

## **ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DA VAGEM DA ALGAROBA (*Propolis juliflora*) E ANÁLISE DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA E FERMENTATIVA DOS ISOLADOS**

Caroliny Hellen Azevedo da Silva, Rayane Dias dos Santos e Jonas Luiz Almada da Silva

*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, campus Currais Novos*  
caroliny.hellen@academico.ifrn.edu.br

**Resumo:** Amilases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e encontradas, principalmente, em frutas e vegetais. Essas moléculas são capazes de hidrolisar cadeias longas e complexas de amido em açúcares menores, deixando-os disponíveis para que sejam aproveitados por microrganismos em seus metabolismos. As vagens da algaroba, planta arbórea altamente adaptada à climas desérticos e semiáridos, possuem uma composição nutricional com considerável teor de proteínas e vitaminas e uma elevada concentração de açúcares. Por esse motivo, tem sido empregada nos mais diversos processos biotecnológicos sobretudo para a produção de alimentos. Isto posto, objetivou-se com este trabalho isolar leveduras desse fruto e verificar se esses fungos unicelulares são capazes de produzir amilase e fermentar açúcares. Para tal, fez-se o isolamento em meio PDA acidificado e em seguida as linhagens foram inoculadas em meios sólidos contendo amido e meios em caldo contendo açúcares. A verificação de atividade amilolítica deu-se pelo teste do iodo. Optou-se também por fazer uma caracterização morfológica dos isolados, observando-se suas características macroscópicas e microscópicas. Os resultados mostraram que a algaroba obteve respostas mais positivas no meio composto Ágar Amido 2 e no caldo malte, todavia, todos os meios empregados tiveram resultados interessantes e consideráveis. Conclui-se, portanto, que a algaroba é uma boa alternativa para processos biotecnológicos e que os seus isolados produzem enzimas de interesse industrial.

**Palavras-chave:** Enzimas, amilase, algaroba.

### **INTRODUÇÃO**

Enzimas são substâncias de origem proteica que atuam como biocatalisadores, isto é, aceleram as reações químicas e diminuem a energia de ativação necessária para elas ocorrerem. Todas as reações bioquímicas dos seres vivos são catalisadas por enzimas; elas atuam em condições não-poluentes e apresentam alta especificidade ao substrato e eficiência catalítica, não se degradando após catalisar uma reação química (ZHOU *et al.*, 2015).

O mercado de enzimas tem ganhado notoriedade e cada vez mais mostra-se promissor em decorrência do crescente desenvolvimento industrial nos mais diversos âmbitos tecnológicos e da preocupação atual que há em torno da sustentabilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O potencial biotecnológico das enzimas tem sido aplicado em larga escala em indústrias como a de alimentos, utilizadas na fabricação de produtos e na obtenção de ácidos orgânicos e compostos nutricionais como

aminoácidos; farmacêutica (vitaminas, antibióticos, vacinas); agropecuária (aditivos de ração e produção de enzimas heterólogas), energia (etanol e biodiesel); materiais (utilizadas na fabricação do papel, polímeros e tecidos), entre muitas outras aplicações (VAN BEILEN e LI, 2002).

As enzimas são capazes de converter o substrato em moléculas-alvo, as quais podem ser utilizadas mais facilmente em outros processos. Esse princípio é muito aplicado na indústria alimentícia, onde, por exemplo, enzimas são empregadas nas etapas de produção de alimentos para transformar carboidratos complexos como o amido, celulose, hemicelulose, glicanos, xilanos e pectinas, em moléculas menores que podem ser aproveitadas na fermentação. Muitos desses catalisadores são produzidas por microrganismos que também as utilizam nas reações dos seus metabolismos, e, por isso, tem-se o emprego de bactérias, bolores e leveduras para se extrair essas moléculas (PEREIRA *et al.*, 2017).

Segundo Koblitz (2010), as hidrolases são a classe de enzimas que mais apresentam aplicações industriais. Esse grupo engloba as amilases, amiloglicosidades, celulases, pectinases, proteases, lipases, entre outras. As amilases, foco tecnológico do presente trabalho, atuam modificando o amido em produtos de panificação e na produção de bebidas alcoólicas, por exemplo.

As carboidrases são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas entre monossacarídeos, os quais, unidos, formam grandes cadeias de açúcares, constituindo os polissacarídeos. Esses catalisadores são capazes tanto de quebrar os carboidratos em açúcares menores (glicose, frutose e galactose), como de realizar a reação inversa, sintetizando oligossacarídeos a partir deles (ZHOU *et al.*, 2015).

As amilases são carboidrases que hidrolisam o amido, polissacarídeo encontrado em grande quantidade em vegetais, cereais e frutas, em açúcares fermentáveis, atuando sobre as ligações  $\alpha$ -1,4 e/ou  $\alpha$ -1,6 desses carboidratos. Nessa classificação destacam-se as  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases e glicoamilases. Os principais produtos dessa hidrólise são dextrina, maltose e glicose. Na fermentação de bebidas alcólicas, as leveduras não são capazes de fermentar as matérias-primas utilizadas, ricas em cadeias longas de amido. Para isso, antes da etapa de fermentação, ocorre a sacarificação do amido, que consiste na hidrólise desse carboidrato, transformando-o em açúcares fermentáveis pelas leveduras, como a glicose e a maltose.

A algaroba é uma árvore amplamente encontrada no Nordeste brasileiro, sobretudo na região semiárida onde seu uso está associado principalmente às atividades agropecuárias, servindo de alimento para rebanhos de animais durante as estiagens (SILVA *et al.*, 2014).

Na literatura há vários estudos acerca da algaroba, destacando-se, sobretudo, a potencialidade dos seus frutos, bastante ricos em nutrientes como carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais, e conhecidos pelo seu caráter aromático e doce. Para tanto, tem sido aproveitada no preparo de produtos de panificação, geleias, pudins, condimentos, adoçante e bebidas fermentadas (aguardente), mel e licores (SILVA, 2009).

A polpa constitui 56% do fruto e contém 60% de açúcares, dos quais 96% são sacarose, o que favorece processos como a fermentação, secagem e torrefação para a obtenção dos mais diversos produtos. O mesocarpo possui altos teores de sacarose e açúcares redutores, e, no endocarpo, destaca-se a presença de proteínas (GRADOS e CRUZ, 1996).

A América Latina se destaca no aproveitamento das vagens de algaroba, bem como também da madeira e das ramagens da árvore, muito utilizadas na alimentação humana e animal e para a produção de estacas. Apesar disso, o Brasil ainda precisa desenvolver mais métodos de aproveitamento do fruto e ampliar o seu beneficiamento para a escala industrial, a fim de se evitar e gerar uma alternativa para o desperdício dessa potencial matéria-prima (LIMA, 2005).

Tendo em vista o exposto, este trabalho tem por objetivo isolar leveduras das vagens de algaroba e analisar a capacidade dos isolados em utilizar o amido para os seus metabolismos, e fermentar a sacarose, indicando ou não a produção de enzimas com potencial biotecnológico, entre elas a amilase, como forma de beneficiar e valorizar um fruto tão rico e gerar alternativas para o seu desperdício.

## **METODOLOGIA**

### **Coleta das vagens e isolamento das leveduras**

Para o isolamento de leveduras das vagens de algaroba foram realizadas 4 coletas de amostras, sendo a primeira no município de Jardim do Seridó-RN e as demais no Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, campus Currais Novos-RN, no período de fevereiro a abril de 2018. As coletas foram

feitas com um balde previamente esterilizado e os coletores utilizaram luvas para entrar em contato com as vagens, tais medidas com o intuito de diminuir as contaminações por microrganismos do ambiente e presentes nas mãos. As vagens selecionadas foram aquelas que indicavam estar maduras, isto é, de coloração amarela e aspecto seco, pois os frutos maduros apresentam concentrações maiores de açúcares e, conseqüentemente, uma maior população de leveduras.

O isolamento das leveduras deu-se em meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA), próprio para o crescimento de bolores e leveduras, e acidificado com ácido tartárico para inibir o crescimento de bactérias. O método utilizado foi o de Spread Plate e foram feitas três diluições das amostras ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), em triplicata. As placas foram incubadas numa estufa por 5 dias à temperatura de 25-27 °C, condições ótimas para o crescimento de fungos, segundo metodologia de Silva (2010). Após o crescimento, as colônias que apresentavam aspecto leveduriforme, ou seja, sem micélios e sem aspecto cotonoso, foram isoladas em meio PDA acidificado e postas nas mesmas condições de crescimento anterior. Ao todo, foram isoladas 20 colônias de leveduras diferentes, referidas pela letra C e o respectivo número, de modo a facilitar a identificação. Os isolados foram passados também para PDA inclinado acidificado com o intuito de formar uma coleção de fungos.

### **Caracterização cultural e morfológica**

As colônias isoladas foram analisadas culturalmente quanto aos critérios cor, forma, elevação, bordos, superfície, odor e aparência óptica, e para os tubos analisou-se a consistência, quantidade, cor, odor e aspecto do crescimento ao longo da linha de inoculação em ágar inclinado. Depois cada levedura foi preparada em esfregaço e realizou-se uma coloração simples utilizando corante cristal violeta para observar as características morfológicas das células ao microscópio.

### **Teste de produção de amilase**

A fim de se analisar a capacidade dos levedos isolados em quebrar o amido a partir da produção de amilase, foram compostos dois meios à base desse carboidrato, denominados de Ágar Amido 1 (AA1), composto de extrato de carne (1,3g), amido solúvel (4,4g) e ágar bacteriológico (6,6g), e Ágar Amido 2 (AA2), composto por amido solúvel (4,4g) e ágar nutriente (12,3g), este já fornecendo em sua composição extrato de carne (1,5g). A diferença entre os dois meios é a concentração de extrato de

carne. O pH dos meios foi corrigido para  $7,5 \pm 0,2$  com hidróxido de sódio a 0,1 mol. Cada colônia foi isolada numa placa de AA1 e AA2 e incubadas em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) por 5 dias à temperatura de 25-27 °C. Dado o crescimento, aplicou-se iodo (lugol) na superfície das placas, observando-se se essa substância adquiriu coloração azul, segundo Koblitz (2010).

### **Teste de fermentação da sacarose**

Para analisar o potencial fermentativo das leveduras isoladas da algaroba, prepararam-se três meios: caldo malte (4,6g) contendo já em sua formulação digestão enzimática de gelatina, extrato de malte, dextrose e extrato de levedura, adicionando-se 2,2g de glicose; caldo YPD composto a partir de dextrose (4,4g), extrato de levedura (2,2g) e peptona (4,4g), adicionado de 4,4g de glicose; caldo sacarose formulado com peptona de caseína (4,4g), extrato de levedura (2,2g) e sacarose (4,4g). Foram dispostos 10ml de cada caldo em tubos contendo tubo de Durham, em seguida foram esterilizados e após foi realizado o inóculo, de forma que cada colônia foi inoculada em cada um dos meios preparados. Os tubos foram incubados em estufa nas condições ótimas de crescimento. Para saber se houve fermentação, verificou-se a formação de gás nos tubos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Caracterização macroscópica e microscópica**

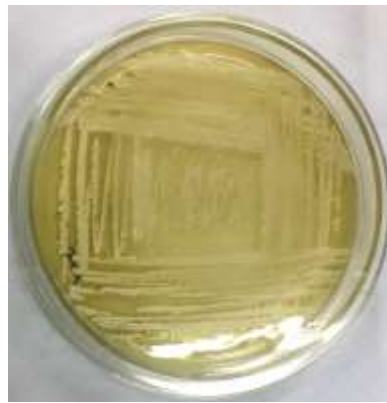
As 4 amostras de algaroba apresentaram uma enorme diversidade de fungos filamentosos e colônias selvagens de leveduras. Apesar de todas as amostras terem expressado um elevado crescimento de bolores, as amostras 2, 3 e 4 tiveram um crescimento majoritário de leveduras, identificadas pela ausência de filamentos (micélios).



**Figura 1.** Colônias de bolores e leveduras da algaroba (amostra 4).

As colônias de leveduras isoladas apresentaram formato circular, tamanho pequeno ou médio variando entre 2 e 5 mm; algumas se mostraram planas em relação à superfície do meio e outras elevadas de forma convexa, umbonada (presença de uma protuberância central) e pulviniforme (mais elevada que o formato convexo).

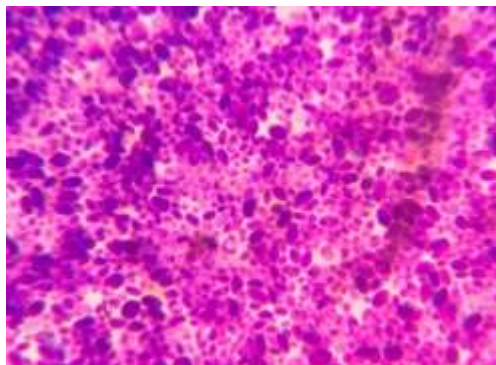
Com relação à pigmentação, foram encontradas colônias amarelas, brancas e rosas mais intensas ou mais claras. A maioria das colônias brancas (sem pigmentação) possuíam aspecto opaco, exceto algumas que eram translúcidas. Aquelas das demais colorações demonstraram translucidez (figura 2). Quanto ao aspecto, as culturas demonstraram ser úmidas, pastosas, cremosas, viscosas ou com aspecto de muco.



**Figura 2.** Levedura C18.

Do total, 18 leveduras expressaram algum tipo de odor e dessas, 5 possuíam aroma de morango ou uva, evidenciando a capacidade desses microrganismos em produzir compostos fenólicos ou aromáticos responsáveis pelo aroma e que possam ser interessantes para alguma utilização industrial, por exemplo, na indústria de aromatizantes ou flavorizantes alimentares. As demais possuíam aromas como de leite azedo ou de chulé.

A análise microscópica das colônias revelou células de formato oval, apiculado (formato de limão), esférico, elíptico e elipsoide (figura 3). Também foi possível observar a presença de brotos (figura 4), indicando a reprodução por brotamento característica das leveduras, e de pseudomicélios que se formaram pela união entre si das células após a reprodução (figura 5).



**Figura 3.** Formato da levedura C19.



**Figura 4.** Reprodução por brotamento.



**Figura 5.** Formação de pseudomicélio.

Moreira et al. (2015) analisou os parâmetros morfológicos, fisiológicos e fermentativos de linhagens industriais de leveduras do gênero *Saccharomyces*, encontrando espécies que apresentaram coloração rosa, branca, amarela e aspecto translúcido ou brilhoso.

Tal comparativo morfológico é importante para estabelecer semelhanças e diferenças entre os mais diversos microrganismos, a fim de facilitar a escolha de métodos e técnicas para

aplicar ao microrganismo de interesse.

Apesar de não ser possível identificar as leveduras presentes em vista da alta complexidade e custo dos métodos e também por se tratar de linhagens selvagens, algumas culturas apresentaram aspecto morfológico semelhante ao gênero *Saccharomyces*.

### **Testes de amilase e fermentação da sacarose**

Nos vegetais e frutas, o amido encontra-se na forma de pequenos grânulos: a amilose e a amilopectina. A amilose é uma macromolécula constituída de unidade de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, enquanto que a amilopectina é um polímero que apresenta ramificações de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,6 (ARAÚJO, 2015).

As  $\alpha$ -amilases, produzidas tanto por animais quanto por microrganismos, são enzimas que quebram ligações  $\alpha$ -1,4 de amiloses e amilopectinas. As  $\beta$ -amilases (exógenas), bastante presentes em sementes, grãos e vegetais, hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 do amido, liberando em torno de 90% de maltose e 10% de glicose (Koblitz, 2010). As glicoamilases ou amiloglicosidases agem sobre as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6, transformando o amido em unidades de glicose a partir do vértice não-redutor da amilose e amilopectina. Contudo, para que haja a total conversão é necessário a presença de  $\alpha$ -amilase, pois as duas atuam em conjunto.

Segundo Bastos *et al.* (2015), a amilose é capaz de formar um complexo de cor azul quando em contato com o iodo. Quando há enzimas amilases no meio contendo amido, esse complexo é formado, mas em seguida as manchas antes azuis tornam-se transparentes. Dessa forma, não havendo essa enzima, ao se adicionar o iodo, o completo azul não se perde (figura 6). De acordo com a velocidade da perda da cor azul, é possível determinar se houve ação da  $\alpha$ -amilase (perda de cor azul rápida),  $\beta$ -amilase (perda lenta) ou glicoamilase (perda lenta).



**Figura 6.** Formação de complexo azul resultante da interação amido-iodo em meio AA1 para



controle.

No meio AA1, apenas 5 leveduras tiveram resultado positivo para a produção de amilase, isto é, houve perda da cor azul. Já para o meio AA2, 17 leveduras tiveram uma resposta positiva. A levedura C7 foi positiva para o meio AA1 e negativa para o meio AA2, enquanto que outras tiveram resultado negativo para o primeiro meio e positivo para o segundo. Pode-se aferir, então, comparando-se as composições dos meios, que as leveduras isoladas utilizam tanto o amido como o extrato de carne como fonte de carbono.

Foi observado que a perda da cor azul se deu de forma rápida, evidenciando a presença de  $\alpha$ -amilases.

Neto e Albuquerque (2016) isolaram 21 leveduras de flores e frutos da cidade de Recife (PE) e, aplicando o teste do iodo, verificaram que 55% das espécies encontradas produziram amilase.

Na análise do teste fermentativo, as 20 leveduras fermentaram o caldo malte, indicado pela formação de bolhas no tubo de Durham e de espuma na superfície do meio; 5 fermentaram o caldo sacarose e 19 fermentaram o caldo YPD. Isso ocorre porque algumas enzimas conseguem hidrolisar polímeros de cadeias longas, enquanto outras atuam somente sobre moléculas menores, como oligossacarídeos, dissacarídeos ou monossacarídeos. Nesse caso, o caldo malte e YPD teve uma resposta mais positiva pois apresentam teores maiores de glicose, notando-se a preferência dessas leveduras em consumir o monossacarídeo em vez de dissacarídeos como a sacarose, formado de glicose e frutose.

Alves, Muniz e Santana (2014) isolaram cinco linhagens de leveduras de caldo de algaroba e avaliaram o seu potencial para a fermentação alcoólica inoculando-as em caldo de cana de açúcar. Os resultados obtidos mostraram que as espécies isoladas tiveram um rendimento igual ou superior ao caldo de cana fermentado com a levedura da panificação, conhecida comercialmente por Fermento Fleischmann.

## **CONCLUSÕES**

Com o presente trabalho é possível aferir que a algaroba possui uma alta potencialidade biotecnológica tanto do ponto de vista da vagem e todas as suas propriedades nutricionais quanto no aspecto microbiano. As

leveduras isoladas mostraram-se eficientes na produção de amilase e na fermentação de açúcares, contribuindo consideravelmente para o estudo e aplicação de novos microrganismos com elevada atividade enzimática em processos tecnológicos, e agregando valor econômico a um fruto do semiárido brasileiro. Vale salientar que, juntamente a este, novos estudos mais detalhados devem ser realizados com o intuito de identificar e caracterizar a microbiota fúngica da algaroba, de modo a beneficiar ainda mais produtos da agroindústria.

## **REFERÊNCIAS**

ALVES, M. F.; MUNIZ, M. B.; SANTANA, W. V. de. DESEMPENHO DE LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DA ALGAROBA NO CALDO DE CANA DE AÇÚCAR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 10. 2014, Florianópolis. **Anais**. 2015. v. 1, p. 1311 - 1318. Disponível em: <<https://www.proceedings.blucher.com.br/article-list/cobeq2014-245/list#articles>>. Acesso em: 27 maio 2018.

ARAÚJO, Miguel Augusto Machado de. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.

BASTOS, Crislane Maria da Silva et al. Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p.123-129, set. 2015.

GRADOS, N.; CRUZ, G. New approaches to industrialization of algaroba (*Prosopis pallida*) pods in Peru. In: FELKER, P., MOSS, J. (Eds.). **Workshop Prosopis: semiarid fuelswood and forage tree building consensus for the disenfranchised**. Washington: Texas AM Univ., 1996. p.25-42.

KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. (2-65).

LIMA, P. C. F. Algarobeira. In: KIILL, L. H. P.; MENEZES, E. A. (Ed). **Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido;

Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. cap. 2, p. 37-90.

MOREIRA, Crislaine Santos *et al.* ANÁLISE DOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICA DE LINHAGENS DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL. **Ciência e Natura**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.55-63, 26 set. 2015. Universidad Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/2179460x18107>.

NETO, L. J. da Silva; ALBUQUERQUE, S. S. M. C. de. **Isolamento de leveduras de flores e frutos coletados no campus recife da UFPE e avaliação da produção de amilase dos isolados**. 2016. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2016/trabalhos/11/9405-23027.html>>. Acesso em: 02 maio 2018.

OLIVEIRA *et al.* ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS . Em: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2016. Digital proceedings. Campinas, GALOÁ, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/trabalhos/isolamento-e-selecao-de-microrganismos-produtores-de-enzimas-amiloliticas>>. Acessado em: 28 mai. 2018.

PEREIRA *et al.* PROSPECTION OF CELLULASE FROM ISOLATED FUNGI FROM THE SEMIARID CAATINGA OF PARAÍBA. In: PROCEEDINGS OF NATIONAL BIOPROCESSES SYMPOSIUM AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIOMASS SYMPOSIUM, 2017. **Digital proceedings**. Campinas, GALOÁ, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-2017/trabalhos/prospection-of-cellulase-from-isolated-fungi-from-the-semiarid-caatinga-of-paraiba>>. Acessado em: 27 May. 2018.

SILVA, C. G. da *et al.* Avaliação sensorial do pão de forma enriquecido com farinha residual de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 10., 2014, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis, 2015. v. 1, p. 4310 - 4317. Disponível em: <<https://www.proceedings.blucher.com.br/article-list/cobeq2014-245/list#articles>>. Acesso em: 02 maio 2018.

SILVA, Clóvis Gouveia da. **Otimização do processo de produção da aguardente de algaroba e aproveitamento dos resíduos sólidos em produtos alimentares**. 2009. 232 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2009.

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 624 p.

VAN BEILEN, J. B.; Li, Z. *Enzyme technology: an overview*. Current Opinion in Biotechnology, 13:338-344. 2002.

ZHOU, Kequan et al. Cereais e leguminosas. In: ESKIN, N. A. Michael; SHAHIDI, Fereidoon. **Bioquímica de Alimentos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Cap. 1. p. 2-44.