

ESTUDO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E PECTINOLÍTICAS RELACIONADAS A MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO ESPUMOSA DO ABACAXI

Jamile Lenhaus Detoni¹, Adriana Marcia Nicolau Korres¹, José Aires Ventura², Patricia
Machado Bueno Fernandes¹

¹Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Marechal Campos,
1468, Maruípe, Vitória, ES. biotecnologia.ufes@gmail.com; ²Instituto Capixaba de Pesquisa,
Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper. Rua Afonso Sarlo, 160, Bento Ferreira, 29052-
010, Vitória, ES, ventura@incaper.es.gov.br.

INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é um dos frutos tropicais de grande importância no mercado mundial de frutas. Embora o Brasil seja um grande produtor, a abacaxicultura enfrenta sérios problemas fitossanitários. O Estado do Espírito Santo possui uma tradição no cultivo do abacaxi, principalmente na região litorânea do sul do Estado, que vem se expandindo nos últimos anos para a Região Norte, mas também sofre com as doenças que causam grandes perdas econômicas (VENTURA; COSTA, 2002)

Em períodos de elevada temperatura e umidade, na cultivar Pérola ocorre uma doença caracterizada por intensa fermentação do fruto, formação de bolhas, maceração de tecido e liberação de líquido, conhecida como “podridão espumosa” pelos agricultores devido à formação de espuma. Dos frutos doentes foram isolados três microrganismos prováveis causadores da doença, sendo duas leveduras (*Candida krusei* e *Kloeckera apiculata*) e uma bactéria (BTB0501). Segundo a literatura disponível, as leveduras não são relatadas como fitopatogênicas, porém alguns trabalhos as incluem como causadoras de doenças quando em interação com outros microrganismos (SPENCER, et al., 1992; ABRANCHES, et al., 2001). Algumas bactérias e leveduras relacionadas com doenças de plantas expressam sua ação patogênica pela produção de exoenzimas, tais como proteases, celulasas e pectinases (TOTH et al., 2003). Desta forma, este trabalho objetiva avaliar a produção de enzimas de patogênese

(proteínases e pectinases) dos microrganismos isolados e associados à doença “podridão espumosa” em frutos de abacaxi da cultivar Pérola.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e cultivo dos microrganismos

Os frutos com os sintomas da doença foram colhidos no campo em outubro de 2005 e foram isoladas duas leveduras (*Candida krusei* e *Kloeckera apiculata*) e uma bactéria, ainda não identificada (BTB0501). Os microrganismos foram cultivados em suco de abacaxi filtrado e autoclavado sob agitação orbital (120 rpm) por até 24 h. Para a realização dos testes qualitativos enzimáticos, fez-se a inoculação de cada microrganismo em monocultivo, bicultivo e combinação dos três. Os microrganismos foram inoculados em abacaxis da cultivar Pérola com vistas à reprodução dos sintomas (Postulados de Koch).

Testes enzimáticos qualitativos

Para a verificação da produção de enzimas proteolíticas, utilizaram-se duas metodologias: uma baseada na decomposição da gelatina (FAHY; PERSLEY, 1983) e outra baseada na hidrólise da caseína presente no leite, em que são utilizados dois meios distintos, meio A 0,5% peptona de soja, 0,5% cloreto de sódio, 1,5% triptona e 1,5% agar em 500 mL de água destilada e meio B leite em pó desnatado 20%), autoclavados separadamente, misturados e mantidos a 50° C. Para ambos os testes, a bactéria *Bacillus cereus* foi utilizada como controle positivo. O teste qualitativo da capacidade pectinolítica dos microrganismos foi feito pela coloração com vermelho rutênio em meio de cultura enriquecido com pectina cítrica (UENOJO et al., 2006). Como controle positivo, usou-se a bactéria *Pectobacterium carotovorum* var *carotovorum*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de qualificação da produção de enzimas de patogenicidade pelos microrganismos estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Resultados dos testes qualitativos para a produção de enzimas relacionadas à patogenicidade pelos microrganismos em monocultivo, bicultivo e a combinação dos três.

Microorganismo	Proteases**		Pectinases**
	Gelatina	Caseína do leite	Pectina cítrica
BTB	-	-	-
CK	-	-	++
KA	-	-	+
BTB + CK	-	-	++
BTB + KA	-	-	+
CK + KA	-	-	++
BTB + CK + KA	-	-	+++
<i>B. cereus</i>	+++	+++	NA
<i>P. c. carotovorum</i>	NA	NA	+++

BTB = BTB0501; CK = *C. krusei*; KA = *K. apiculata*;

- = Resultado negativo; +++ = Resultado muito expressivo; ++ = Resultado expressivo; + = Resultado pouco expressivo; NA = não avaliado.

Observou-se, portanto, para os experimentos conduzidos tanto no meio com gelatina quanto com caseína que não houve atividade das enzimas proteolíticas. Como estes microrganismos normalmente não secretam essas enzimas, a produção de proteases pode estar ocorrendo apenas para o metabolismo intracelular (MEDEIROS et al., 2003).

Já para as pectinases, todos os tratamentos, com exceção da bactéria em monocultivo, apresentaram alguma resposta positiva, porém a *P. carotovorum carotovrum* apresentou uma produção mais acentuada. Geralda-Silva et al. (2005) estudaram a capacidade pectinolítica de leveduras isoladas de frutas tropicais. Dentre tais leveduras, uma cepa de *Candida krusei* apresentou halo de degradação no meio contendo pectina, o que significa que esta espécie pode apresentar atividade pectinolítica. Em um estudo sobre a seleção de leveduras para a fermentação de uvas e melhor clarificação conduzido por Strauss et al. (2001) mostrou que alguns isolados de *Kloeckera apiculata* poderiam ser usados na produção de vinho devido a sua capacidade pectinolítica e celulolítica. No entanto, deve-se ressaltar que todos os isolados de levedura nesse trabalho mostraram respostas variadas nas mesmas condições de cultivo, o que evidencia a grande diversidade microbiana em relação a

sua bioquímica, o que também foi demonstrado por Romano e Marchese (1998), em um estudo sobre a produção de metabólitos voláteis em várias cepas de *K. apiculata* isoladas de frutos de carambola em estágio de fermentação. Apesar de ainda não identificada, a bactéria mostrou não ter capacidade de produção de enzimas pécticas, uma vez que não foi observado halo de degradação em meio com pectina cítrica.

Quando os três microrganismos foram cultivados juntos em meio contendo pectina cítrica, a formação do halo de degradação foi bem evidente. Uma possível explicação para esse resultado pode ser o sintrofismo entre eles, onde a resposta dada pela combinação dos três microrganismos mostra-se diferente em relação dada quando eles estão separados, isto porque um pode beneficiar o outro pela produção de algum metabólico ausente no meio de cultivo.

CONCLUSÕES

Os microrganismos associados com a podridão espumosa em frutos de abacaxi, isolados em 2005, mostraram ausência de proteases extracelulares, porém, mostraram, em determinadas combinações de interação, serem secretores de pectinases.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPES e FINEP pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, J.; STARMER, W. T. and HAGLER, A. N. Yeast-yeast interactions in guava and tomato fruits. **Microbial Ecology**, v.42, p. 186-192, 2001.

FAHY, F. C. and PERSLEY, G. J. **Plant bacterial disease – A diagnostic guide**. Sidney: Academic Press, 1983.

GERALDA-SILVA, E.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H. e SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**. V. 5, p. 859–865, 2005.



MEDEIROS, R. B.; FERREIRA, M. A. S. V. e DIANESE, J. C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**. Brasília: Editora Universidade de Brasília. p. 17-33, 2003.

ROMANO, P. e MARCHESE, R. Metabolic characterization of *Kloeckera apiculata* strains from star fruit fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 321-325, 1998.

SPENCER, D. M.; SPENCER, J. F. T.; FIGUEROA, L. e HELUANE, H. Yeasts associated with rotting citrus fruits in Tucumán, Argentina. **Mycology Researcher**, v. 96, p. 891-892. 1992.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G. e VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 182-190, 2001.

TOTH, I. K.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C. and BIRCH, P. R. J. Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 17-30, 2003.

UENOJO, M. e PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para a produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 509-515, 2006.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: abacaxi, banana e mamão. In: ZAMBOLIM, L. (Org). **Manejo integrado de doenças e pragas: fruteiras tropicais**. Viçosa-MG: UFV, 2002, p. 279-352.

20080718_164448