 2009).

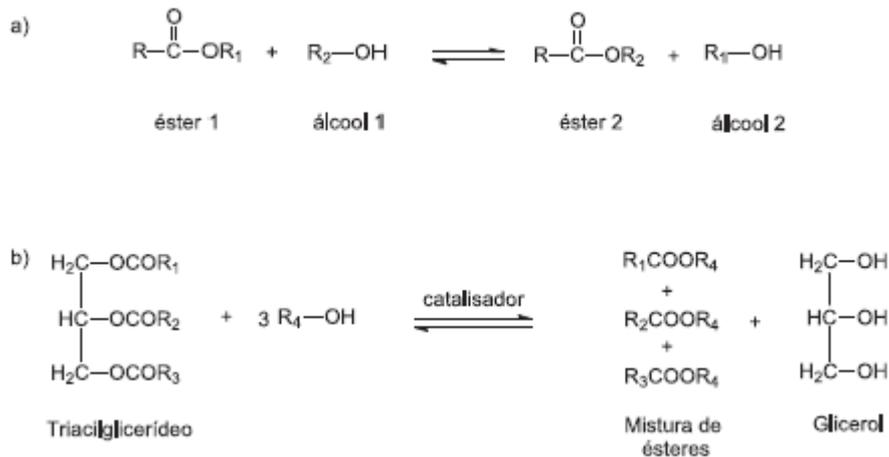


Figura 1: a. Equação geral para uma reação de transesterificação b. equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.

Fonte: adaptado de Geris, 2007.

Diversos pesquisadores têm realizado o isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipases das mais variadas fontes, dentre os fungos, os reportados como melhores produtores são os dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Theromyces* (GONÇALVES, 2007).

Dentre as leveduras, tem-se o registro de algumas preconizadas como boas secretoras de lipases, sendo elas pertencentes ao gênero *Candida*, e dentre elas as mais importantes, descritas como de grande aplicação industrial por produzir em grandes quantidades esta enzima são as *Candida rugosa* e *Candida antarctica* (GACESA e HUBBLE, 1990; COLEN, 2006).

2.6 PECTINASES

As pectinases, exceto as pectinametil-esterases, são enzimas que atuam sobre as ligações do tipo α -1,4 do ácido galacturônico. As células das plantas vegetais superiores são constituídas de carboidratos poliméricos coloidais denominados de substâncias pécnicas e formadas por unidades de ácido galacturônico (VITOLLO, 2001).

Pectinases são utilizadas frequentemente na indústria de sucos de frutas e fabricação de vinho, tendo como principal fonte o fungo filamentosso *Aspergillus niger* (OLIVEIRA, 2006). A adição de pectinases no processamento de sucos contribui para redução da viscosidade e aumento da quantidade de sólidos solúveis presentes no produto final (GODFREY e REICHELT, 1983; PZSCZOLA, 2001). As polpas de frutas são difíceis de ser prensadas e a adição destas enzimas na polpa dissolve a pectina e facilita o rompimento das paredes celulares, o que aumenta o rendimento da extração do suco e torna o processo muito mais eficiente (PEREIRA, 2002; MARQUARDT, 2003).

As antocianinas, pigmentos que conferem a coloração avermelhada das frutas, são substâncias difíceis de ser removidas. A adição de pectinases realiza a hidrólise da parede celular e libera esses compostos muito utilizados na fabricação do vinho tinto, o que diminui consideravelmente o tempo de maceração da casca no mosto (VITOLLO, 1981; VENDRUSCOLO, 2005). Outro processo em que as enzimas atuam é o descascamento enzimático com a hidrólise de frutas cítricas, que atua principalmente entre a casca e a polpa separando as porções da fruta, que após a reação de hidrólise podem ser utilizadas para produção de sucos ou vendidas como produtos minimamente processados por diversas indústrias (VITOLLO, 2001).

Bastos et al. (2002) também avaliaram a capacidade das leveduras secretarem enzimas pectinolíticas, objetivando sua aplicação na melhoria da qualidade da extração da polpa de cupuaçu e observaram que o rendimento com adição da preparação enzimática comercial de pectinases foi superior de 43 a 60% quando comparado a extração da polpa sem o preparado comercial. Sanchez et al., (1984), estudaram a atividade pectinolítica de leveduras isoladas na Costa do Marfim durante a fermentação do cacau. Biely e Sláviková (1994) identificaram os gêneros: *Ambrosiozyma*, *Aureobasidium*, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Georrichum*, *Klyuveromyces*, *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Saccharomycopsis*, *Strephanoascus*, *Trichosporon* e *Ustilago* como produtores destas enzimas. Além disso, as pectinases podem ser também produzidas por bactérias, fungos filamentosos, insetos, nematóides e protozoários (HOONDAL et al, 2002).

2.7 CELULASES

Celulases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades de glicose. As celulases podem romper as ligações glicosídicas da celulose, liberando oligossacarídeos e glicose (VITOLLO, 2001). Podem ser aplicadas nas indústrias de alimentos, fármacos, cosméticos, detergentes e tecidos. Dentre suas aplicações nas indústrias têxteis, destacam-se a bioestonagem e o biopolimento, melhorando a qualidade do tecido (CALADO et al., 2007). São aplicadas também na indústria de sucos, na liquefação do tecido vegetal e na extração de pigmentos de frutos que normalmente é muito difícil por estarem concentrados nos tecidos epiteliais mais complicados de se desintegrar do que a polpa devido à baixa permeabilidade das membranas e das paredes celulares (VITOLLO, 2001; KOBLITZ, 2008).

A remoção dos pigmentos também pode ser realizada com a utilização das enzimas celulolíticas que além de obter um suco facilmente separado dos componentes celulares agindo diretamente sobre o tecido vegetal dispensa os processos de prensagem e separação do suco (MACIEL 2006). Outra etapa em que essas enzimas atuam no processamento de sucos é na clarificação destes no intuito de reduzir a sua viscosidade, permitindo assim que as substancias insolúveis tornem-se solúveis (SHARROCK, 1988).

O estudo de Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) identificaram a secreção dessas enzimas pelos microrganismos do gênero *Trichoderma*. Além disso, espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também têm sido citadas como boas produtoras destas enzimas.

Os fungos filamentosos com capacidade de atividade celulolítica podem ser isolados de diversas fontes desde manguezais (SOUZA et al., 2009), até mesmo a partir do isolamento da microbiota de invertebrados marinhos (SILVA, 2010) e do solo (RUEGUER e TAUK-TORNISIELO, 2004) Tabela 02. As enzimas podem ser obtidas a partir do cultivo submerso (CALADO et al., 2004) ou de substrato sólido. Isso demonstra a grande variabilidade de microrganismos com potencial para secreção dessas enzimas uma vez que diferentes espécies apresentaram atividade celulolítica.

Tabela 02. Microrganismos produtores de celulases.

Microrganismos	Referências
Fungos filamentosos	Rueguer e Tauk- Tornisielo (2004)
<i>Humicola grisea</i>	Calado et al. (2004)
Fungos filamentosos isolados de manguezais	Souza et al. (2008)
<i>Aspergillus</i>	Soares et al. (2010)
Fungos, filamentosos e leveduriformes, provenientes do isolamento a partir de invertebrados marinhos	Silva (2010)

2.8 FOSFOLIPASES

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que tem a capacidade de atuar sobre um ou mais ésteres ligados a glicerofosfolipídios e se diferenciam pelas ligações éster específicas que hidrolisam no substrato. A secreção dessas enzimas em grande quantidade pelos microrganismos geralmente está associada com a patogenicidade destes, pois estas moléculas conferem um fator de virulência aos fungos (COSTA, 2006). Essas enzimas atuam sobre membranas celulares e realizam o rompimento dos fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídeos e são diferenciadas pelo sitio de hidrólise no qual atuam (SANTOS, 2009).

De acordo com Komiyama et al., (2007) a produção dessas enzimas representa importante mecanismo de patogenicidade nas espécies de *Candida albicans*, possivelmente por facilitar sua penetração nos tecidos através da clivagem dos fosfolipídeos, que destrói a estabilidade da membrana e causa a lise celular. Diversos trabalhos têm verificado a produção dessas enzimas. Price et al. (1982); Saramanayake et al. (2002) e Costa (2006) identificaram dentro do gênero outras espécies patogênicas como *Candida tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* como bons produtores de fosfolipases.

Além disso, as fosfolipases podem ser aplicadas em diversas áreas na indústria de alimentos como emulsificantes e também em reações de interesterificação de fosfolipídeos, além de serem utilizadas em produtos para panificação, no processamento de gorduras e óleos e na extração de componentes vegetais (FELLOWS, 2006).

2.9 ENZIMAS NA FERMENTAÇÃO DO CACAU

Durante o processo fermentativo as amêndoas são empilhadas em caixas e ocorre a separação da polpa mucilagínosa, rica em açúcar, que é consumida pelas leveduras liberando álcool etílico, em seguida as leveduras sofrem autólise, liberando as enzimas que atuam no processo. O etanol produzido é oxidado a ácido acético com o auxílio das bactérias acéticas que tornam o tegumento permeável, fazendo com que as amêndoas sofram a ação das enzimas que são responsáveis pelas características que compõem o *flavor* do produto final (OETERRER et al., 1996; FELLOWS, 2006; AFOAKWA et al., 2009). Para que as amêndoas de cacau possam originar o sabor e o aroma característico de um chocolate de excelente qualidade é imprescindível que sejam fermentadas, secas e torradas num processo de complexas reações enzimáticas e químicas como a hidrólise de açúcares e proteínas, liberação de enzimas, difusão de compostos fenólicos e morte do embrião (FORSYTH e QUESNEL, 1957).

As enzimas atuam neste processo de diversas maneiras, como as polifenoloxidasas que oxidam os polifenóis presentes nas sementes em quinonas proporcionando o escurecimento enzimático (BRITO, 2000; EFRAIM, 2010). A fermentação completa das sementes é diretamente proporcional à qualidade do chocolate. O aroma e sabor característicos são obtidos pela formação dos precursores químicos do *flavor*, pois as sementes não fermentadas geralmente são amargas e adstringentes, e as parcialmente fermentadas são amargas (KATTENBERG e KEMMINK, 1993; CALIGIANI et al., 2007). O escurecimento não enzimático é proveniente da acumulação de compostos insolúveis como polifenóis, 60% desses compostos são flavanóis (BRITO, 2000). Na fermentação completa do cacau a secreção de algumas enzimas por microrganismos é muito útil como a produção de enzimas pectinolíticas que, em contato com o substrato, podem melhorar a aeração da massa; enzimas amilolíticas, que produzem o aumento da concentração de açúcares redutores pela hidrólise do

amido e as enzimas proteolíticas que geram a melhor concentração de aminoácidos livres. Todas estas enzimas são requeridas para a formação do *flavor* do cacau (AMIN et al., 1998; SCHWAN, 1998).

Depois de fermentadas, as amêndoas são secas e torradas a 7% de umidade, o que estabiliza o sabor e produz o aroma e a cor característicos do chocolate, pois muitas das reações bioquímicas iniciadas na fermentação continuam na secagem como as reações de oxidação que proporcionam redução da acidez das amêndoas, além do escurecimento dos cotilédones (ROHAN e STEWART, 1967; LOPEZ e QUESNEL, 1973; BECKETT, 1994), redução do teor de compostos fenólicos que são responsáveis pelo amargor e adstringência ao sabor (OETERRER et al., 1996; FELLOWS, 2006; DOMINGUES, 2010) e remoção de compostos indesejáveis formados durante a fermentação, como por exemplo, o ácido acético. A secagem não deve ser lenta para evitar o crescimento de fungos contaminantes, que podem originar um sabor desagradável ou gerar toxinas no produto final (GARCIA, 1985).

Todas essas etapas são essenciais para que ocorra a obtenção dos precursores do sabor característico dos produtos do cacau (OETERRER et al., 1996; FELLOWS, 2006; AFOAKWA et al., 2008; EFRAIM et al., 2010; DOMINGUES, 2010). A aplicação de inóculos iniciadores, uma ou mais linhagens de microrganismos com características desejáveis, no início da fermentação aliado ao uso de matéria-prima de qualidade é uma ferramenta que garante o controle da qualidade e valoriza o produto final (SCHWAN, 1998).

2.10 ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS

Diante das inúmeras vantagens do uso de enzimas mencionadas anteriormente, muitas pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de viabilizar o processo de produção destas em escala industrial, principalmente no que diz respeito à redução do custo de sua aplicação. (JAEGER e EGGERT, 2002).

As enzimas provenientes de microrganismos podem ser obtidas por fermentação, submersa ou por fermentação em substrato sólido, seguidas de processos posteriores de recuperação e purificação do produto. As enzimas utilizadas em indústrias são preferencialmente imobilizadas devido à capacidade de reutilização desta pela fácil separação,

maior estabilidade, fatores que reduzem os custos de utilização de enzimas nas indústrias (JESUS et al., 1997). A imobilização pode ser realizada em suporte por adsorção e encapsulação (PINHEIRO et al., 2005).

Dessa maneira, é recorrente a busca pelos pesquisadores atualmente por novas fontes de microrganismos com alta atividade enzimática e que produzam moléculas com diferentes propriedades e especificidades, visando à redução dos custos na aplicação de enzimas em tecnologias industriais por meio de novos processos de produção ou adaptando os já existentes, o que agrega alto valor comercial a essas moléculas (KAMINI et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Prospecção da atividade enzimática extracelular de importância industrial de leveduras isoladas da fermentação do cacau

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reativar as amostras de leveduras previamente isoladas que foram testadas no trabalho;
- Verificar a viabilidade e pureza das amostras por meio da observação em microscopia óptica;
- Observar a produção de enzimas extracelulares como proteases, lipases, amilases, celulasas e pectinases de interesse industrial secretadas por leveduras isoladas da fermentação do cacau de municípios de Ilhéus e Una/BA, pela metodologia de *cup plate*;
- Verificar a produção de enzimas extracelulares, por meio de testes titulométricos e espectrofotométricos.
- Contribuir com informações biotecnológicas com o acervo de leveduras da CCMB (Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia/UEFS).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDÊNCIA DAS LINHAGENS DE LEVEDURA

As linhagens de leveduras utilizadas neste estudo foram isoladas por Ferreira (2007) a partir de fermentações de cacau do sul da Bahia. As linhagens foram depositadas na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

4.2 REATIVAÇÃO

Setenta linhagens de levedura foram inoculadas separadamente em placas contendo ágar Sabouraud (20g/L de glicose, 5g/L extrato de levedura, 10g/L de peptona e 20g/L de ágar) para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas a 28° C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48 h. As colônias obtidas foram avaliadas macroscopicamente através da morfologia. Para a avaliação microscópica foram preparadas e observadas lâminas coradas pelo método de Gram. As linhagens que não cresceram em ágar Sabouraud foram inoculadas em meio líquido GYMP (2g de glicose, 0,5g de extrato de levedura, 1g de extrato de malte, 0,2g de fosfato de sódio em 100 mL de água deionizada) e incubadas a 28°C sob agitação constante de 200 rpm por 24 horas e, em seguida, estas linhagens foram semeadas em placas contendo ágar extrato de malte e incubadas a 28° C por 48 horas.

4.3 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

As linhagens de leveduras consideradas puras estão sendo mantidas a – 80°C em tubos criogênicos de 1,5 mL contendo meio GYMP adicionado de 10% de glicerol.

4.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Para a padronização do inóculo, as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud e incubadas a 28°C por 24 h. Os inóculos das leveduras foram padronizados em solução salina estéril a 0,45% na escala 3 de McFarland (Colorímetro VITEK, bioMérieux), quantificando aproximadamente a 5×10^5 células/mL.

4.5 CULTIVO EM MEIO DE INDUÇÃO

Após padronização, 50 µL da suspensão microbiana (conforme descrito anteriormente) foram transferidos separadamente para tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de indução composto de fosfato de amônio (7 g/L), fosfato dibásico de potássio (1,5 g/L), sulfato de magnésio (0,5 g/L), cloreto de cálcio (0,3 g/L), solução de elementos traços 2,5 mL/L (0,1 g de sulfato ferroso; 0,1 g de cloreto manganoso; 0,1 g de sulfato de zinco em 100 mL de água destilada) e pH 7. A este meio foram adicionados separadamente carboximetilcelulose (1 g/L) para a verificação da produção de celulase; amido (1 g/L) para a produção de amilase; pectina cítrica (1 g/L) para pectinases; gelatina e caseína (1 g/L) para as proteases; gema de ovo e água em uma mistura proporcional de 0,5 mL de cada, totalizando 1 mL/L para as fosfolipases; óleo de mamona, óleo de dendê e manteiga de cacau (1 g/L) para lipases. Os tubos foram incubados sob agitação constante a 150 rpm a 28° C por 48 horas.

4.6 ENSAIO QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DAS ENZIMAS

O ensaio qualitativo para detecção das enzimas (*Cup Plate*), metodologia modificada de Dingle et al. (1953) foi realizado em meio sólido de caracterização. A composição dos substratos para atividade enzimática adicionados nos meios de caracterização foram os mesmos acrescentados nos meio de indução com exceção da produção da enzima protease onde foi necessário adicionar leite em pó desnatado a 1%.

Os meios de caracterização foram adicionados de ágar a 2% e calibrados para os valores de pH 5, 7 e 9 antes da autoclavagem. Após o plaqueamento foram feitas perfurações circulares, com diâmetro de 6 mm. Um mililitro do cultivo em meio de indução foi centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos sob refrigeração a 4°C para separação da biomassa e 150 uL do sobrenadante foram transferidos para cada perfuração. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após este período foi realizada a visualização dos resultados. A produção de enzimas se evidenciou pelo surgimento de halos ao redor do ponto de aplicação. A atividade enzimática obtida pela reação em placa foi determinada semi quantitativamente através da média do diâmetro dos halos degradativos mensurados com o auxílio de uma régua milimetrada. Desta forma, quanto maior o halo degradativo maior o índice enzimático e, portanto, conseqüentemente, maior a atividade enzimática. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.6.1 Atividade de celulase

Para análise da atividade celulase foi adicionado 10 mL de vermelho congo (0,1 g/100 mL), pH 8,0 sobre as placas como revelador. Após 30 minutos este foi desprezado e sobre a placa foram adicionados 5 mL de uma solução de NaCl (0,5M) pH 8,0 que após 5 minutos foi descartada. O resultado da reação enzimática positiva foi identificado pela formação de um halo translúcido, ao redor do *cup plate*.

4.6.2 Atividade de amilase

Para análise da atividade amilolítica foram adicionados 3 mL de solução de iodo (0,1 g/100 mL) e a leitura foi realizada logo em seguida. O resultado da reação enzimática positiva foi identificado pela formação de um halo amarelado ao redor do *cup*.

4.6.3 Atividade de pectinase

Para análise da atividade pectinase foi dispensado sobre o ágar uma solução de 3 mL de ácido clorídrico a 5N. O resultado da reação enzimática positiva foi identificado pela formação de um halo translúcido ao redor da perfuração.

4.6.4 Atividade de lipase

Para determinação da atividade lipase adicionou-se antes de distribuir o meio na placa uma solução de rodamina B (0,3 mL/100 mL) obtida da solução diluída de 1 g para 50 mL de água destilada estéril e previamente esterilizada através de filtração em membrana (poro 45 µm). A revelação foi realizada em transiluminador de luz UV a 310 nm. Como resultado positivo foi possível observar a mudança de coloração, tornando-se alaranjado fluorescente, quando irradiadas com luz ultravioleta, ao redor do ponto de aplicação.

4.6.5 Atividade de protease e fosfolipase

Para avaliação da atividade protease e fosfolipase foi considerada positiva a visualização de um halo translúcido ao redor do ponto de aplicação depois de decorrido o tempo de reação, sem a necessidade de adição de revelador.

4.7 TITULAÇÃO

A atividade lipolítica em fermentação submersa foi analisada sobre manteiga de cacau, óleo de mamona e óleo de dendê, onde 1 g de cada substrato foi introduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 4 mL de água destilada e 10 pérolas de vidro. Em seguida foram adicionados 1 mL do extrato enzimático livre de células. Os frascos foram incubados a 50°C em banho-maria sob agitação a 150 rpm por 30 min. Então a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram, então, titulados com uma solução de NaOH (0,05 M), utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador de pH cujo ponto de viragem foi detectado pelo surgimento de uma coloração rósea no meio. O volume de solução de NaOH gasto em cada titulação foi anotado. O controle (branco) foi preparado diferenciando-se pela adição de 1 mL de água destilada no lugar da amostra. Os testes foram realizados em triplicata para cada microrganismo obtendo-se a média aritmética para cálculo da atividade lipolítica.

Uma unidade de atividade lipolítica (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácidos graxos por minuto de reação, utilizando a seguinte equação:

Onde lê-se:

$$UA = \frac{(V_a - V_b) * 1000 * M_{\text{NaOH}}}{t(\text{min}) * V_{\text{aliquota}}}$$

- UA é o número de unidades de enzima no volume testado (1 mL) expresso em μ moles de ácido graxo/tempo de reação,
- $V_a - V_b$ é o volume (mL) de solução necessária para titular os ácidos graxos da solução enzimática menos o volume gasto para titular os ácidos graxos contidos no branco da amostra,
- M_{NaOH} é a normalidade da solução de NaOH utilizada,

- t é o tempo de reação, em minutos,
- V volume de inóculo (mL) utilizado na reação enzimática.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PECTINA METILESTERASE (PME) EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.8.1 Preparação das amostras para os ensaios enzimáticos

O processo de fermentação submersa foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Departamento de Engenharia da UEFS. Para se efetuar as fermentações, 5 mL do meio de indução das leveduras contendo células metabolicamente ativas, padronizados conforme item 4.4, foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm, a 28°C, durante 48 h. Logo após a fermentação, as amostras foram transferidas assepticamente para tubos de polipropileno de 1,5 mL. A mistura foi centrifugada a 3.500 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi então homogeneizado e transferido para outros tubos de polipropileno de 1,5 mL e conservados em freezer a -1°C até o momento da análise, não ultrapassando o período de 7 dias. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata. A determinação da unidade de atividade da pectina metilesterase foi adaptada de Zocca et al. (2007) e Tiwari et al. (2009) com base na taxa de proteínas formados, os quais absorvem a 620 nm. Preparou-se, inicialmente, uma solução de pectina cítrica a 0,5% (p/v), pH 7,5 e uma solução de azul de bromotimol a 0,04% em tampão fosfato 0,01M pH 7,5, acrescido de NaCl a 0,15M.

A reação constitui-se de 2 mL da solução de pectina, 0,75 mL de água destilada, 0,15 mL da solução de azul de bromotimol, e 0,1 mL da solução de extrato enzimático da amostra adicionados em tubos de ensaio num volume final de 3,5 mL que foi misturado e homogeneizado. A mistura então foi incubada a 45° C em banho-maria por 24 h. Logo após este período foi realizada a leitura a 620 nm em espectrofotômetro UV (Varian, Cary 50) contra um branco. O branco foi realizado com extrato enzimático fervido por 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a redução de 0,001 unidades de absorbância por minuto de reação.

A unidade de atividade da pectina metilesterase foi obtida através da seguinte fórmula:

$$UA = [(B - X)] \times 1000 / 0,1$$

Onde lê-se:

- UA é o número de unidades de enzima no volume testado (1 mL) expresso em μ moles de ácido graxo/tempo de reação,
- B é branco do teste,
- X é a média dos testes expressa pelo valor da absorbância definido no espectrofotômetro.

4.9 ATIVIDADE DE PROTEASES EXTRACELULARES PRODUZIDAS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a determinação da atividade de protease em fermentação submersa foi utilizado o meio reacional composto de uma solução de caseína a 2%. Para a reação foram adicionados 1,5 mL de solução de caseína em 1 mL de tampão fosfato pH 7. Todos os tubos de ensaio foram incubados a 40°C por 15 minutos em banho-maria. Em seguida, a cada tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de solução enzimática e após 30 minutos de incubação, foi adicionado 3 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 0,4 M para interromper a reação enzimática. Então, o extrato enzimático foi centrifugado durante 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante transferido para outros frascos estéreis e armazenado em freezer a -1°C até a leitura em espectrofotômetro sob luz UV a 280 nm, não ultrapassando o período de 7 dias.

Os testes foram realizados em duplicata para cada microrganismo. O branco foi preparado com adição de água ao invés do extrato enzimático. A leitura foi obtida a 280 nm, sob luz UV no qual a cada aumento de 0,001 na absorbância por minuto de reação correspondeu a uma unidade da enzima.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das atividades enzimáticas foi realizada de acordo com um delineamento experimental completamente casualizado, com duas ou três repetições, aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o programa estatístico de análise de variância ANOVA para comparar as médias dos tratamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DAS ENZIMAS (*CUP PLATE*) PECTINASES, PROTEASES, AMILASES, CELULASES E FOSFOLIPASES

Setenta linhagens de leveduras foram testadas quanto à secreção de enzimas extracelulares, e dentre estas, 56 (80%) apresentaram resultados positivos para a secreção de pelo menos uma enzima em um dos valores de pH testados e 14 (20%) apresentaram resultados negativos para todas as enzimas (Gráfico 1). A ausência de atividade pode ser atribuída à incapacidade de secreção; ao direcionamento da produção ao metabolismo intracelular ou à insuficiência dos métodos de detecção (VASCONCELOS et al., 2003). O halo para ser visualizado depende de diversos fatores: além dos parâmetros físicos e químicos há a interferência da presença de outras substâncias presentes no meio que podem originar resultados positivos pela reação com os corantes, ou negativos, por precipitar o corante e ainda por inibir a ligação da enzima com o substrato (NEIROTTI e AZEVEDO, 1988; COLEN, 2006). Além disso, a atividade enzimática dos microrganismos pode sofrer interferência tanto dos fatores biológicos bem como físico-químico como pH e temperatura (SANOMIYA e NAHAS, 2003; MACCHERONI et al., 2004)

De acordo com Giongo et al. (2006) e Gonçalves et al. (2007), a difusão da enzima e, conseqüentemente, o tamanho do halo hidrolítico é influenciado pelo peso molecular que a enzima possui que pode impedir de difundir pelo ágar e dessa forma, a atividade pode ser considerada inexistente mesmo havendo a secreção da enzima e presença dela em grande quantidade no extrato enzimático extraído devido somente a dificuldade da difusão desta.

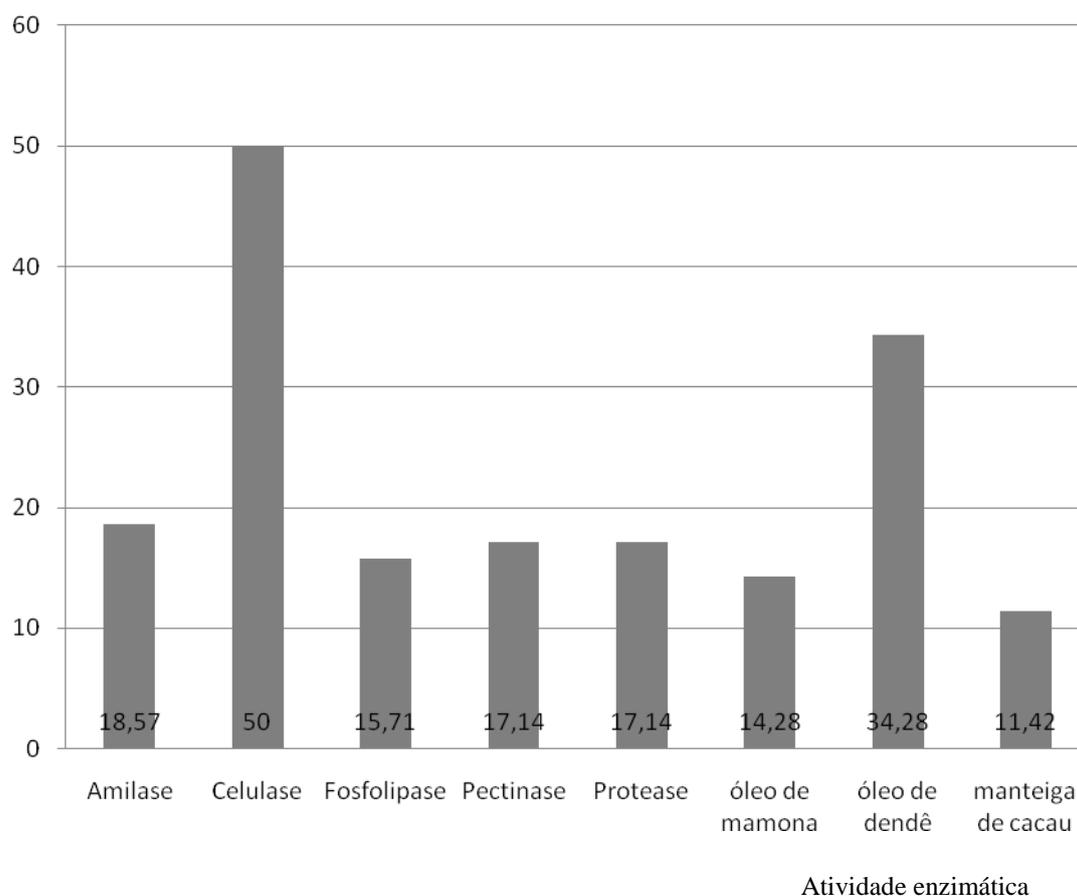


Gráfico 1. Porcentagem de leveduras positivas quanto à atividade enzimática verificados pela observação de halo produzido pela atividade do extrato obtido do cultivo a 28°C por 48h e caracterizado a 37°C com 24h.

5.2 ATIVIDADE DE AMILASE

Foram obtidas a melhor atividade amilolítica para 13 leveduras (18,57%) testadas, o que pode ser visualizados na Tabela 03 e Gráfico 1. Os melhores resultados de halos amilolíticos foram obtidos para a linhagem *P. membranifaciens* C-2.32/2 que apresentou halos de 1,8 mm em pH 5; 1,5 mm para pH 7 e 1,9 mm em pH 9 (Figura 2). Em relação ao pH não foi detectado nenhum que demonstrasse ser melhor para as atividades uma vez que todas secretaram enzimas nos três valores de pH. A atividade amilolítica do presente trabalho foi também encontrada por Bastos (2005) em isolados de *Moniliophthora perniciosa*, quanto à capacidade de produção desta enzima. Na literatura científica são escassos os trabalhos que encontraram atividade amilolítica positiva secretada por leveduras que foi positiva neste

estudo para 13 leveduras o que demonstra o grande potencial, ainda pouco explorado, das leveduras em secretar essas enzimas.

Tabela 03. Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de amilases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).

Linhagem/pH	5	7	9
<i>P. membranifaciens</i>	1,8 mm	1,5 mm	1,9 mm
C - 2. 32/2			
Total de Linhagens positivas	9	6	3

Souza et al. (2008) detectaram a presença desta atividade para fungos basidiomicéticos, sendo que foram positivos para 40% dos microrganismos testados. De acordo com Soares et al. (2010) as fontes de carbono obtidas dos substratos amido de farinha são as mais eficazes para a expressão de amilases.

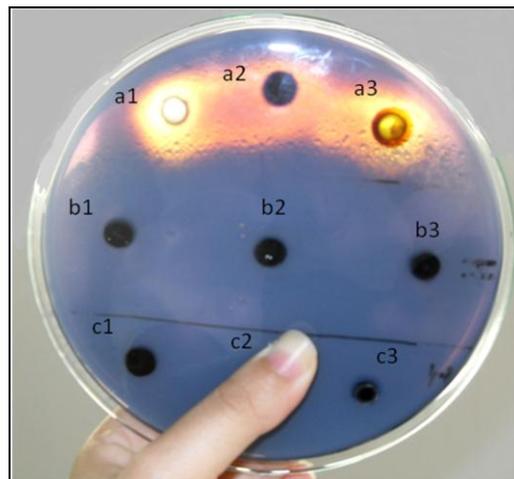


Figura 2. a. Halos de atividade amilolítica da linhagem *P. membranifaciens* C-2.32/2 obtido a partir do cultivo em meio de indução durante incubação por 48h, a 28°C e 150 rpm, e inoculado em meio sólido a 37°C por 24h,

pH 7. **b** e **c** representam a ausência de atividade amilolítica das linhagens *P. kluyveri* C - 2. 47 e *P. membranifaciens* C - 2. 62, respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.3 ATIVIDADE DE CELULASE

Dentre todas as enzimas secretadas pelas leveduras a celulase foi a que apresentou melhor resultado quantitativamente, sendo que das 70 leveduras testadas 35 (50%) foram positivas para esta atividade (Tabela 04 e Gráfico 1). As melhores atividades, demonstradas pelos maiores halos, foram encontradas em *C. krusei* C - 2. 17 de halo 1,4 mm em pH 5; *C. krusei* C - 2. 7 e *C. gropegiesseri* similar C - 1. 33/2 de halos 1,3 mm em pH 7 e halo de 1,2 mm para as linhagens de *C. krusei* C - 1. 155, C - 2. 91, e C - 2. 75; e para as linhagens de *P. membranifaciens* C - 2. 62 e C - 2. 75/2 em pH 9.

Tabela 04. Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de celulasas secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).

Linhagem/pH	5	7	9
<i>C. krusei</i> C - 2. 17	1,4 mm	-	-
<i>C. krusei</i> C - 2. 7	-	1,3 mm	-
<i>C. gropegiesseri</i> similar			
<i>C. krusei</i> C - 1. 155, C - 2. 91, e C - 2. 75	-	-	1,2 mm
<i>P. membranifaciens</i> C - 2. 62 e C - 2. 75/2			
Total de Linhagens positivas	17	22	20

A atividade celulolítica encontrada no presente trabalho foi similar a encontrada por Costa (1996), para *Aspergillus* cuja atividade é influenciada por diversos fatores como pH inicial, tempo de cultivo, concentração do substrato, agitação, concentração do inóculo, temperatura e tipo de substrato usado no meio de indução da atividade enzimática. Bocchini et al. (2002), Alam et al. (2008) e Martins et al. (2008), também descrevem essas variáveis como essenciais para que a produção dessa enzima por microrganismos seja eficiente.

5.4 ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE

Para as fosfolipases, 11 (15,71%) leveduras foram positivas. Os melhores halos para esta enzima foram obtidos de *Starmerella* sp.2 C - 1. 19/3 com 1,4 mm em pH 5 e no pH 7 para o isolado 1,3 de 2,7 mm de diâmetro. Quanto ao pH não foi detectada nenhuma atividade no pH 9, enquanto que para os demais valores obteve-se algumas leveduras positivas, demonstrando a diversidade de enzimas secretadas por esses microrganismos (Tabela 05 e Gráfico 1). Vasconcelos et al. (2003) constataram que amostras de fungos filamentosos apresentaram capacidade de produção de fosfolipases.

Tabela 05. Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de fosfolipases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).

Linhagem/pH	5	7	9
<i>Starmerella</i> sp.2	1,4 mm	-	-
C - 1. 19/3			
1,3	-	1,4 mm	-
Total de Linhagens positivas	6	6	-

5.5 ATIVIDADE DE PECTINASE

Foram positivas dentre as leveduras 12 (17,14%) para a atividade pectinolítica (Tabela 06 e Gráfico 1).

Tabela 06. Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de pectinases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).

Linhagem/pH	5	7	9
<i>P. membranifaciens</i> C - 1. 78	-	3,8 mm	-
<i>Candida</i> sp. 4 C - 1. 83/2	-	-	3,3 mm
Total de Linhagens positivas	-	8	10

Após analisados o tamanho ($\geq 2,0$ cm) dos halos degradativos percebeu-se que os melhores resultados foram em relação à esta atividade, atingindo no máximo o tamanho de 3,8 cm, apresentado pela levedura *P. membranifaciens* C-1.78, que obteve o melhor resultado para a secreção dessa enzima seguido de *P. membranifaciens* C-2.94 com halo de 3,5 mm; o isolado C-1.30 com 3,1 mm; *C. gropegiesseri* similar C - 1. 33/2 *Candida* sp. 4 C - 1. 83/2, com 3,0 mm e *Kloeckera apis* C - 2. 85 de halo 2,6 mm; todas em pH 7; *Candida* sp. 4 C - 1. 83/2 com halo de 3,3 mm e as linhagens 1,5 e 15 de halo 3,1 mm foram positivas para pH 9 (Figura 3). Os halos degradativos dentre todas as enzimas testadas foram com maior extensão para esta enzima. Embora em geral o pH ótimo dessa enzima seja 5, neste trabalho não foi

detectada nenhuma atividade neste valor, possivelmente devido ao fato de não apresentarem atividade nos parâmetros que foram testados.

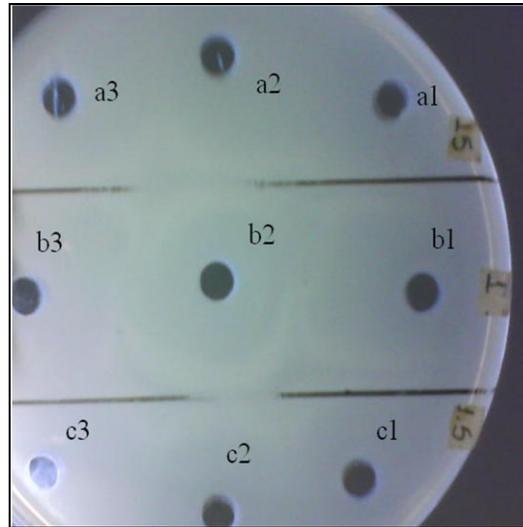


Figura 3. b. Halos de atividade pectinolítica da levedura 1 (ainda não identificada), em pH 7, obtido a partir do crescimento a 28°C, durante 48 horas, em meio de indução. **a** e **c** Ausência de atividade enzimática pectinolítica das leveduras 15 e 1.5, respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Sanchez et al. (1984) analisaram e verificaram que leveduras isoladas da Costa do Marfim da fermentação do cacau secretaram enzimas pectinolíticas capazes de hidrolisar a pectina do meio de cultura. Bastos et al. (2005) também avaliaram a capacidade das leveduras secretarem enzimas pectinolíticas.

Buzzini e Martini (2002) investigaram a atividade pectinolítica extracelular de microrganismos leveduriformes, e identificaram que isolados de *Aureobasidium pullulans* e *Pseudozyma antarctica* demonstraram capacidade de hidrolisar a pectina, sendo estes isolados de solo, água, inseto e materiais vegetais coletadas em florestas do Brasil.

Strauss et al. (2001) demonstraram que alguns isolados de *Kloeckera apiculata* poderiam ser aplicadas na produção de vinho devido a sua capacidade pectinolítica devido a formação de halo de degradação bem evidente. Essas leveduras poderiam ser selecionadas para fermentação de uvas, originando uma melhor clarificação no processo (OLIVEIRA, 2007).

5.6 ATIVIDADE DE PROTEASE

Para as proteases 12 linhagens (17,14%) foram positivas (Tabela 07 e Gráfico 1). Os halos foram de 2,1 mm de diâmetro para o isolado 16 em pH 5; *C. krusei* C - 2. 42 e o isolado 1,4 formaram halos de 1,6 mm de diâmetro em pH 7 e 9, respectivamente.

Tabela 07. Medida dos halos de degradação (em mm) da atividade de proteases secretadas extracelularmente pelas leveduras testadas obtidas após crescimento a 28°C, por 48 h, em meio de cultura suplementado com indutor para cada enzima e testada a 37°C por 24 h, em três valores de pH (5; 7 e 9).

Linhagem/pH	5	7	9
16	2,1 mm	-	-
<i>C. krusei</i> C - 2. 42	-	1,6 mm	1,6 mm
1,4	-	1,6 mm	1,6 mm
Total de Linhagens positivas	5	4	7

Esta atividade foi detectada para fungos filamentosos por Vasconcelos et al. (2003). Buzzini e Martini (2002) identificaram que *Candida magnoliae* e *Pichia anomala* apresentaram o máximo de atividade proteolítica em pH 6,5; enquanto que a espécie *Pseudozyma* sp. demonstrou ótimo de atividade em condições ácidas, no pH abaixo de 1, resultados que diferenciam-se dos obtidos no presente estudo em que no pH 9 houve o maior número de leveduras que secretaram a enzima (Figura 4).

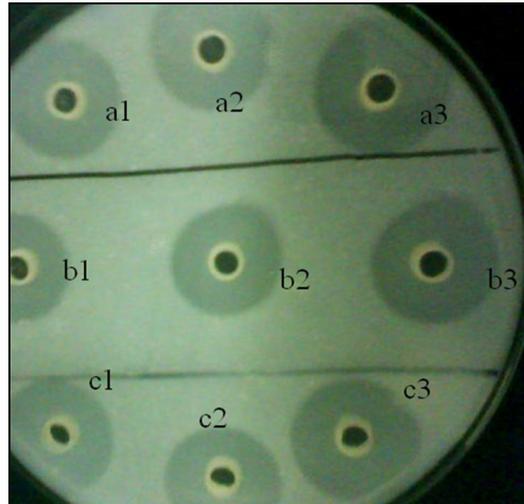


Figura 4. Halo de atividade proteolítica das linhagens **a.** 1.4 **b.** 3.1 e **c.** 16 obtidos a partir de cultivo em meio de indução durante incubação por 48h, a 28°C e 150 rpm, e inoculado em meio sólido a 37°C por 24h, pH 5. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.7 ENSAIO QUALITATIVO DE *CUP PLATE* PARA DETECÇÃO DE LIPASES

A atividade lipásica em meio sólido contendo o substrato específico detectou a formação de halo quando corantes reagiram com os ácidos graxos liberados, indicando atividade lipásica (GONÇALVES, 2007). Em relação à atividade de lipase em ensaio qualitativo foi observado que diversas leveduras foram secretoras de lipases extracelulares através da metodologia do *cup plate* com revelação sob luz ultravioleta a 310 nm, onde a coloração alaranjada fluorescente foi adquirida devido à constituição de complexos que surgem no ágar formados pelos ácidos graxos que sofreram a hidrólise pela ação da lipase e a rhodamina B presente no meio de cultura (LOCK, 2007).

As linhagens que mais se destacaram neste teste como boas secretoras de lipases extracelulares foram as que utilizaram óleo de dendê como substrato. Na Tabela 08 encontram-se os resultados dos testes revelando que 24 (34,28%) linhagens foram positivas para óleo de dendê; 10 (14,28%) para óleo de mamona e 8 (11,42%) para manteiga de cacau. Estes resultados podem indicar que os ácidos graxos produzidos pela hidrólise da lipase com o óleo de mamona e a manteiga de cacau não foram identificados pela especificidade da

enzima com o substrato óleo de dendê, ou não originaram um complexo com o corante, ou ainda, por se depositarem e não conseguirem atravessar a malha do ágar (LOCK, 2007).

No presente trabalho foram utilizados três substratos para a secreção das lipases em meio de cultivo sólido, outros autores também empregaram diferentes fontes de substratos a fim de verificar a melhor fonte para a secreção das lipases e constataram que é necessário padronizar a composição do meio de cultivo e os melhores parâmetros físico-químicos, pois estes irão interferir diretamente na produção das lipases (LOCK, 2007; COLLEN, 2006; ROVEDA et al., 2010).

C - 1. 83/2	<i>Candida</i> sp. 4	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C - 2. 2/2	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C - 2. 4/2	<i>K. apis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C - 2. 85	<i>K. apis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C - 1. 27/2	<i>K. marxianus</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-
C - 2. 47	<i>P. kluyveri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 41	<i>P. kluyveri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 1. 78	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C - 1. 161	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 1. 167	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 11	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 25	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C - 2. 26	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C - 2. 32/2	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 40	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C - 2. 61	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 62	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 63	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 71	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 73	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 75/2	<i>P. membranifaciens</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+
C - 2. 82	<i>P. membranifaciens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 93/2	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C - 2. 94	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C - 2. 101/1	<i>P. membranifaciens</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
C - 2. 126	<i>P. membranifaciens</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 21/1	<i>S. exigus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C - 1. 19/3	<i>Starmerella</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	+	-	+
C - 1. 18/1	*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 1. 30	*	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C - 1. 156	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 168	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 1. 186	*						+			
Nº total		70	70	70	70	70	70	70	70	70
Total de linhagens positivas		4	-	4	16	6	5	8	-	7
% de linhagens positivas		5,71%	0	5,71%	22,85%	8%	7,14%	11,42%	0	10%

(*) Leveduras que ainda não foram identificadas (+) Atividade positiva (-) Ausência de atividade enzimática *C. krusei* = *Candida krusei*, *K.apis* = *Kloeckera apis*, *P. membranifaciens* = *Pichia membranifaciens*, *K. marxianus* = *Kluyveromyces marxianus*, *C. parapsilosis* = *Candida parapsilosis*, *C. gropegiesseri* similar = *Candida gropegiesseri* similar, *P. kluyveri* = *Pichia kluyveri*, *S. exigus* = *Saccharomyces exigus*

Neste experimento, a avaliação qualitativa da atividade lipolítica foi obtida pela visualização de halos alaranjados fluorescentes pela irradiação de luz UV na presença de corante rodamina B ao redor dos pontos de aplicação em meio sólido formados pela presença das enzimas e, nesta metodologia, o corante pode influenciar diretamente nos resultados (Figura 5). Maciel et al. (2010) verificaram que a concentração do corante interferiu diretamente na obtenção dos resultados nos testes em placa. Esses pesquisadores verificaram que a concentração de 0,007% (m/v) foi a mais eficiente para detectar a atividade enzimática, o que contrapõe os resultados encontrados no presente trabalho, no qual foram observados halos lipolíticos numa concentração menor, de 0,00006% (m/v) de rodamina B.

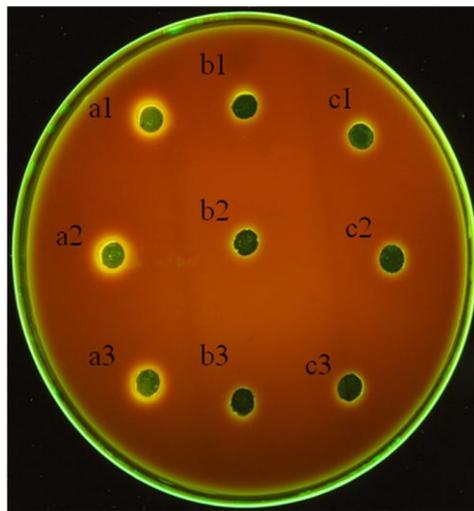


Figura 5. a Halos de atividade lipolítica da levedura *C. parapsilosis* C -2.68 sobre o substrato óleo de dendê obtido do extrato enzimático após crescimento em meio líquido por 48 h a 28°C, em pH 5. Cada poço representa uma levedura testada em triplicata na horizontal. **b e c.** Ausência de atividade enzimática lipolítica das leveduras *P. membranifaciens* C - 2. 126 e *C. krusei* C - 2. 9, respectivamente.

No trabalho de Lock (2007) dentre 56 amostras que foram testadas, 7 (26%) foram positivas quanto a produção de lipase extracelular pela formação de um precipitado composto de sais de ácido graxo. Nos resultados do presente trabalho a atividade lipolítica foi melhor nos valores de pH 5 e 7. Outros autores como, Kamini et al. (2000), Abbas et al. (2002), Fickers et al. (2006), Lock (2007) também detectaram pH 7 como o ideal para a atividade lipolítica de microrganismos.

De acordo com Shelley et al. (1987), a taxa de difusão no ágar depende diretamente da concentração da enzima. Portanto, o resultado do halo de atividade lipolítica produzido por uma enzima difundida no ágar em relação à outra é proveniente da concentração da proteína

no ponto de aplicação e não necessariamente de sua atividade enzimática. Segundo Thompson et al. (1999) e Collen (2006) os ácidos graxos liberados pela atividade das lipases podem ser de cadeia longa ou curta, sendo assim os ácidos graxos de cadeia longa não se difundem no ágar e formam halos mais definidos e próximos a colônia devido à pouca solubilidade em água, enquanto que os de cadeia curta por se difundirem na malha do ágar, não são tão bem definidos, possuindo tonalidade mais opaca e difusa.

Além desses fatores, a seleção de microrganismos produtores de lipases depende de outras variáveis que se relacionam como as condições de crescimento da cepa, produção da enzima, bem como a especificidade desta pelo substrato utilizado no experimento, e os parâmetros definidos no teste devem contemplar a condição ótima de atuação de todos estes fatores. Portanto os testes em placa de detecção da enzima não devem ser utilizados para comparações quantitativas, e essas interferências podem ser eliminadas com a padronização das condições de crescimento e dos parâmetros físico-químicos do teste (COLLEN, 2006).

5.8 TESTES QUANTITATIVOS DE DETECÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.8.1 Testes de Titulação

Os testes titulométricos são baseados na verificação da presença de ácidos graxos em solução de NaOH pela reação da enzima com o substrato, na presença de fenolftaleína como indicador. Os íons de hidrogênio são liberados pela dissociação dos ácidos graxos pela ação das lipases sobre as moléculas do triglicerídeo. É uma técnica muito utilizada pela sua simplicidade, precisão e reprodutibilidade (COLLEN, 2006; GONÇALVES, 2007; LOCK, 2007; FARIA, 2010) (Figura 6). A obtenção da enzima envolve a interação de diversas variáveis como a composição do meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e indutores), condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração (FEITOSA, 2010).

Apesar das lipases serem solúveis em água, catalisam reações de hidrólise sobre substratos insolúveis, os triglicerídeos, agindo na interface entre o substrato lipídico e a água.

Assim que as reações ocorrem o substrato é consumido e formam-se os produtos da hidrólise, modificando a composição da interface óleo-água. Dessa forma, a atividade catalítica é influenciada tanto pela concentração do substrato como pela área de interface do substrato com a água (WATANABE et al., 1977; FARIA, 2010).



Figura 6. Análise da atividade enzimática extracelular do extrato enzimático livre de células utilizando como substrato a manteiga de cacau, o óleo de mamona e o óleo de dendê cujos ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de NaOH (0,05M), utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador de pH e ponto de viragem detectado pelo surgimento de uma coloração rósea no meio.

No presente trabalho foram utilizados três substratos para a secreção das lipases em meio de cultivo líquido (Gráfico 2), outros autores também empregaram diferentes fontes de substratos a fim de verificar a melhor fonte para a produção das lipases e constataram que é necessário padronizar a composição do meio de cultivo, pois este irá interferir diretamente na produção das lipases (COLLEN, 2006; LOCK, 2007; ROVEDA et al., 2010).

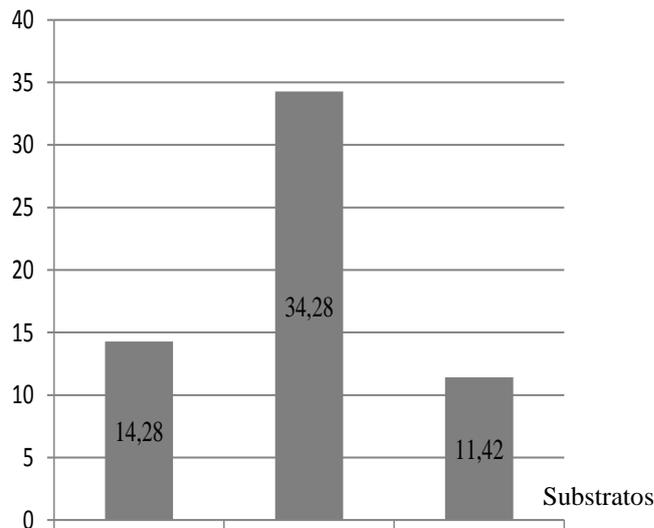


Gráfico 2. Porcentagem de leveduras positivas verificadas a partir de testes quantitativos titulométricos nos substratos óleo de mamona, óleo de dendê e manteiga de cacau para atividade lipolítica.

Neste experimento os resultados utilizando o substrato óleo de dendê foram mais expressivos, pois 23 (32,85%) dos isolados apresentaram resultados maiores que 1,0 U/mL, sendo que destacaram-se o isolado C - 1. 156 que apresentou 2,25 U/mL de atividade e *Pichia membranifaciens* C - 1. 161 com 2,21 U/mL (Tabela 09). Nos isolados testados com o óleo de mamona apenas 3 leveduras apresentaram valores de atividade enzimática maiores que 1,0 U/mL enquanto que utilizando a manteiga de cacau foi possível observar que nenhum dos isolados apresentou resultado de atividade enzimática maior que 1,0 U/mL. Roveda (2010) analisou 21 fungos para esta atividade pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicilium*, e verificou que as atividades lipolíticas máximas foram de 1,250 U, 2,042 U e 2,250 U.

Óleos e gorduras diferenciam-se pelas suas propriedades físicas e quanto à composição de ácidos graxos em suas moléculas. Óleos são líquidos em temperatura ambiente enquanto gorduras são sólidas (25°C). Os óleos e gorduras vegetais consistem de moléculas de triacilglicerídeos, as quais são constituídas de três ácidos graxos de cadeia longa ligados na forma de ésteres e uma molécula de glicerol. Em óleos, os ácidos graxos de suas cadeias carbônicas são formados predominantemente por ligações insaturadas e as gorduras são formadas principalmente por ligações saturadas. Esses ácidos graxos variam na extensão da cadeia carbônica, no número, orientação e posição das ligações duplas (GERIS et al.,2007).

Tabela 09. Resultados da atividade lipolítica dos extratos enzimáticos obtidos das leveduras isoladas da fermentação do cacau nos substratos manteiga de cacau, óleo de mamona e óleo de dendê, obtido pela titulação dos ácidos graxos solúveis em solução de NaOH e de fenolftaleína como indicador.

Código	Identificação	Mamona (U/mL)**	Dendê (U/mL)**	Cacau (U/mL)**
1	*	0,22	1,43	0,37
1,1	*	0,3	0,75	0,22
1,11	*	0,22	0,5	0,12
1,12	*	0,23	1,33	0,22
1,2	*	0,27	0,56	0,25
1,3	*	0,2	0,7	0,15
1,4	*	0,27	0,83	0,28
1,5	*	0,3	0,75	0,35
3,1	*	0,23	1,11	0,35
3,2	*	0,25	1,1	0,4
4,2	*	0,21	0,76	0,22
6,1	*	0,23	1,16	0,31
8	*	0,25	2,05	0,4
12	*	0,31	1,33	0,28
14,1	*	1,25	2,25	0,52
15	*	0,38	0,83	0,11
16	*	0,3	0,86	0,51
C - 1. 47/2	<i>C. krusei</i>	0,23	0,8	0,28
C - 1. 72	<i>C. krusei</i>	0,26	0,65	0,43
C - 1. 142	<i>C. krusei</i>	0,23	0,85	0,43
C - 1. 155	<i>C. krusei</i>	0,21	0,91	0,48
C - 1. 182/1	<i>C. krusei</i>	0,23	0,78	0,5
C - 1. 184	<i>C. krusei</i>	0,42	0,7	0,23
C - 2. 7	<i>C. krusei</i>	0,3	0,86	0,48
C - 2. 9	<i>C. krusei</i>	0,26	1	0,28
C - 2. 17	<i>C. krusei</i>	0,21	1,16	0,28
C - 2.45	<i>C. krusei</i>	0,3	0,91	0,21
C - 2. 51	<i>C. krusei</i>	0,26	0,76	0,38
C - 2. 91	<i>C. krusei</i>	0,28	0,83	0,4
C - 2. 102	<i>C. krusei</i>	0,25	0,86	0,38
C - 2. 108	<i>C. krusei</i>	0,13	1,05	0,35
C - 2. 118	<i>C. krusei</i>	0,23	2	0,23
C - 2. 121	<i>C. krusei</i>	0,25	1	0,11
C - 2. 42	<i>C. krusei</i>	0,28	0,86	0,38
C - 1. 33/2	<i>C. gropegiesseri</i> similar	1,75	2,38	0,25
C - 2. 68	<i>C. parapsilosis</i>	0,2	1,08	0,36
C - 1. 34/3	<i>Candida</i> sp. 7	0,25	0,96	0,28

C - 1. 83/2	<i>Candida</i> sp. 4	0,2	0,8	0,15
C - 2. 2/2	<i>Cryptococcus</i> sp.	0,25	1,1	0,23
C - 2. 4/2	<i>K. apis</i>	0,25	0,66	0,31
C - 2. 85	<i>K. apis</i>	0,16	1,38	0,26
C - 1. 27/2	<i>K. marxianus</i>	0,3	1,36	0,23
C - 2. 47	<i>P. kluyveri</i>	0,18	0,83	0,11
C - 2. 41	<i>P. kluyveri</i>	0,18	1,48	0,6
C - 1. 78	<i>P. membranifaciens</i>	0,23	1,38	0,33
C - 1. 161	<i>P. membranifaciens</i>	0,23	2,21	0,51
C - 1. 167	<i>P. membranifaciens</i>	0,18	1	0,36
C - 2. 11	<i>P. membranifaciens</i>	0,25	0,33	0,28
C - 2. 25	<i>P. membranifaciens</i>	0,283	0,71	0,4
C - 2. 26	<i>P. membranifaciens</i>	0,23	0,78	0,4
C - 2. 32/2	<i>P. membranifaciens</i>	0,23	0,63	0,36
C - 2. 40	<i>P. membranifaciens</i>	0,2	0,75	0,43
C - 2. 61	<i>P. membranifaciens</i>	0,36	0,88	0,38
C - 2. 63	<i>P. membranifaciens</i>	0,23	0,78	0,28
C - 2. 71	<i>P. membranifaciens</i>	0,28	1,63	0,23
C - 2. 73	<i>P. membranifaciens</i>	0,25	0,95	0,4
C - 2. 75/2	<i>P. membranifaciens</i>	0,33	0,71	0,36
C - 2. 82	<i>P. membranifaciens</i>	0,23	0,25	0,517
C - 2. 93/2	<i>P. membranifaciens</i>	0,18	0,63	0,26
C - 2. 94	<i>P. membranifaciens</i>	1,75	0,66	0,35
C - 2. 101/1	<i>P. membranifaciens</i>	0,15	0,75	0,28
C - 2. 126	<i>P. membranifaciens</i>	0,25	0,83	0,36
C - 2. 21/1	<i>P. membranifaciens</i>	0,41	1,35	0,15
C - 1. 19/3	<i>S. exigus</i>	0,28	0,78	0,43
C - 1. 18/1	<i>Starmerella</i> sp.2	0,3	0,85	0,26
C - 1. 30	*	0,25	0,63	0,41
C - 1. 156	*	0,28	2,25	0,23
C - 2. 168	*	0,16	1,35	0,31
C - 1.186	*	0,21	0,68	0,1
Nº total	*	70	70	70
Total de linhagens positivas		70	70	70
% de linhagens positivas		100%	100%	100%

(*) Leveduras que ainda não foram identificadas (**) Os resultados representam a média de três repetições.

C. krusei = *Candida krusei*, *K.apis* = *Kloeckera apis*, *P. membranifaciens* = *Pichia membranifaciens*, *K. marxianus* = *Kluyveromyces marxianus*, *C. parapsilosis* = *Candida parapsilosis*, *C. gropegiesseri* similar = *Candida gropegiesseri* similar, *P. kluyveri* = *Pichia kluyveri*, *S. exigus* = *Saccharomyces exigus*

As lipases possuem a propriedade de hidrolisar um grupo de substratos específico (especificidade de substrato), em geral relacionado ao tamanho da cadeia carbônica, à insaturação e a posição desta no triglicerídeo. Óleo de dendê é composto de proporções iguais de ácidos graxos saturados C16:0 palmítico (44%) e C18:0 esteárico (5%) e insaturados C18:1 oléico (40%) e C18:2 linoléico (10%), cujo ácido graxo principal é o palmítico formado de C16:0 átomos de carbonos. O óleo de mamona contém 90% de ácido graxo ricinoléico em sua constituição que é insaturado formado de 18:1 carbonos, possui uma hidroxila (OH) no carbono 12 e uma ligação dupla cis entre carbonos 9 e 10 (FAGUNDES et al., 2005; FALCONE, 2009). A manteiga de cacau é formada de ácidos palmítico C16:0 (25,65 a 35,33%), oléico C18:1 (32,64 a 34,74 %) e esteárico C18:0 (29,69 e 37,24%) (FACIOLI e GONÇALVES, 1998). Sendo assim, pode-se inferir que as lipases produzidas pelos microrganismos deste estudo agiram mais especificamente sobre o substrato óleo de dendê. Isto ocorre devido à estrutura e a forma do sítio ativo da enzima que provavelmente reage melhor com esses ácidos graxos (BORZANI, 2001).

De acordo com Falcone et al. (2009) a produção de lipases por fungos filamentosos é influenciada pelo tipo e concentração de fontes de C e N, pelo pH do meio de cultivo, pela temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio dissolvido. As fontes de carbono lipídicas, como ácidos graxos, são eficientes para estimular a secreção de lipases embora alguns microrganismos não dependam de substratos indutores para secretar extracelularmente essas enzimas, estes compostos podem aumentar a quantidade desta (TAN et al., 2003).

5.8.2 Testes espectrofotométricos de Pectinases e Proteases

Nos testes quantitativos realizados com as linhagens de leveduras foram positivas 68 (97%) para pectinases e 62 (88%) para as proteases. Estes resultados diferiram dos obtidos nos testes em placa (Tabela 10 e Gráfico 3).

Tabela 10. Resultados das atividades de Pectina metilesterase (U/mL) e a Atividade de Proteases (U/mL) dos extratos enzimáticos obtidos a partir do cultivo das leveduras isoladas da fermentação do cacau em meio de indução suplementado com pectina cítrica e gelatina, respectivamente.

Leveduras	Identificação	UA _{PME} (U/mL)	Leveduras	Identificação	UA _P (U/mL)
C - 2. 102	<i>C. krusei</i>	1960±0,007 ^{abcd^{ef}**}	C - 2. 121	<i>C. krusei</i>	6735,84±0,043 ^{ab**}
C - 1. 156	*	1890±0,0 ^{abcd^{ef}}	C - 1. 72	<i>C. krusei</i>	4029,41±0,040 ^{ab}
C - 2. 118	<i>C. krusei</i>	1740±0,009 ^{abcd^{ef}}	12	*	3946,96±0,062 ^{ab}
C - 2. 61	<i>P. membranifaciens</i>	1740±0,0 ^a	C - 2. 63	<i>P. membranifaciens</i>	3393,93±0,04 ^{ab}
C - 2. 51	<i>C. krusei</i>	1690±0,003 ^{abcd}	C - 1. 19/3	<i>Starmerella</i> sp.2	2711,86±0,00 ^a
C - 2. 63	<i>P. membranifaciens</i>	1680±0,003 ^{abc}	C - 2. 25	<i>P. membranifaciens</i>	2621,21±0,038 ^{ab}
C - 2. 71	<i>P. membranifaciens</i>	1660±0,005 ^{abcd^{efg}}	C - 2. 61	<i>P. membranifaciens</i>	2423,07±0,021 ^{ab}
C - 2. 25	<i>P. membranifaciens</i>	1655±0,004 ^{abcd^{ef}}	C - 2. 85	<i>K. apis</i>	1988,88±0,025 ^{ab}
1,12	*	1640±0,002 ^{abcd^{ef}}	C - 1. 34/3	<i>Candida</i> sp. 7	1867,34±0,033 ^{ab}
1,2	*	1625±0,005 ^{abcd^{efg}}	C - 1. 155	<i>C. krusei</i>	1720,43±0,062 ^{ab}
C - 2. 21/1	<i>S. exigus</i>	1610±0,013 ^{abc}	C - 2. 71	<i>P. membranifaciens</i>	1566,26±0,014 ^{ab}
16	*	1530±0,009 ^{abcd^{ef}}	C - 2. 11	<i>P. membranifaciens</i>	1563,73±0,007 ^{ab}
C - 2. 62	<i>P. membranifaciens</i>	1535±0,009 ^{ab}	C - 2. 68	<i>C.parapsilosis</i>	1469,13±0,031 ^b
C - 1. 155	<i>C. krusei</i>	1505±0,001 ^{abcd^{ef}}	1,12	*	1360,46±0,080 ^{ab}
1,1	*	1480±0,010 ^{abcd^{ef}}	C - 1. 83/2	<i>Candida</i> sp. 4	1291,66±0,016 ^{ab}
1,4	*	1445±0,011 ^{abcd^{ef}}	C - 2. 108	<i>C. krusei</i>	1239,58±0,031 ^{ab}
1,11	*	1410±0,011 ^{bcd^{fg}}	C - 2. 4/2	<i>K. apis</i>	1194,17±0,044 ^{ab}
C - 1. 182/1	<i>C. krusei</i>	1410±0,005 ^{abcd^{ef}}	3,1	*	1092,3±0,039^{ab}
C - 1. 34/3	<i>Candida</i> sp. 7	1350±0,013 ^{abcd^{ef}}	C - 2. 82	<i>P. membranifaciens</i>	1089,96±0,018 ^{ab}
C - 1. 27/2	<i>K. marxianus</i>	1350±0,013 ^{abcd^{efg}}	C - 2. 7	<i>C. krusei</i>	1044,11±0,039 ^{ab}
1,3	*	1310±0,013 ^{abcd^{ef}}	16	*	1000±0,044^{ab}
C - 2. 91	<i>C. krusei</i>	1270±0,008 ^{bcd^{efg}}	1,5	*	1000±0,023^{ab}
C - 2. 42	<i>C. krusei</i>	1260±0,029 ^{abcd^{ef}}	C - 2. 9	<i>C. krusei</i>	898,14±0,019 ^{ab}
C - 2. 85	<i>K. apis</i>	1260±0,029^{abcd^{ef}}	C - 2. 21/1	<i>S. exigus</i>	887,82±0,007^{ab}
C - 1. 78	<i>P. membranifaciens</i>	1255±0,007^{bcd^{efg}}	3,2	*	797,87±0,033 ^{ab}
C - 2. 73	<i>P. membranifaciens</i>	1250±0,006 ^{abcd^{ef}}	C - 1. 156	*	797,61±0,000 ^{ab}
C - 2. 82	<i>P. membranifaciens</i>	1240±0,013 ^{bcd^{efg}}	C - 2. 126	<i>P. membranifaciens</i>	788,88±0,039 ^a
3,2	*	1235±0,011^{abcd^{ef}}	C - 2. 42	<i>C. krusei</i>	786,72±0,014^{ab}
C - 2. 2/2	<i>Cryptococcus</i> sp.	1230±0,028 ^{abcd^{ef}}	C - 1. 182/1	<i>C. krusei</i>	760,68±0,00 ^{ab}
C - 1. 167	<i>P. membranifaciens</i>	1210±0,008 ^{abcd^{efg}}	C - 2. 168	*	750,85±0,013 ^{ab}
C - 2. 108	<i>C. krusei</i>	1195±0,007 ^{abcd^{ef}}	C - 1. 27/2	<i>K. marxianus</i>	720,27±0,073 ^{ab}
C-1. 72	<i>C. krusei</i>	1180±0,005 ^{abcd^{efg}}	1,11	*	712,32±0,004 ^{ab}
12	*	1170±0,003 ^a	4,2	*	650,19±0,051 ^{ab}
C - 1. 184	<i>C. krusei</i>	1060±0,009 ^{abcd^{ef}}	C - 1. 142	<i>C. krusei</i>	628,2±0,136 ^{ab}
C - 1. 186	*	1160±0,002 ^{a bcd^{ef}}	C - 1. 18/1	*	606,06±0,013 ^a
C - 2. 45	<i>C. krusei</i>	1160±0,001 ^{abcd^{ef}}	C - 2. 41	<i>P. kluyveri</i>	553,71±0,004 ^{ab}
15	*	1150±0,001^{abcd^{efg}}	14,1	*	535,39±0,005 ^{ab}
C - 1. 19/3	<i>Starmerella</i> sp.2	1140±0,014 ^{abcde}	C - 2. 40	<i>P. membranifaciens</i>	517,73±0,036 ^{ab}

		1140±0,001 ^{abcdefg}	C - 1. 33/2	<i>C. gropegiesseri</i>	508,26±0,035 ^{ab}
C - 2. 121	<i>C. krusei</i>			similar	
14,1	*	1120±0,022^a	C - 1. 167	<i>P. membranifaciens</i>	507,37±0,019 ^{ab}
C - 2. 68	<i>C.parapsilosis</i>	1120±0,0005 ^{bcdef}	C - 1. 47/2	<i>C. krusei</i>	474,02±0,036 ^{ab}
C - 2. 126	<i>P. membranifaciens</i>	1110±0,024 ^{abcdef}	C - 2. 73	<i>P. membranifaciens</i>	469,05±0,025 ^b
6,1	*	1100±0,016 ^{abcdef}	C - 2. 2/2	<i>Cryptococcus</i> sp.	465,47±0,063 ^{ab}
C - 2. 41	<i>P. kluyveri</i>	995±0,015 ^{bcdef}	C - 2. 118	<i>C. krusei</i>	462,36±0,015 ^{ab}
C - 2. 40	<i>P. membranifaciens</i>	980±0,025 ^{abcdefg}	C - 2. 62	<i>P. membranifaciens</i>	450,51±0,040 ^a
C - 2. 4/2	<i>K. apis</i>	980±0,006 ^{bcdefg}	C - 1. 78	<i>P. membranifaciens</i>	439,02±0,017 ^{ab}
C - 2. 17	<i>C. krusei</i>	980±0,001 ^{abcdef}	C - 2. 47	<i>P. kluyveri</i>	422,22±0,036 ^{ab}
C - 1. 47/2	<i>C. krusei</i>	980±0,001 ^{defg}	8	*	410,13±0,044 ^{ab}
4,2	*	970±0,012 ^{bcdefg}	C - 2. 94	<i>P. membranifaciens</i>	399,14±0,016 ^{ab}
C - 2. 9	<i>C. krusei</i>	920±0,008 ^{bcdef}	C - 2. 93/2	<i>P. membranifaciens</i>	371,64±0,048 ^{ab}
C - 2. 7	<i>C. krusei</i>	910±0,037 ^{abcdefg}	C - 2. 45	<i>C. krusei</i>	351,51±0,044^{ab}
C - 1. 83/2	<i>Candida</i> sp. 4	910±0,001^{bcdef}	15	*	351,56±0,013^a
C - 1. 142	<i>C. krusei</i>	910±0,001 ^{bcdefg}	1,3	*	335,82±0,004 ^{ab}
1	*	880±0,001^{abcdefg}	C - 2. 51	<i>C. krusei</i>	325,24±0,033 ^{ab}
C - 1. 33/2	<i>C. gropegiesseri</i>	850±0,001^{abcdefg}	C - 2. 32/2	<i>P. membranifaciens</i>	291,26±0,019 ^{ab}
	similar				
C - 2. 32/2	<i>P. membranifaciens</i>	850±0,001 ^{cdefg}	C - 2. 75/2	<i>P. membranifaciens</i>	259,54±0,000 ^{ab}
C - 1. 30	*	810±0,022^a	6,1	*	233,67±0,00^{ab}
3,1	*	780±0,011 ^{cdfg}	C - 2.26	<i>P. membranifaciens</i>	229,16±0,000^{ab}
C - 1. 161	<i>P. membranifaciens</i>	770±0,03 ^{gh}	1	*	226,13±0,056^{ab}
C - 2. 11	<i>P. membranifaciens</i>	740±0,025 ^{bcdef}	C - 2. 91	<i>C. krusei</i>	201,63±0,00 ^{ab}
C - 2. 94	<i>P. membranifaciens</i>	730±0,009^{bcdef}	C - 1. 184	<i>C. krusei</i>	115,38±0,039 ^{ab}
C - 2. 168	*	710±0,024 ^{defg}	C - 1. 161	<i>P. membranifaciens</i>	19,04±0,036 ^{ab}
C - 2. 101/1	<i>P. membranifaciens</i>	710±0,011 ^{efg}	1,1	*	0
1,5	*	710±0,002^{bcdfg}	1,2	*	0
C - 1. 18/1	*	670±0,012 ^{bcdefg}	1,4	*	0
C - 2. 47	<i>P. kluyveri</i>	440±0,009^{bcdef}	C - 2. 17	<i>C. krusei</i>	0
C - 2. 93/2	<i>P. membranifaciens</i>	440±0,009 ^{efg}	C - 2. 102	<i>C. krusei</i>	0
C - 2. 26	<i>P. membranifaciens</i>	360±0,006 ^h	C - 2. 101/1	<i>P. membranifaciens</i>	0
8	*	0	C - 1. 30	*	0
C-2. 75/2	<i>P. membranifaciens</i>	0	C - 1. 186	*	0
N° total		70			70
Total de linhagens positivas		68			62
% de linhagens positivas		97,14%			88,57%

UA_{PME} = Atividade enzimática de Pectina metilesterase UA_p = Atividade enzimática de Protease (*) Leveduras que ainda não foram identificadas. (**) Os resultados representam média de duas repetições. Resultados de média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste de Tukey. *C. krusei* = *Candida krusei*, *K.apis* = *Kloeckera apis*, *P. membranifaciens* = *Pichia membranifaciens*,

K. marxianus = *Kluyveromyces marxianus*, *C. parapsilosis* = *Candida parapsilosis*, *C. gropegiesseri* similar = *Candida gropegiesseri* similar, *P. kluyveri* = *Pichia kluyveri*, *S. exigus* = *Saccharomyces exigus*. As amostras em negrito foram as que apresentaram resultado positivo quando avaliados com a metodologia de *cup plate*.

Os valores obtidos neste estudo para a atividade enzimática podem ser originados do fato de os parâmetros de temperatura e pH testados não serem os valores ótimos de atividade dessas enzimas, ou mesmo o tempo requerido para a atividade, o pH e a temperatura estabelecidos não serem os valores ótimos para a estabilidade dessas enzimas (MASOUDE e JEPPERSEN, 2006). Oliveira et al. (2006) preconizaram que os halos de degradação em placa não representam obrigatoriamente a atividade pectinolítica de *Saccharomyces cerevisiae*.

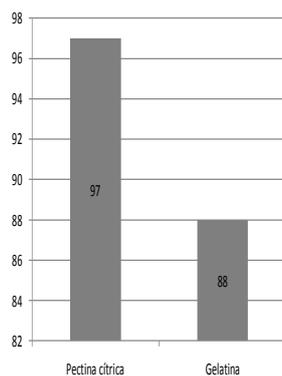


Gráfico 3. Porcentagem de leveduras positivas verificadas a partir de testes quantitativos espectrofotométricos sobre os substratos Pectina cítrica e Gelatina para as atividades pectinolítica e proteolítica, respectivamente.

No presente estudo os maiores valores encontrados para atividade de pectina metilesterase foram de 1960 U/mL para *C. krusei* C - 2.102 e de 1890 U/mL para o isolado não identificado C - 1. 156. Domingues (2010) analisou 35 leveduras isoladas da fermentação de amêndoas de cacau pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Phiccia*, e dentre estas 62% apresentaram resultados positivos para a atividade pectinolítica, embora essas espécies tenham sido negativas para a produção de pectina metilesterase. Masoude e

Jeppersen (2006) também não encontraram atividade de pectina metilesterase em linhagens de leveduras como *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora*. Este resultado ressalta o potencial das leveduras do presente trabalho em secretarem estas pectinases.

A fermentação é fundamental para a produção das características sensoriais do chocolate, e a sucessão de microrganismos na polpa mucilaginosa que envolve as amêndoas do cacau poderia promover a redução da quantidade de pectina e conduzir para uma degradação mais eficiente da mucilagem se houver a presença de microrganismos pectinolíticos. Dessa maneira um inóculo iniciador com leveduras pectinolíticas pode render um chocolate de melhor qualidade, também originando uma melhoria no processamento (SCHWAN e WHEALS, 2004; OLIVEIRA, 2007).

No que se refere às proteases, as melhores atividades proteolíticas foram observadas em *C. krusei* C - 2.121 com 3946,96 U/mL e pela linhagem 12 de 6735,84 U/mL. Silva-Neves et al. (2006) analisaram 50 leveduras e *Candida intermedia* foi a que demonstrou maior atividade proteolítica por meio da fermentação submersa. Fleuri (2008) também detectou a secreção de proteases pela linhagem fúngica de *Cellulosimicrobium cellulans*. Os valores para a atividade proteolítica verificados neste estudo para algumas leveduras foram superiores aos valores obtidos pelos pesquisadores referidos anteriormente, o que demonstra o grande potencial destas leveduras no que se refere à secreção desta enzima.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística da atividade pectinolítica e proteolítica foram considerados os 2 valores de atividade encontrados para cada levedura (Tabela 05). A comparação de médias feita pela análise de variância com intervalo de confiança de 95% indicou que as atividades obtiveram diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$) identificados pelo teste de Tukey que dividiu a atividade pectinolítica das 70 linhagens em estudo em 8 grupos (a, b, c, d, e, f, g e h), e na análise estatística da atividade proteolítica, a comparação de médias feita pela análise de variância que dividiu as atividades das 70 linhagens em estudo em 2 grupos (a e b) sendo que atividades dentro do mesmo grupo, os resultados seguidos pela mesma letra, não possuem diferença significativa.

6 CONCLUSÕES

Todas as leveduras analisadas no presente estudo foram reativadas, purificadas e depositadas na CCMB (Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia) e os resultados obtidos quanto à secreção extracelular de enzimas complementaram as informações biotecnológicas destas leveduras depositadas no acervo.

Exceto para as pectinases no pH 5 e fosfolipases nos pH 5 e 7, as leveduras testadas secretaram amilases, celulases, proteases e lipases extracelulares sob condições básicas, ácidas e neutras para todas as enzimas que foram testadas pela metodologia do *cup plate*. O substrato óleo de dendê foi o melhor para detecção das lipases tanto em testes em meio sólido quanto nos testes titulométricos. As leveduras demonstraram atividade pectinolítica com halos de degradação de maior extensão, em comparação com as demais enzimas testadas. Os testes quantitativos demonstraram que as linhagens estudadas são boas produtoras de enzimas pectinolíticas e proteolíticas.

O presente estudo verificou que as leveduras isoladas da fermentação do cacau para produção do chocolate por secretarem as enzimas em tempo curto de crescimento e fermentação em caldo de cultura de custo baixo e em diferentes valores de pH, podem ser uma fonte promissora de enzimas extracelulares de interesse e aplicação industrial e biotecnológica, principalmente naqueles processos que envolvem o processamento de alimentos.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. v 31, n. 7, p. 968-975, 2002.

AFOAKWA, E.O.; PATERSON, A.; FOWLER, F.; RYAN, A. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. *Food Chemistry*. v 113, p. 208-215, 2009.

ALAM, M.Z.; MUYIBI, S.A.; WAHID, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. *Bioresource Technology*, v.99, p.4709-4716, 2008.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.; BLACKWE, L.L.M. *Introductory Mycology*. 4^a ed. New York: John Wiley e Sons, 869 p. 1996.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation. *Journal Scienc Food Agricultural*. v.76, p.123-128, 1998.

ANDRADE, V.S.; SARUBBO, L.A.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production of extracellular protease by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.33, p.106-110, 2002.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*. v. 64, p. 175-183, 1998.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeast Characteristics and Identification*. 2 ed. Cambridge: University Press, Cambridge. 1200 p. 1990.

BASTOS, C.N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p. 286-288, 2005.

BASTOS, M.S.R.; GURGEL, T.E.P.; SOUSA FILHO, M. S. M.; LIMA, I. F. B.; SOUZA, A. C. R.; SILVA, J. B. Efeito da Aplicação de Enzimas Pectinolíticas no Rendimento da Extração de Polpa de Cupuaçu. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v.24, p. 240-242, 2002.

BECKETT, S.T. *Industrial chocolate manufacture and use*. 2 ed. London: Chapman and Hall, 408 p. 1994.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÉRE, C.; VERGER, R. Methods for Lipase Detection and Assay: a Critical Review. *European Journ of Lipid Science and Technology*. v.1, p.133-153. 2000.

BERG, J.M; STRYER, L.; TYMOCZKO, J.L. *Bioquímica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1104 p. 2004.

- BIAGGIO, R.T.; OLIVEIRA, M.D.; CABRAL, D. Otimização dos Processos Fermentativos e Caracterização Bioquímica da Protease Parcialmente Purificada Produzida pelo fungo *Aspergillus terreus*. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.1, p. 1-5, 2001.
- BIELY, P.; SLÁVIKOVÁ, E. New Search for Pectolytic Yeasts. *Folia Microbiologica*. v.39, n.6, p. 485-488, 1994.
- BOCCHINI, D.A.; ALVES-PRADO, H.F.; BAIDA, L.C.; ROBERTO, I.C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochemical*. v.38, p. 727-731, 2002.
- BON, E.P.S.; PEREIRA Jr., N. *Tecnologia enzimática*. Rio de Janeiro: E.P.S. Bon, 110 p. 1999.
- BORZANI, W. *Biotecnologia industrial*. 2 ed. São Paulo: E. Blucher, v.4, 2001.
- BRITO, E.S. *Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (Theobroma cacao L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor*. 2000. 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal Applied Microbiological*. v.93, p.1020-1025, 2002.
- CALADO, V.M.M. DILLON, A.J.P., SALGUEIRO, A.A. Produção de celulases por linhagens de *Humicola grisea* sob cultivo submerso. *Revista de Ciências e Tecnologia*. v.1 p. 1, 2007.
- CALIGIANI, A., CIRLINI, M., PALLA, G., RAVAGLIA, R.; ARLORIO, M. GC-MS Detection of Chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. *Chirality*. v.19, p.329-334. 2007.
- CANILHA, L.; SILVA, D.D.V.; CARAVLHO, W.; MANCILHA, I.M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa Parte 3: Polissacarídeos e enzimas. *Revista Brasileira de Análise*. v. 20, p. 32-40, 2006.
- CARVALHO, J.C.C.; BERTECHINI, A.G.; FASSANI, E.J.; RODRIGUES, P.B.; PEREIRA, R.A.N. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja suplementados com complexos enzimáticos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.38, p. 292-298, 2009.
- COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.; FURTADO, M.F.; ROSA, A.A.L.; CEPPEA, B. Aproveitamento de Resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. Curitiba, *Revista Ciência e Tecnologia*. v.19, n. 1, p. 3342, 2001.
- COLEN, G. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases*. 2006. 206p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciência de alimentos da faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.

- CONESA, A.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C. Fungal Peroxidases: Molecular Aspects and Applications. *Journ of Biotechnological*. v.93, p.143-158. 2002.
- CORAL, G.; ARIKAN, B.; UNALDI, M. N.; GUVENMEZ, H. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Analisis of Microbiological*. v. 4, p. 491–498, 2003.
- COSTA, J.A. V. Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz. 1996. 203 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1996.
- COSTA, K.R.C. *Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras da saliva de pacientes imunocompetentes portadores de lesão bucal*. 2006. 133 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2006.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n.4, p. 623-630, 2004.
- 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. *Journ Scienc Food and Agricultural*, v.4, p.149-155, 1953.
- DOMINGUES, 2010. E.S. *Seleção de linhagens de leveduras pectinolíticas para fermentação das sementes de cacau (Theobroma cacao)*. 2010. 80p. Dissertação. (Mestrado) - Escola Superior de agricultura Luis de Queiroz. 2010.
- EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N.H.; JARDIM, D.C.P. NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, N. Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. *Ciência e Tecnologia Alimentar*. v.30, p.142-150, 2010.
- ESPÓSITO, T.S. *Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do Tambaqui (Colossoma macropomum) e da carpa (Cyprinus carpio) como aditivo de detergentes em pó*. 2006. 98p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em recursos pesqueiros e aquicultura. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.
- FACIOLI, N.L.; GONÇALVES, L.A.G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb) . *Química nova*, v.21 p.1, 1998.
- FAGUNDES, F.P; BEZERRA; J.P.; GARCIA, M.A.; MEDEIROS, A.C.R.; BORGES, M.R.; GARCIA, R.B; Costa, M. Avaliação das Propriedades do óleo de mamona. In: Produção de bicomustível. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Produção e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP Revisão. 2005.
- FALCONE, C.O. *Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento*. 2009, 71 p. (Monografia) – Programa de Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Espírito. Espírito Santo, 2009.
- FARIA, L.A. *Hidrólise do óleo da amêndoa da Macaúba com lipase extracelular de Colletotrichum gloesporioides produzida por fermentação em substrato líquido*. 2010 147p.

(Dissertação) - Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

FEITOSA, I.C. Produção de lipases por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. *Acta Scientiarum Technological*, v.32, p.27- 31, 2010.

FERNANDES, M.L.M. *Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise*. 2007. 131p (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2007.

FELLOWS, P.J. *Tecnologia do processamento de alimentos*. Princípios e prática. 2º Edição. Ed Artmed, p 183-205, 602, 2006.

FERREIRA, A.C.R. Caracterização molecular através de DGGE-PCR da diversidade de leveduras associada à fermentação de cacau do Sul da Bahia. 2007. 71p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

FICKERS et al. (2006). Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and microbial Technology*, v.38, p.756-759. 2006.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Study of different parameters in the production of lytic enzymes. *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, v.28, p.299-310, 2008.

FORSYTH, W.G.C.; QUESNEL, V.C. Cocoa glycosidase and color changes during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 8, n. 9, p. 505-509, 1957.

FUENTEFRIA, A.M. *Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do Hibiscus rosa-sinensis*. 2004, 131p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.

FUNGARO, M.H.P.; SOUZA JR, C.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; Azevedo, J.A. Recurrent mutation selection to improve rennet production in *Candida tsukubaensis*. *Revista Brasileira Genética*, v.17, p.377-382. 1994.

GACESA, P.; HUBBLE, J. *Tecnología de las Enzimas*. Acribia, Zaragoza. 1990.

GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul, RS: EDUCS, p.125-169. 2004.

GANDHI, N.N. Applications of Lipase. *Journ Americal Oil Chemists Society*. v. 74, p. 621-634. 1997.

GARCIA, J.J. S. *Beneficiamento, armazenamento e padronização do cacau. Sistema de produção do cacauzeiro na Amazônia Brasileira*. Belém: CEPLAC, p. 86-104. 1985.

GEHARTZ, W. *Enzymes in Industry – Production and Application*. VCH, Weinheim. 1990.

GERIS, R.; SANTOS, N.A.A.C.; AMARAL, B.A.; MAIA, I.S.; CASTRO, V.D.; CARVALHO, R. M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química Instituto de Química. *Química Nova*, v. 30, n. 5, 2007.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C.A.; ROCHA, S.N.; SOCCOL, C.R. (2003). Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p.246–251, 2003.

GIONGO, J.L. 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 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. RS, 2006.

GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial enzymology*, 2 ed. Inc, New York: Macmillan Publishers, 73 p. 1996.

GONÇALVES, F.A.G. *Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso*. Dissertação (Mestrado). 2007, 67p. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2007.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biotechnol.*, 38, 1599-1616p. 2003.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase fúngica. In: *Bioquímica das fermentações*. 56p. 1982.

HASHEM, A.M. Purification and properties of a milk-clotting enzymes produced by *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*, v. 75, p.219–222, 2000.

HOONDAL, G.S.; TIWARI, R.P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biot.*, v.59, p.409–418, 2002.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnological*. v.13, p. 390-397, 2002.

JENSEN, B.; NEBELONG, P.; OLSEN, J.; REELEY, M. Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnology Letters*, v. 1, p.41–45, 2002.

JESUS, P.C.; SILVA, P. L. F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M. G. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. *Quim Nov*, v. 20, p. 6, 1997.

KAMINI, N. R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 4, p.317-324, 2000.

KATTEMBERG, H.R.; KEMMINK, A. The flavor of cocoa in relation to the origin and processing of the cocoa beans. *Developing food science.*, v. 32, p.1-22. 1993.

KOBLITZ, M.G. *Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p. 2008.

- KOMIYAMA, E.Y., SANTOS, S.S.F., JORGE, A.O.C., MARTINS, C.A.P.M., KOGA-ITO, C.Y. Produção de exoenzimas por amostras de *Candida albicans* isoladas de pacientes com periodontite crônica e indivíduos-controle. *Revista de Odontologia*, v.19, p.288-92. 2007.
- KUMAR, S.; SHARMA, N.S.; SAHARAM, M.R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, p 5-15, 2005.
- LI, D.C.; YANG, Y.J.; SHEN, C.Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycology Researches*, v. 1, p.18–22, 1997.
- LIMA, A.C.F.; JÚNIOR, J.P.P.; MACARI, M.; MALHEIROS, B. Efeito do Uso de Probiótico sobre o Desempenho e Atividade de Enzimas Digestivas de Frangos de Corte. *Revista Brasil Zootecnia* v.32, p. 200-207, 2003.
- LIMA. U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Ed. Bluncher, Volume 3, 593 p. 2001.
- LOCK, L.L. *Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de Debaryomyces melissophilus BI81*. 2007, 125p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- LOPEZ, A. S.; QUESNEL, V. C. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 24, n. 3, p. 319-324, 1973.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemical*, v.193, p. 265–275, 1951.
- MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Scientia Agricola*, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.
- MACIEL, G.M. *Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja*. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.
- MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S.B. Padronização do uso do corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas. *Comunicado Técnico Embrapa*. v.1. p.1 - 3, 2010.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Pearson Education., v.1, p.466-467. 2004.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. Thermophilic *Fungi*: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 3, p. 461–488. 2000.

- MARQUARDT, M.M. *Estudo da atividade proteolítica de Bacillus cereus em biorreator*. 2003. 111p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em microbiologia agrícola e do ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, v.99, p.1417-1424, 2008.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B.T. Enzimas. In: *Bioquímica Básica*. Ed. Guanabara Koogan. 59-88.1999.
- MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *Int J Food Microbiol*. v.110, p.291-6, 2006.
- NASCIMENTO, W.C.A.; SILVA, C.R.; CARVALHO, R.V.; MARTINS, M.L.L. Optmization of a culture medium for protease production by *Bacillus* sp. thermophilic. *Ciência e Tecnolologia dos Alimentos* v.27, p. 417-421, 2007.
- NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J.L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola* sp. *Revista de Microbiologia.*, v.19, p.78-81, 1988.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lenhinger: Princípios de Bioquímica*. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 1119p. 2004.
- NERY, V.L.H.; LIMA, J.A.F.; MELO, R. C.A.; FIALHO, E.T. Adição de Enzimas Exógenas para Leitões dos 10 aos 30 kg de Peso. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 29, p. 794-802, 2000.
- NETO, A.J. Algumas aplicações de enzimas. In: *Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos*. 1 ed. Volume 3. Ed. Edgard Blucher Ltd. 405-412. 2001.
- NEVES-SOUZA, R.D.; SILVA, R.S.S.F.; Estudo de Custo-Rendimento do Processamento de Queijos Tipo Minas Frescal com Derivado de Soja e Diferentes Agentes Coagulantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 25 p. 170-174, 2005.
- OBATA, T.; IWATA, H.; NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cell. *Agricultural and Biological Chemistry*. v.41, p.2387-2394, 1977.
- OETTERER, M.; REGITANO -D'ACRE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Ed Manole Ltda. Barueri, São Paulo, p 1-48, 612. 2006.
- OLIVEIRA, A.N.; FLOR, N.S.; OLIVEIRA, L.A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Amazônica*. 40(2) 2010: 401 – 404. 2010.
- OLIVEIRA, A.N., OLIVEIRA, L.A., ANDRADE, J.S., CHAGAS JÚNIOR, A.F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.26. p.853-860, 2006.
- OLIVEIRA, M.D.; BIAGGIO, R.T.; CABRAL, D. Bioprospecção de Proteases em Microrganismos Isolados. *Revista Brasileira de Zootecnia* p. 1-4, 2002.

- OLIVEIRA, R.Q. *Bioprospecção de microorganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do semi-árido baiano*. 2007, 123p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana. 2007.
- PANDEY, A. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. *Current Science*, v. 77, n. 1, p. 149-161, 1999.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V.T.; Singh, D.; Mohan, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.
- PASTOR, M.D.; LORDA, G.S.; BALATTI, A. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.32, p.6-9. 2001.
- PEREIRA, A.M.; SATO, H.H. *Purificação e Caracterização de Peroxidase do Taperebá (Spondias lutea)*. 2002, 131p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimento – São Paulo, UNICAMP. 2002.
- PINHEIRO, A.D.T.; BRÍGIDA, A.I.S.; GONÇALVES, L. R. B. Influência do pH no processo de imobilização de lipase em fibra da casca de coco verde. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Campinas, 2005.
- PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIR, M.; TORRES, E.A.; LOPES, W. A., PEREIRA, P. A. P. Biodiesel: An Overview *J. Braz. Chemical Societe.*, v. 16, p.1313-1330, 2005.
- POROSKE, L.H. Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry. *Journal of the American Oil Chemists Society*. v. 61, p. 1758-1765. 1984.
- PRINCE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v.20, p.7-14, 1982.
- PZSCZOLA, D.E. From Soybeans to Spaghetti: the Broadening Use of Enzymes. *Food Technology.*, v.55, p.54-62, 2001.
- RAO, M.B. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 62, p. 597-635, 1998.
- REED, G. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, Londres. 1997.
- RODRIGUES, A. N.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. *Ciência e Tecnologia Alimentar*. v. 21, p.63-66. 2001.
- ROHAN, T.A.; STEWART, T. The precursors of chocolate aroma: production of reduction sugars during fermentation of cocoa beans. *Journal of Food Science*, v.32, n. 4, p. 399-402, 1967.

- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, p.126-131, 2010.
- RUEGGER, M.J.S. ; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, p.205-211, 2004.
- SAMARANAYAKE, L.P., FIDEL, P.L., NAGLIK, J.R., SWETT, S.P., TEANPAISAN, R., Coogan MM, *et al.* Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Disturb*, v.8, p.151-160. 2002.
- SANCHEZ, J.; GUIRAUD, J.P.; GALZY, P.A study of the polygalacturonase activity of several yeast strains isolated from cocoa. *Applied Microbiological Biotechnological*. v.20, p.262– 267,1984.
- SANTOS, E.A.; OLIVEIRA, R.B.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. Yeasts associated with flowers and fruits from a Semi-arid Region of Northeastern Brazil. *Revist Microbiological*. v.27, n.1, p.33-40, 1996.
- SANTOS, D.S. *Inoculação de leveduras start na fermentação do cacau para melhoria do flavor*. 2009. 139p (Dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos. Universidade Estadual de Santa Cruz Ilhéus. 2009.
- SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microorganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. *Ciência Rural*, v.33, p. 835-842, 2003.
- SCHMIDELL, W.; LIMA. U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. Volume 2. São Paulo: Ed. Bluncher, 541 p. 2001.
- SCHWAN, R.F. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and environmental microbiology*. v.64, p.1477-1483. 1998.
- SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critic Revist Food Scicien Nutrition*. v.44, p.205-21, 2004.
- SHARROCK, K.R. Cellulase Assay Methods: a Review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v.17, p.81-106, 1988.
- SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MAC RAE, I.C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *Journal of Microbiological*. v.6, p.123-137,1987.
- SILVA, C. H. D. *Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas*. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.
- SILVA, E G. *Seleção de leveduras pectinolíticas isoladas de frutas tropicais*. 2003. 79 p. Dissertação (Mestrado) Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Lavras, 2003.

- SILVA, G.A.B.; ALMEIDA, W.E.S.; CORTES, M.S.; MARTINS, E.S. Produção e caracterização de protease obtida de *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v. 3, p. 28-41, 2009.
- SILVA -NEVES, K.C., PORTO, A. L.F., TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular *Acta Amazônica*. v.36, p.299 – 306. 2006.
- SOARES I. A.; FLORES A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA M.M.; PATERA BARCELOS, R. TREVISOL, L.R.; CARVALHO, R.D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C.M.S.C; BARONI, S. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.30, p. 700-705. 2010.
- SOARES, E.C.; FILHO, M.P.; ROUBACH, R.; SILVA, R.C.S. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (*Cichla sp.*). *Revista Brasileira Zootecnia*. v.37, p.971-976, 2008.
- SOARES, V. F.; FERREIRA, V. S.; BON, E. P. S. Produção de Proteases de *Bacillus subtilis* usando óleo de soja como fonte de carbono. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 98p. 1999.
- SOUZA, C.G., BRAGA, R.M., AMORIM, M.V.F.S., FAHEINA JUNIOR, G.S., LOPES, V.R.O., MARTINS, S.C.S., PINTO, G.A.S., MARTINS, C.M. Atividade celulolítica de fungos isolados do solo do manguezal da Reserva Ecológica de Sapiranga. In: XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.40, p.623-630. 2009.
- SOUZA, H.Q.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. Seleção de *Basidiomycetes* da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência Tecnologia Alimentos*. v.28, p. 116-124, 2008.
- STRAUSS, M.L.A.; JOLLY, N.P.; LAMBRECHTS, M.G.; RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal Applied Microbiological*. v.91, p.182-190, 2001.
- TAN, T.; ZANGH, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase production *Candida sp* and production of lipase by fermentation. *Process Biochemical*., v. 39, p.459-465, 2003.
- THOMPSON, C.A.; DELAQUIS, P.J; MAZZA, C. Detection and measurement of detectial microbial lipase activity: an review. *Criticus review Food Scicien Nutritional*, v.39, p.165-187, 1999.
- TIWARI, B.K. THOMS, C. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*. v.10, p.166–171. 2009.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, v.38, p.1553–1558, 2003.

VAN J.B.; BEILEN, LI, Z. Enzyme technology: an overview. *Current Opin Biotechnological*. v.13, p.338-344. 2002.

VASCONCELOS, W.E. RIOS, M.S. SOUSA, A.H. MEDEIROS, E.V. SILVA, G.M.C. MARACAJÁ, P.B. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. v.3, 2003.

VENDRUSCOLO, F. *Cultivo em meio semi- sólido e submerso do bagaço de maçã por Gongronella butleri e avaliação do seu potencial biotecnológico*. 2005.96p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

VITOLO, M. Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: *Biocologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. 1 Ed. Volume 4. Ed.Edgard Blucher Ltd..387-420. 2001.

VITOLO, M. *Tópicos de enzimologia industrial*. São Paulo, Ed 4, 1981.

WATANABE, K; ASAKAWA, S.; HAYANO, K. Detection and identification of microorganisms in soil and natural environment. *International- Symposium-Series*, v.5, p.71-75, 1997.

WHITAKER, J.R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker, Nova York. 234 p. 1994.

WISEMAN, A. In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2(ed) Ed. Wiseman, A. Ellis Horwood Ltd. Chichester. 252-259 p. 1985.

XU, X. Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalysed Reactions: a Review. *European Journal of Lipid Science and Technology*. p. 287-303. 2000.

ZIMMER, K.R., BORRÉ, G.L., TRENTIN, D.S., JÚNIOR, C.W., FRASSON, A.P., GRAEFF, A.A., GOMES, P., MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico diagnóstico clínico. *Revista Liberato*. v.10, p.123-137, 2009.

ZOCCA, F.; LOMOLINO, G.; SPETTOLI, P.; CURIONI A.; LANTE, A. Detection of pectinmethylesterase activity in presence of methanol during grape pomace storage. *Food Chemistry*. v.102; p. 59-65, 2007.

APÊNDICE

C - 1. 30	*	-	-	-	1±0,05	1,1±0,05	-	-	-	-	-	-	3,1±0,1	2,5±0,1	-	-	-
C - 1. 156	*	-	0,9±0,3	-	1±0,0	-	1±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 2. 168	*	-	-	-	-	-	1±0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C - 1. 186	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N° total		70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Total de linhagens positivas		9	6	3	17	22	20	6	6	-	-	8	10	5	4	7	
% de linhagens positivas		12,85%	8,57%	4,28%	24,28%	31,42%	28,57%	8,57%	8,57%	0%	0%	11,42%	14,28%	7,14%	5,71%	10%	

(*) Leveduras que ainda não foram identificadas (**) Os resultados representam média de três repetições. Resultados de média ± desvio padrão. *C. krusei* = *Candida krusei*, *K.apis* = *Kloeckera apis*, *P. membranifaciens* = *Pichia membranifaciens*, *K. marxianus* = *Kluyveromyces marxianus*, *C. parapsilosis* = *Candida parapsilosis*, *C. gropegiesseri* similar = *Candida gropegiesseri* similar, *P. kluyveri* = *Pichia kluyveri*, *S. exigus* = *Saccharomyces exigus*