

AGENOR VALADARES SANTOS

SELEÇÃO DE LEVEDURA PROTEOLÍTICA DE LATICÍNIO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES EXTRACELULARES

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

RESUMO

SANTOS, Agenor Valadares, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003. **Seleção de levedura proteolítica de laticínio e caracterização parcial de proteases extracelulares.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiros: Maria Cristina Baracat Pereira e Hilário Cuquetto Montovani.

Leveduras presentes na microbiota do ambiente da indústria de queijo possuem propriedades potenciais de interesses biotecnológicos. O banco de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (Bioagro – UFV) contém centenas de leveduras obtidas de cinco diferentes laticínios da Zona da Mata de Minas Gerais, das quais 94 foram testadas neste trabalho, sendo a levedura com maior atividade proteolítica extracelular selecionada. Determinaram-se as condições fisiológicas de cultivo dessa levedura que propiciaram atividade proteolítica máxima, bem como caracterizaram-se propriedades química e cinética das proteases extracelulares. Um total de 74 leveduras foram positivas para proteases extracelulares em ágar caseinato de sódio. As leveduras codificadas como 5-BV-ed₄ e 5-BXII-₁ foram isoladas da superfície de queijo tipo *Edam* e da mesa de manipulação, respectivamente. A levedura 5-BXII-₁, a qual obteve a maior atividade proteolítica, foi submetida a cultivo em diferentes fontes de nitrogênio, sob diferentes concentrações. Em

sulfato de amônio, a constante de afinidade (K_S) foi de $0,012 \text{ g.L}^{-1}$ e a velocidade máxima de crescimento (μ_{max}), de $0,36 \text{ h}^{-1}$. Em casaminoácidos, K_S foi de $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ e μ_{max} , de $0,39 \text{ h}^{-1}$. Já, em caseína, K_S foi de $0,34 \text{ g.L}^{-1}$ e μ_{max} , de $0,54 \text{ h}^{-1}$. Baixas concentrações de sulfato de amônio induziram maior atividade proteolítica por massa de células em culturas conduzidas sob regime de batelada. Maior atividade proteolítica esteve associada ao crescimento exponencial de leveduras cultivadas em batelada, tendo casaminoácidos como fonte de nitrogênio. Em cultura contínua sob condições limitantes de casaminoácidos, observaram-se resultados antagônicos, isto é, altas vazões específicas de alimentação (correspondentes a altas velocidades específicas de crescimento) resultaram em menor atividade proteolítica, enquanto baixas vazões específicas de alimentação (correspondentes a menores velocidades de crescimento) estiveram associadas às atividades proteolíticas máximas. Atividade proteolítica máxima foi observada na faixa de pH de 7,0 a 8,5 e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Embora 50% da atividade máxima tenha sido detectada de 45 a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, a atividade proteolítica em função da concentração do substrato azocaseína seguiu o modelo cinético de Michaelis e Menten. A atividade proteolítica no extrato enzimático foi inibida por EDTA, PMSF e pepstatina e pelos íons metálicos divalentes Co^{+2} , Mg^{+2} e Zn^{+2} e ativada pelo Mn^{+2} . Esses resultados indicam a presença de proteases da classe das aspartil proteases, metaloproteases e serino proteases no extrato enzimático extracelular da levedura 5-BXII-1.

ABSTRACT

SANTOS, Agenor Valadares, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2003. **Selection of proteolytic yeast from dairies and partial characterization of extracellular proteases.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Committee members: Maria Cristina Baracat Pereira and Hilário Cuquetto Montovani.

Yeast growing in cheese manufacturing environments possess properties of potential biotechnological interest. The yeast collection at the Microbial Physiology Laboratory (Bioagro-UFV) includes hundreds of yeast collected at five different dairies in the *Zona da Mata* of Minas Gerais State, ninety-four of which were tested to select that with the highest extracellular proteolytic activity. Growth conditions were optimized for maximum proteolytic activity by the selected yeast and the chemical and kinetic properties of its extracellular proteases were characterized. A total of 74 yeast tested positive for extracellular proteases in sodium caseinate agar. Yeasts 5-BV-ed4 and 5-BXII-₁ were isolated from the surface of Edam cheese and a cheese dairy countertop, respectively. Yeast 5-BXII-₁ presented the highest proteolytic activity and was thus grown on varying concentrations of different nitrogen sources. Nitrogen source half-saturation constants (K_s) and the maximum specific growth rates (μ_{max}) were

0.012g.L⁻¹ and 0.36 h⁻¹ for ammonium sulfate, 0.20 g.L⁻¹ and 0.39h⁻¹ for casaminoacids and 0.34 g.L⁻¹ and 0.54 h⁻¹ for casein. Lower ammonium sulfate concentrations induced higher specific proteolytic activity in batch cultures. Higher proteolytic activity was found during exponential growth of batch cultures when casaminoacids were the nitrogen source. Antagonistic results were observed for continuous cultures under casoaminoacid limiting conditions. Higher specific substrate flowrates (corresponding to high specific growth rates) resulted in lower proteolytic activity while low specific substrate flowrates (corresponding to lower growth rates) were associated with maximum proteolytic activities. Maximum proteolytic activity was observed in a pH range of 7,0 to 8.5 and at a temperature of 35°C, although 50% of the maximum activity was detected at 45 and 70°C. Proteolytic activity followed Michaelis-Menten kinetics when azocasein was used as substrate. Enzyme extract proteolytic activity was inhibited by EDTA, PMSF, pepstatin and the divalent metal ions Co²⁺, Mg²⁺ and Zn²⁺, while it was activated by Mn²⁺. These results indicate the presence of aspartyl, serine and metallo proteases in the extracellular enzyme extract of yeast 5-BXII-1.