



MIGUEL AUGUSTO MACHADO DE ARAÚJO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA  
PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A  
PARTIR DE FRUTOS DO CERRADO**

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Janeiro – 2015

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA  
PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A  
PARTIR DE FRUTOS DO CERRADO**

Autor: Miguel Augusto Machado de Araújo  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Carina Elisei de Oliveira  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Marney Pascoli Cereda

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde”

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Janeiro – 2015

Ficha catalográfica

Araujo, Miguel Augusto Machado de  
A663i Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de  
interesse industrial a partir de frutos do cerrado / Miguel Augusto Machado  
de Araujo; orientação Carina Elisei de Oliveira. 2015  
68 f. + anexos

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom  
Bosco, Campo Grande, 2015.

1. Biotecnologia 2. Leveduras 3. Frutas – Cerrados 4. *Saccharomyces  
cerevisiae*, *Pichia SP* I. Oliveira, Carina Elisei de I. Título

CDD – 579.5



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
Valorizando talentos

## Isolamento e Seleção de Leveduras para Produção de Enzimas de Interesse Industrial a partir de Frutos do Cerrado

Autor: Miguel Augusto Machado de Araújo  
Orientadora: Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira  
Coorientadora: Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia  
Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

APROVADO em 30 de janeiro de 2015.

---

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB  
(orientadora)

---

Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro - UCDB

---

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite - UFGD

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida, e por toda a minha existência.

Agradeço a prof.<sup>a</sup> Dra. Carina Elisei, pela orientação, sempre ativa, e de forma gentil me guiou para uma abrangente linha de pesquisa, desde a escolha do tema, até a fase final, e a prof.<sup>a</sup> Dra. Marney Cereda, que como co-orientadora conseguiu me mostrar que com muita dedicação, conseguiria chegar a uma boa pesquisa.

Agradeço o prof. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, que me estendeu a mão em um período de dificuldade da minha pesquisa, liberando seu laboratório, para que pudesse finalizar minha pesquisa, se mostrando uma pessoa especial.

Guardarei com grande carinho as dicas dadas de todos os professores.

Agradeço a todos os colegas do mestrado, em especial, às queridas Renata, Claudinha, Ariadne, e o Marcos, onde sempre pude me apoiar para seguir em frente.

Deixo um agradecimento especial a todos que tiveram paciência e bondade em me transmitir conhecimentos práticos, que pude conviver nos laboratórios da UCDB, Laís, Rafaela, Maria Helena, Regilene e todos os outros, e o pessoal da UFGD-Dourados, em especial a Paulinha, a Nayara e o Tobias, que se mostraram atenciosos e muito pacientes.

À minha família, pelos inúmeros incentivos, pela compreensão das ausências, e claro, pelo apoio sem fim.

À minha querida esposa, Rafaele Carla Pivetta de Araújo, que me apoiou desde o início, com a escolha do programa, e que no meio da correria com a pesquisa, a escrita e as inúmeras viagens, me convenceu a casar, e então me mostrou a felicidade plena, te amo sempre.

A CAPES pelo incentivo da bolsa, que sem ela, seria muito difícil a realização dessa pesquisa.

A todos os meus amigos, obrigado.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Miguel Augusto Machado de Araújo, filho mais novo de Altezevelte Dutra de Araújo e Terezinha Aparecida Machado de Araújo, possui dois irmãos, sendo o mais velho, João Paulo Machado de Araújo e o do meio, Luiz Gustavo Machado de Araújo.

Nasceu em 22/11/1984 na cidade de Dourados, onde reside com a sua esposa Rafaela Carla Pivetta de Araújo.

Em 2002, prestou vestibular para o curso de Biomedicina, no Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN, onde foi aprovado, vindo a finalizar o curso regularmente no ano de 2005, tornando-se então bacharel em Biomedicina.

Em 2007 finalizou o curso de pós graduação *lato sensu* em análises clínicas pela Universidade Estadual de Londrina – UEL.

Em 2013 Ingressou no programa de mestrado *strictu sensu* em Biotecnologia, como aluno regular, na Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. Área de concentração: Biotecnologia aplicada à Saúde, sendo bolsista do programa CAPES/PROSUP 2013.

Em 2014 concluiu o curso de pós graduação *lato sensu* em Gestão em Saúde Pública pelo Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN.

Trabalha no Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN, desde o ano de 2007 como professor dos cursos da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde.

Trabalha como analista clínico no laboratório do Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados – HU-UFGD/EBSERH, desde junho/2014.

## SUMÁRIO

|   | Página |
|---|--------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 1      |
| 1.1 Cerrado.....  | 3      |
| 1.2 Frutos do Cerrado.....  | 3      |
| 1.2.1 Guavira ( <i>Campomanesia adamantium</i> ).....   | 4      |
| 1.2.2 Pinha ( <i>Annona squamosa</i> L.).....   | 5      |
| 1.2.3 Ingá ( <i>Inga edulis</i> ).....  | 7      |
| 1.2.4 Microbiota dos frutos .....   | 8      |
| 1.3 Leveduras.....  | 10     |
| 1.4. Identificação de leveduras por técnicas microbiológicas convencionais.   | 11     |
| 1.5 Marcadores moleculares utilizados na identificação de leveduras .....   | 12     |
| 1.5.1 Aplicação de Marcadores Moleculares Baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....                               | 13     |
| 1.5.2 Análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA Ribossomal (RFLP/rDNA).....                                  | 14     |
| 1.6 Enzimas industriais.....  | 15     |
| 1.6.1 Amilases.....   | 16     |
| 1.6.2 Celulases.....  | 17     |
| 1.6.4 Invertases.....   | 19     |
| 1.6.5 Pectinases.....   | 20     |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 21     |
| 2.1 Objetivo geral .....  | 21     |
| 2.2 Objetivos específicos.....  | 21     |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 22     |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 24     |
| <b>ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE FRUTOS DO CERRADO</b> ..... | 33     |



## LISTA DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Figura 1</b> – Frutos de Guavira no local da coleta.....                                  | 17     |
| <b>Figura 2</b> - Frutos de Pinha no local da coleta.....                                    | 18     |
| <b>Figura 3</b> - Frutos do Ingá.....  | 19     |
| <b>Figura 4</b> - Representação da estrutura do DNA ribossomal (rDNA) em eucariotos<br>..... | 25     |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**PCR** – Reação em cadeia de polimerase

**RFLP** – Análise do polimorfismo por fragmento de restrição

**CAT** – Linhagem de levedura proveniente da usina de Catanduva – *Saccharomyces cerevisiae*.

**RAPD –PCR** - Reação em cadeia de polimerase – Random Amplified Polymorphic

**YEPD** – Meio composto de extrato de levedura, peptona e dextrose.

**ITS1-ITS2** - espaços transcritos internos

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**RNA** – Ácido Ribonucleico

**EC** – Comissão de Enzimas, do inglês, Enzyme Commission

## RESUMO

A seleção de leveduras a partir de frutos do cerrado brasileiro tem sido uma das escolhas para obtenção de produtos a partir de processos fermentativos. Com a bioprospecção, tem-se aumentando o número de espécies descritas, e ainda, as enzimas que estas leveduras produzem. As leveduras possuem características peculiares, tais como especificidade na produção de enzimas, diversidade, capacidade de produção em larga escala e facilidade no seu manuseio. Objetivou-se com o presente trabalho isolar, identificar e avaliar o potencial biotecnológico de leveduras associadas a frutos do Ingá (*Inga edulis*), Guavira (*Campomanesia adamantium*) e Pinha (*Annona squamosa*). As leveduras foram isoladas em meio YEPD sólido, para a obtenção de culturas puras. Os diferentes morfotipos isolados foram caracterizados genotipicamente pela técnica molecular da PCR/RFLP baseado na amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e digestão com a enzima *Hinf* I, estas análises resultaram em perfis de bandas correspondentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia* e *Candida*, os quais foram confirmados por meio do sequenciamento da região ITS1-5.8rDNA-ITS2, resultando nas espécies *Candida citri*, *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii*, *W. (Pichia) kudriavzevii*, *Meyerozyma (Pichia) caribbica* e *Saccharomyces* sp. Foi avaliado o potencial biotecnológico das linhagens, com a produção de enzimas e detecção por métodos colorimétricos através de espectrofotometria. A partir dos nove isolados de leveduras, pôde-se obter a enzima invertase ( $15,83 \pm 0,80$  UI/mL) produzida por *Meyerozyma (Pichia) caribbica*. Quanto a enzima pectinase, ( $2,8 \pm 0,03$  UI/mL) foi produzida por *Meyerozyma (Pichia) caribbica*. A enzima  $\beta$ -glicosidase ( $1,84 \pm 0,18$ ) foi produzida pelo isolado *Meyerozyma (Pichia) caribbica*. Conclui-se portanto que os métodos de identificação foram efetivos, e os métodos para detecção de enzimas mostraram resultados promissores, que visa a continuidade dos estudos em etapas futuras.

**Palavras-chave:** Leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. Bioprospecção, Enzimas.

## ABSTRACT

The selection of yeast from fruits of Brazilian Cerrado has been one of the choices for obtaining products from fermentation processes. With biopanning, there is increasing the number of species described, and also the enzymes that produce these yeasts. Yeasts have peculiar characteristics such as specificity, diversity, large-scale production capacity and ease of handling. The objective of the present work to isolate, identify and assess the biotechnological potential of yeasts associated with fruits of Inga (*Inga edulis*), Guavira (*Campomanesia adamantium*) and Pine (*Annona squamosa*). The yeasts were isolated in YEPD solid medium to obtain pure cultures. The different isolates were characterized genotypically morphotypes the molecular technique of PCR / RFLP based on amplification of ITS1-5.8S-ITS2 region of ribosomal DNA and digestion with the enzyme *Hinf* I, these analyzes resulted in corresponding bands profiles to *Saccharomyces* sp. *Pichia* sp. and *Candida* sp. which were confirmed by sequencing the ITS2-ITS1-5.8rDNA, Species resulting in *Candida citri* *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii*, *W. (Pichia) kudriavzevii*, *Meyerozyma (Pichia) caribbica* and *Saccharomyces* sp. To evaluate the potential of biotechnology was performed enzyme induction and detection by colorimetric methods using PNPG substrates (4-nitrophenol  $\beta$ -glucopyranoside, Sigma) and DNS (3,5-dinitrosalisilic acid) performed by spectrophotometry. From the nine isolates of yeasts, it was possible to obtain the enzyme invertase ( $15.83 \pm 0,80$ UI / mL) produced by *Meyerozyma (Pichia) caribbica*. As pectinase enzyme ( $2.8 \pm 0.03$  IU / ml) was produced by *Meyerozyma (Pichia) caribbica*. The  $\beta$ -glucosidase enzyme ( $1.84 \pm 0.18$ ) was produced by isolated *Meyerozyma (Pichia) caribbica*. It is therefore concluded that the identification methods were effective, and methods for the detection of enzymes showed promising results, which aims to further study in future steps.

**Key-words:** Yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. bioprospection, enzymes.

## 1. INTRODUÇÃO

O termo biotecnologia pode ser definido como a aplicação de técnicas biológicas em organismos vivos, ou suas partes, para obter um produto, processo ou serviço. Estes podem englobar tecnologias de diversos níveis, desde uma fermentação para produção de alimentos e bebidas até tecnologias modernas de manipulação genética que resultem na produção de proteínas com aplicações terapêuticas (MYERS et al., 2000).

A prospecção de agentes produtores de enzimas é um dos campos mais promissores dentro da Biotecnologia, não somente pelo fato de agregar grande valor à produção em níveis industriais de materiais de consumo humano, como também por representar a possibilidade de uso mais eficiente dos infinitos recursos naturais renováveis de todo o planeta (FARIAS; VITAL, 2008).

A diversidade genética e metabólica dos microrganismos em diversos ambientes tem sido explorada desde os primórdios da humanidade, por sua potencialidade em gerar produtos e processos biotecnológicos. A produção de antibióticos - (penicilina), alimentos- (molho de soja), e os diversos tipos de queijos, iogurtes, bebidas (vinho e cerveja), e de combustível (álcool) são alguns dos exemplos do uso tradicional dos microrganismos (BORÉM, 2005). Com o avanço das descobertas, para o conhecimento de substâncias bioativas descritas a partir da década de 50, o uso das enzimas produzidas por microrganismos deu um salto gigantesco, saindo do uso doméstico em pequena escala, para o uso em escala industrial de produção (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

As indústrias têxteis, papel e celulose, agroquímica, farmacêutica, processamento de couro, biocombustíveis, alimentícia, e processamentos ambientais,

entre outras, são responsáveis pelo crescimento exponencial do mercado de enzimas nas últimas décadas, por dois motivos principais, a eficiência e economia nos processos produtivos e a preocupação mundial com a sustentabilidade ambiental, que ambos exigidos pelo mercado consumidor, de que sejam utilizadas tecnologias ambientalmente mais adequadas com rigoroso acompanhamento governamental dos resíduos descartados no ambiente (ÁVIDOS; FERREIRA, 2003). Este cenário é particularmente importante para o Brasil, país que necessita inserir-se de forma representativa como usuário de Tecnologia Enzimática, que concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental. O mercado mundial de enzimas industriais é dividido basicamente em três segmentos: i) enzimas técnicas (destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza), ii) enzimas para alimentos e bebidas e iii) enzimas para ração animal. As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulases e xilanases (BORÉM, 2005).

De forma geral, as enzimas podem ser obtidas de diferentes fontes, microrganismos, animais e vegetais. As fontes microbianas são utilizadas por apresentarem diversas vantagens, como a diversidade metabólica, o reduzido tempo de produção e menor custo de produção, e dentre os mais citados para a produção de enzimas se encontram os fungos leveduriformes e filamentosos (GUPTA et al., 2002). Microrganismos, como as leveduras, adquiridos de uma mesma fonte possuem o potencial de produzir enzimas com características completamente ou parcialmente diferentes, e por este motivo a busca por novas fontes microbianas continua sendo foco de vários pesquisadores.

As leveduras por possuírem características vantajosas, como a alta taxa de crescimento em ampla variedade de substratos, curto tempo para fermentação, capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular e baixo potencial patogênico (COUTO; NEVES; PORTO, 2008).

Este trabalho tem como justificativa o isolamento e seleção de cepas de leveduras produtoras de enzimas hidrolíticas, a partir de frutos do Cerrado sul mato-grossense, enfatizando as enzimas amilases, Celulases (CMCases e  $\beta$ -glicosidases), invertases, xilanases e pectinases.

## 1.1 Cerrado

O Cerrado é um dos *hotspots* para a conservação da biodiversidade mundial (MYERS et al., 2000), ocupa cerca de 25% do território nacional, 13 estados e o distrito federal, abrangendo principalmente as regiões centro-oeste, norte e nordeste do país, caracterizado pela mais rica flora dentre as savanas do mundo, com mais de 7.000 espécies, entretanto com grande taxa de degradação e devastação (RODRIGUES, 2004).

O Cerrado é formado pelo conjunto de formações vegetais de aspectos e fisionomia variáveis, principalmente de árvores baixas e retorcidas que se misturam a um exuberante estrato herbáceo rasteiro. O Cerrado apresenta altos índices de endemismos para as plantas, das 10.000 de suas espécies, 4.400 é endêmico o que representa 1,5% de toda flora mundial (MEDEIROS, 2011).

O Cerrado Brasileiro possui área superior a 2.000.000 km<sup>2</sup> (equivalente a 23% do território nacional). Abrange os Estados de Goiás, Tocantins, parte dos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo e também ocorre em áreas disjuntas ao norte, nos Estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul no norte do Estado do Paraná (ÁVIDOS; FERREIRA, 2003).

A rica biodiversidade da flora brasileira é pouco estudada, tanto para espécies frutíferas, como os microrganismos envolvidos (OLIVEIRA et al., 2008; ÁVIDOS; FERREIRA, 2003). A flora do Cerrado corresponde a mais de 12% de toda biota vegetal brasileira, inclui diversas espécies frutíferas com grande potencial de utilização industrial, por conter elevados teores de açúcares, proteínas, sais minerais, ácidos graxos, vitaminas e carotenóides (SILVA et al., 2001).

Os monossacarídeos como a glicose e frutose são açúcares encontrados em flores, frutos e sementes de algumas plantas, o que torna estes substratos um habitat natural para as leveduras (MARQUES-MARÇAL, 2005).

## 1.2 Frutos do Cerrado

Dentre as espécies frutíferas que se destacam no bioma Cerrado encontram-se algumas dezenas de frutos comestíveis, que apresentam valor econômico e nutricional, além da importância cultural, devido ao alto consumo pela população. Os

frutos do Cerrado, em sua maioria, apresentam suculência e sabor agradável (CÔRREA et al., 2008; MOURA et al., 2013).

Os frutos nativos do Cerrado apresentam elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas, minerais e fibras, possuindo grande aceitação popular. A utilização de tecnologias pós-colheita pode viabilizar o desenvolvimento sustentável da agricultura familiar e de pequenas comunidades rurais, através do aumento do período de comercialização dos frutos, com melhor aproveitamento da produção e agregação de valor, além de incentivar o consumo de alimentos regionais com potencial valor nutritivo e funcional (CAMPOS et al., 2012).

Quando se espera agregar valores aos frutos do Cerrado, várias barreiras devem ser ultrapassadas, desde as poucas informações e estudos sobre os ciclos produtivos e suas propriedades, e a padronização dos produtos derivados, devido às diferenças regionais (SANTOS et al., 2012).

Desta forma, entre as diversas espécies de frutos do Cerrado, foram incluídos nesta pesquisa os frutos Guavira, Pinha, e Ingá, como fonte de microrganismos com potencialidade para aplicação em bioprocessos. As propriedades biotecnológicas ou medicinais destes são popularmente conhecidas fazendo parte do conhecimento tradicional, mas por outro lado, ainda são; desconhecidas no meio científico. Justificando assim, pesquisar e identificar essas propriedades.

#### 1.2.1 Guavira (*Campomanesia adamantium*)

A Guavira também conhecida como guabiroba ou guaviroba, pertence à família Myrtaceae, que compreende plantas arbóreas, hermafroditas, normalmente encontradas em forma de moita ou pequenos arbustos medindo de 0,8 a 1,5 metro. O período de floração da Guavira na região de Cerrado é previsto para os meses de setembro a novembro, e os frutos amadurecem por volta de novembro. O fruto da Guavira tem coloração amarelada de epiderme lisa e sabor adocicado. Suas folhas geralmente são glabras coradas em verde-cinza e flores brancas com manchas vermelhas e amarelas (ASSIS, 2011; SANTOS et al., 2010; MARIN et al., 2008).





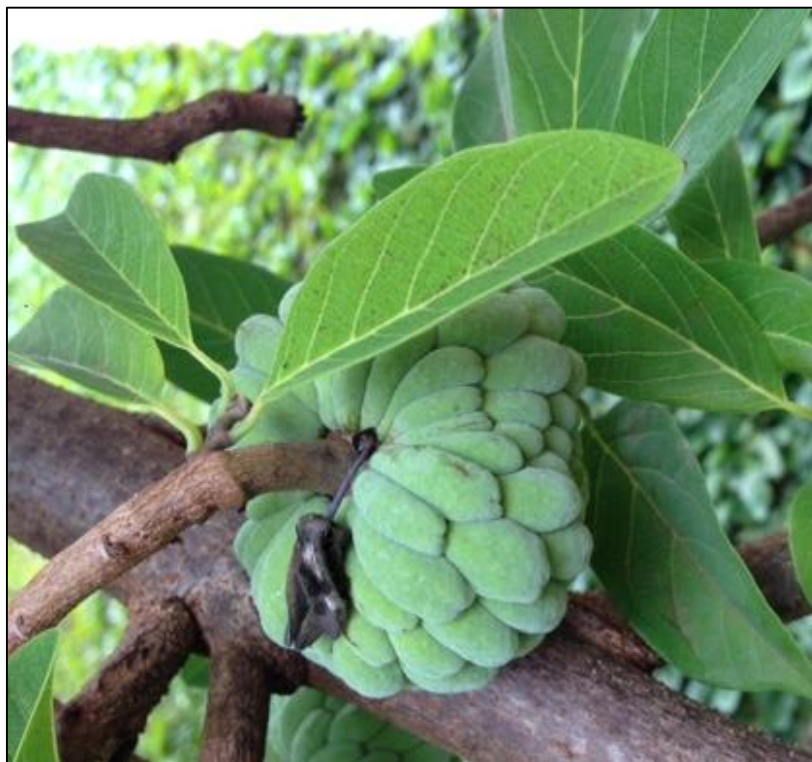
**Figura 1** – Frutos de Guavira no local da coleta. Fonte: O autor.

O fruto da Guavira apresenta polpa succulenta, encontrada em grande quantidade nos campos e Cerrados de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Os frutos succulentos e ácidos apresentam potencial para serem utilizados *in natura*, na indústria de alimentos, como flavorizantes, estabilizantes e gelificantes, e na indústria de bebidas com a aplicação de sabor. Também é empregada em indústrias farmacêuticas como anti-inflamatório, antidiarreico, antisséptico das vias urinárias, e utilizada contra reumatismo, de forma que seus compostos são retirados e encapsulados, sem possuir fator toxicológico conhecido para seres vivos (LORENZI et al., 2006).

#### 1.2.2 Pinha (*Annona squamosa* L.)

A Pinha, popularmente conhecida como fruto do conde, marolo ou ata, pertence à família Annonaceae e ao gênero *Annona*, com árvores de tamanho variáveis, podendo atingir até sete metros de altura. Flores de coloração esverdeada ou branco-amarelada, florescem de setembro a outubro. Seus frutos possuem forma globosa ou alongada chegando a pesar até cinco quilos, contém numerosas sementes presas a uma polpa amarelada, envolvida por uma casca de coloração amarelo amarronzada,

recoberta por escamas carnosas. Seu período de frutificação varia entre os meses de dezembro a abril (AVIDOS, 2003).



**Figura 2** – Frutos de Pinha no local da coleta. Fonte: o autor.

As anonáceas representam um nome genérico para designar as plantas da família Annonaceae constituída por cerca de 120 gêneros e em torno de 2.300 espécies. No Brasil, estão registrados 29 gêneros, dentro dos quais cerca de 260 espécies sendo algumas de importância econômica. Entre as espécies de maior importância comercial destacam-se a graviola (*Annona muricata* L.), pinha (*Annona squamosa* L.), cherimóia (*Annona cherimoia*, Mill.), e com menor impacto produtivo o araticum do Cerrado ou araticum bruto (*Annona crassiflora*). A pinha, fruta-do-conde ou ata encontra-se disseminada em quase todos os continentes, conhecida na língua inglesa com “sugar apple” ou “sweet sop”, “rinon” em espanhol e “ata” em francês. Foi introduzida no Brasil, precisamente na Bahia, na terceira década do século XVII e é cultivada em todo o Brasil, comercialmente ou em fundo de quintal. Muito apreciada pelo excelente sabor, porém apresenta muitas sementes aderidas à polpa o que tem restringido a sua exportação (SOBRINHO, 2010).

### 1.2.3 Ingá (*Inga edulis*)

O Ingá (*Inga edulis*) popularmente conhecido como Ingá amarelo, pertence ao gênero *Inga*, e à família Fabaceae, um grupo notável pela sua morfologia uniforme. Possui grande porte arbóreo, chegando a 40m de altura, folhas curtas, todas as espécies de Ingá produzem frutos em vagens, que podem atingir até mais 1m de comprimento, mas no geral, atingem cerca de 30 a 40 cm de comprimento. A casca tem coloração amarela acastanhada quando madura, e seus frutos são embebidos em polpa suculenta, pouco fibrosa, de cor branca, com agradável sabor. A florescência ocorre nos meses de junho a setembro, e a frutificação ocorre entre outubro e fevereiro (CARAMORI, 2008).



**Figura 3** – Frutos do Ingá. Fonte: < <http://viveironativo.blogspot.com.br/p/tipos-de-plantas.htm> > |

Ingá se originou do termo tupi “in-gá” que significa embebido, empapado, ensopado, devido a consistência da polpa aquosa que envolve as sementes, levemente fibrosa e adocicada, bastante rica em sais minerais, e é consumida ao natural. Também é usada na medicina caseira, sendo útil no tratamento da bronquite (administrado na forma de xarope) e como cicatrizante (utilizado na forma de chá) (REZENDE et al., 2011).

#### 1.2.4 Microbiota dos frutos

Na natureza grande parte da atividade enzimática necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por fungos filamentosos, leveduras e bactérias. As diversas partes das plantas (raízes, caule, folhas, flores, frutos e etc.) constituem um dos substratos mais abundantes para o desenvolvimento de uma vasta gama de microrganismos (FOKKEMA, 1991). As interações entre as plantas e os fungos são conhecidas há tempos, com destaque para a simbiose, microrganismos vivendo no interior da planta, chamados de fungos endofíticos. Particularmente, as leveduras isoladas de frutos geralmente são boas fermentadoras e assimilam glicose, etanol, glicerol e celobiose (PHAFF; STARMER, 1987).

Os frutos são micro habitats importantes para uma variedade de espécies de leveduras na natureza. Devido à sua alta concentração de açúcares simples e de baixo pH e visitas constantes por insetos vetores. Nestes substratos o desenvolvimento das leveduras envolve diversos processos bioquímicos e ecológicos, incluindo a deterioração do fruto. A presença de enzimas proteolíticas e pectinolíticas desempenham um papel muito importante no estabelecimento e manutenção da comunidade de levedura, durante a colonização dos frutos, alguns destes fatores pode conferir vantagens adaptativas para algumas espécies, a presença de cepas produtoras de  $\beta$ -glicosidase pode ajudar a melhorar as características aromáticas de frutos, além de ter importância biotecnológica para aplicação na indústria de alimentos (MAMBUSCAY et al., 2013).

As leveduras estão associadas a processos fermentativos e substratos que contenham açúcares (hexoses). Entretanto, a habilidade das leveduras em assimilar grande número de compostos orgânicos, expande a sua capacidade de dispersão e de ocupação dos nichos ecológicos que contenham estes compostos, dentre as leveduras, os gêneros *Candida*, *Debariomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Sporobolomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Bullera*, *Torulaspota*, *Rodotorula* e *Zygosacharomyces* se destacam como potenciais para a produção de várias enzimas como celulases, pectinases, lipases, proteases, xilanase entre outras. Pelo fato da maioria das espécies de leveduras não apresentarem as características patogênicas, a utilização na indústria se torna mais fácil (CRUZ et al., 2009).

Alguns estudos sobre diversidade de leveduras realizados no Brasil, demonstraram que diferentes habitats como insetos, flores e frutos, apresentam comunidades de leveduras características, com biótipos diferentes, e até mesmo novas espécies (HAGLER et al., 1993; LANDELL; VALENTE, 2009). Leveduras produtoras de lipases foram isoladas dos frutos do cerrado, manga e tamarindo, em Tocantins por Fernandes e Silva (2013), apresentando resultados promissores para aplicação em bioprocessos, como a produção de detergentes, conferindo diferentes métodos para seleção em pontos estratégicos do estado.

Como aplicação em processos fermentativos, Pietrowski, Wosiacki e Nogueira (2011), descrevem que os estudos de biodiversidade e dinâmica populacional dos ecossistemas fermentativos, bem como a identificação de leveduras selecionadas por interesses diversos, como produção de enzimas, funções probióticas, produção de aromas, podem revelar cepas com excelente potencial tecnológico. Em sua pesquisa, foram isoladas a partir do fermentado de maçã leveduras produtoras de esterases,  $\beta$ -glicosidases, lipases, proteases, entre outras enzimas.

Silva, Guerra e Blini (2013), descrevem que os nutrientes que estão disponíveis no filoplano (superfície foliar) do pequiheiro, em vegetação remanescente do Cerrado, servem de base para o desenvolvimento de populações de leveduras, pois conseguiram isolar no município de Três Lagoas-MS diversas espécies de leveduras, e que estas apresentaram atividade amilolítica contra diversas concentrações de amido acrescido ao meio. Isso demonstra que diversas pesquisas envolvendo a distribuição de leveduras nos mais diversos locais das plantas, e pontos do Cerrado brasileiro estão sendo realizadas Peixoto (2006), analisou a produção de enzimas amilolíticas a partir de amostras coletadas do solo, pólen e frutos de diversas regiões do país como: Cerrado, Floresta Amazônica e Mata Atlântica. Dentre as cepas testadas para atividade amilolítica em meio sólido, aquelas coletadas na região da Floresta Amazônica apresentaram maiores atividades em relação às cepas coletadas no Cerrado e Mata Atlântica.

Segundo Skinner et al., (1980), a microbiota natural de leveduras dos frutos em geral é composta pelos gêneros *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e raramente por *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*.

Prada e Pagnocca (1997), realizaram um levantamento das leveduras existentes em frutos nativos da Mata Atlântica no litoral sul paulista, especificamente

na Reserva Florestal Juréia-Itatins. O trabalho mostrou que alguns gêneros predominaram, especialmente *Candida* e *Kloeckera*, os quais ocorreram em uma grande variedade de substratos.

Leveduras de frutos típicos do Cerrado, depositadas na Rede Centro Oeste de Leveduras (RECOL), apresentaram a produção de enzimas como xilanase (26,3U/g), CMCase (11,6U/g) e amilase (51,6U/g). Conseguindo inclusive expressiva produção de enzimas amilolíticas com resultados acima de 240,4U/g (Oliveira et al., 2012). Porém, no referido trabalho não foram descritas as espécies de leveduras que apresentaram expressão enzimática.

Estudos como os descritos anteriormente, mostram a evidente necessidade da continuação deste modelo de pesquisa, pois ainda existe uma lacuna entre a identificação total em nível de espécies e resultados de concentrações enzimáticas. Portanto, esse tipo de pesquisa estimula trabalhos futuros, tendo em vista a importância biotecnológica que cada isolado possui.

### 1.3 Leveduras

Leveduras são microrganismos pertencentes ao reino Fungi, com características típicas, como presença de parede celular rígida, forma oval ou redonda, núcleo organizado com membrana nuclear se reproduzem através de reprodução sexuada por meio de células especializadas denominadas de esporos e por reprodução assexuada por brotamento (KURTZMAN; FELL, 1998).

Atualmente, mais de 700 espécies foram prospectadas a partir de diferentes substratos, seja no meio ambiente ou até mesmo em seres humanos e animais, estas espécies apresentam características patogênicas ou não, diversidade metabólica e são capazes de assimilar diversos compostos orgânicos, garantindo grande capacidade de manipulação para produção de enzimas (SANTOS et al., 2012).

Desde o milênio passado as leveduras são utilizadas pelo homem na produção de diversos tipos de alimentos, como por exemplo, no crescimento de pães e produção de bebidas, estas vêm sendo utilizadas na indústria para a produção de compostos químicos, combustíveis, aplicação na indústria alimentícia, têxtil, produção de fármacos, entre outras aplicações (MOURA, 2013).

Para a efetiva utilização de um microrganismo para produção de enzimas de interesse industrial, o mesmo deve ser isolado, identificado, podendo inclusive partir

de coleções já conhecidas, como são utilizadas em diversas instituições de ensino e pesquisa. O microrganismo escolhido deve suportar diversas condições ambientais, como forma de garantia para sua sobrevivência, o mesmo deve apresentar elevada capacidade de síntese e secreção, deve suportar a pressão osmótica, alterações de pH e temperatura, ser tolerante às substâncias tóxicas geradas no próprio processo fermentativo e finalmente ser seguro no ponto de vista biológico (TAO et al., 2012; PRETORIUS et al., 2003).

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 e baixa patogenicidade (FARIAS; VITAL, 2008).

Os processos industriais que envolvem reações químicas estão presentes na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem, desde a pré-história. Muitas dessas reações são catalisadas por catalisadores químicos, que podem ser substituídos por enzimas. O uso de microrganismos como fonte biotecnológica de enzimas, principalmente, as extracelulares, tem sido impulsionado pela bioprospecção, seleção e otimização do processo de produção para serem utilizados em larga escala. A utilização de enzimas em substituição aos produtos químicos apresenta vantagem pela fácil manipulação e viabilidade ecológica (MONTEIRO, 2009).

O uso de leveduras como fonte para produção de enzimas relevantes para a indústria tem estimulado o interesse na exploração da atividade destes microrganismos diminuindo a distância entre as empresas e os centros de pesquisa universitários (FUENTEFRÍA, 2004).

#### 1.4. Identificação de leveduras por técnicas microbiológicas convencionais

Os métodos convencionais para a caracterização taxonômica de leveduras são baseados em provas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, incluindo fermentação em diversos substratos, o que avalia a assimilação de diversas fontes de nitrogênio e carbono, crescimento em variadas escalas de temperatura e pH. Porém, a taxonomia

convencional é limitada, pois diversas linhagens se assemelham macroscopicamente, com praticamente as mesmas características morfológicas de colônia e células (BARNETT et al., 2000; KURTZMAN; FELL, 1998).

Além de todas as aplicações tecnológicas que podem surgir a partir de estudos de diversidade de leveduras, é importante ressaltar a grande carência de estudos focando diversidade, relacionando à ecologia, à genética e à biologia de populações, principalmente em ambientes naturais. O número de espécies descritas até o ano de 1998 era de aproximadamente 700 (KURTZMAN; FELL, 1998).

Para uma efetiva classificação morfológica, os aspectos macroscópicos das colônias que devem ser analisados são cor, textura, tamanho, elevação, tipo de borda, brilho e forma. Os aspectos microscópicos das células isoladas devem contemplar a forma, presença de filamentos, brotamento e o tipo de esporos. Esses dados devem ser comparados com dados de leveduras já catalogadas. A caracterização morfológica deve ser complementada com dados obtidos por técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento, pois estas técnicas permitem caracterizar diversos microrganismos, como as leveduras, de uma forma rápida, precisa e econômica. (CECCATO-ANTONINI; SUDBERY, 2004; GAVIRIA; CADAVID, 2012).

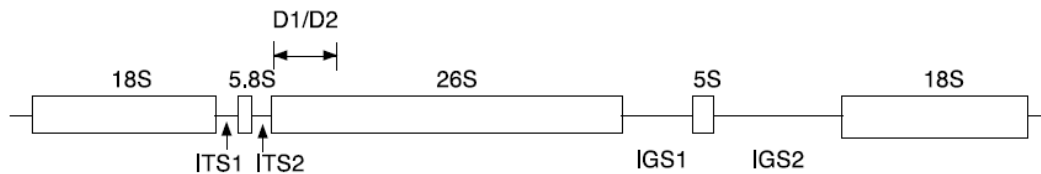
### 1.5 Marcadores moleculares utilizados na identificação de leveduras

Testes moleculares vêm sendo utilizados em grande escala como ferramenta na identificação de leveduras, principalmente as linhagens que não possibilitam sua diferenciação através de características morfológicas essenciais, impossibilitando a por métodos convencionais de identificação. Portanto, para a identificação e análise filogenética, é indispensável o uso das ferramentas de caracterização molecular que utilizam desde proteínas e RNA, até o próprio DNA como alvo de identificação. O alvo mais frequente nas pesquisas de identificação molecular por PCR e suas variações são os DNA ribossomais. Os genes de DNA ribossomal são encontrados em todos os microrganismos e são conhecidos por acumular mutações lentas (KURTZMAN; FELL, 1998).

Em leveduras, os genes ribossomais estão organizados em *clusters*, na disposição 5'-3', da seguinte forma, segmentos 5S, 5.8S, 18S e 26S, que estão presentes em várias cópias no genoma (Figura 4). Os espaços transcritos internos



(ITS) se intercalam entre esses genes e são denominados ITS1 e ITS2. Estas regiões são menos conservadas e são utilizadas para discriminar espécies relacionadas (BARNET et al., 2000).



**Figura 4** – Representação da estrutura do DNA ribossomal (rDNA) em eucariotos.

Fonte: SUGITA; NISHIKAWA, 2003.

Outra região utilizada na identificação molecular de leveduras é a região D1/D2 do fragmento 26S do DNA ribossomal (rDNA), pois em diversos estudos esta região foi sequenciada e mostrou ser capaz de diferenciar as espécies de leveduras testadas (KURTZMAN; FELL, 1998).

Vários estudos têm demonstrado que através das análises das regiões ITS e D1/D2 é possível à identificação de leveduras, em gênero e espécie (FELL et al., 2000). Para uma análise mais segura, Fonseca et al. (2000) descrevem a importância da análise conjunta da região D1/D2 e regiões ITS.

#### 1.5.1 Aplicação de Marcadores Moleculares Baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O uso em larga escala da técnica de PCR utilizando uma enzima DNA polimerase termoestável e termocicladores programáveis com elevada capacidade de processamento, permitiram grande automatização à síntese *in vitro* de DNA. A técnica consiste em amplificar seletivamente *in vitro* um segmento de DNA, delimitado por um par de *primers* de sequências específicas de nucleotídeos de fita simples (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

*Primers* são sequências curtas de DNA (oligonucleotídeos), que hibridizam com o DNA molde, iniciando a síntese de uma nova fita de DNA, e então produzir milhares de cópias dessa sequência em poucas horas. As reações ocorrem em um termociclador, aparelho capaz de, em ciclos alternados de temperatura, desenvolver três etapas, a primeira, ocorre a desnaturação da fita dupla do DNA, posteriormente,

os *primers* se anexam às sequências complementares específicas que flanqueiam o gene alvo, e então a nova fita de DNA é sintetizada a partir das extremidades 3'-OH livres dos *primers* através da enzima DNA polimerase. Os ciclos são repetitivos, e a amplificação do DNA alvo ocorre em progressão geométrica, requerendo uma quantidade muito pequena de DNA molde (LANDELL; VALENTE, 2009).

A técnica pode ser aplicada a qualquer situação que necessite da amplificação de regiões do DNA, onde pode-se obter um aumento da quantidade de uma determinada sequência de DNA. Sua aplicação tem sido largamente empregada no melhoramento vegetal e animal, taxonomia de microrganismos de interesse médico e industrial, diagnóstico de vários tipos de cânceres, e em estudos de DNA forense, entre outros (SAIKI et al., 1998).

#### 1.5.2 Análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA Ribossomal (RFLP/rDNA)

A síntese de proteínas depende da participação do RNA ribossômico (rRNA) no processo de tradução da informação genética, e o rDNA, encontrado no núcleo e também no citoplasma celular, tem função de codificação do rRNA.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, como na maioria dos eucariotos, quatro diferentes genes, ou regiões gênicas, do rDNA aparecem em blocos na disposição 5'-3' (5S, 5.8S, 18S e 26S), estando repetidos em dezenas de cópias no genoma, sem apresentar variação na sequência. As regiões intergênicas (ITS1 e ITS2) representam sequências internas transcritas, que, entretanto não são traduzidas para as subunidades do rRNA, e possuem grande variação entre espécies (LANDELL; VALENTE, 2009).

A região ITS1-5.8S-ITS2 pode ser repetida inúmeras vezes (em "tandem") através de iniciadores universais homólogos às sequências finais dos genes 18S e 26S. Contudo, através da variação desta região, tem-se obtido polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição nos locos de rDNA (RFLP) através do uso de enzimas de restrição. Os fragmentos são separados em gel de agarose e podem ser visualizados em transiluminador depois de corados com brometo de etídio (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1998; ZARZOSO et al. 1999; ROMERO et al. 2004).

## 1.6 Enzimas industriais

Estudos focados no perfil enzimático de leveduras isoladas de amostras do ambiente, como o solo, ou diretamente de folhas, caule e ou frutos têm demonstrado que leveduras isoladas de diversos ambientes tropicais representam uma fonte de várias enzimas com potencial para uso industrial (FUENTEFRIA; VALENTE, 2004).

A descoberta de novas leveduras com potencial biotecnológico, a sua caracterização, assim como a correta classificação são imprescindíveis para que a diversidade de microrganismos seja bem utilizada, na descoberta de novos métodos industriais não poluentes, ou como emprego na biorremediação, na produção de novos fármacos, ou ainda uso na indústria alimentícia. Por serem frequentes espécies não patogênicas e geralmente apresentar alta versatilidade metabólica e fácil manipulação genética, as leveduras estão sendo observadas também pela produção de substâncias bioativas, incluindo as enzimas. Entre as enzimas mais descritas estão as proteases, celulasas, lipases, celobiasas, xilanases, esterases, glicosidases (LANDELL; VALENTE, 2009; BRIZZIO et al., 2007).

As enzimas são classificadas e codificadas pelo *Nomenclatures Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) de acordo com suas propriedades catalíticas. Estão divididas em seis grupos (classes): 1- Oxirredutases atuam em reações de oxi-redução, por meio de transferência de elétrons; 2- Transferases catalisam reações de transferência de grupos funcionais como os grupos amina, fosfato, acil, carboxil; 3- Hidrolases catalisam reações de hidrólise de ligação covalente; 4- Liases atuam na adição de grupos a ligações duplas ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos; 5- Isomerases catalisam reações de isomerização por meio da transferência de grupos dentro da molécula, ou seja, reação de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos; 6- Ligases catalisam reações de síntese de novas moléculas através da formação de ligações C-C, C-S, C-O, e C-N por meio de reações de condensação acopladas a clivagem em que dois grupos químicos são unidos utilizando energia fornecida pelo ATP. A nomenclatura definida para as enzimas é composta pela abreviatura, em inglês, do nome da Comissão para Enzimas (EC) da NC-IUBMB, seguida por até quatro dígitos referentes à classe e subclasses a que pertence à enzima e um nome sistemático que identifica a reação que catalisa, como exemplo a ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) (HELD et al., 2000).

### 1.6.1 Amilases

O amido é um polissacarídeo composto de dois componentes de alto peso molecular: a amilose e a amilopectina, que variam, conforme a fonte botânica do amido. É um polímero que constitui uma das mais importantes fontes de energia para os organismos vivos. Na indústria de alimentos é empregado como espessante, aglutinante, estabilizante, emulsificante, geleificante e como ligante, além de constituir em fonte primária de xaropes de glicose, que são usados como base para produtos da indústria farmacêutica e de confeitaria (PRAKASHAM et al., 2007).

As amilases são carboidrases com função de hidrolisar as ligações glicosídicas, agindo sobre as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 que estão presentes no amido. São divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise de maneira randômica no interior da molécula de amido, gerando oligossacarídeos de variados tamanhos. As exoamilases hidrolisam a partir da extremidade da cadeia, resultando em produtos finais sucessivamente menores. A hidrólise completa do amido requer a ação combinada de um conjunto de enzimas, isto é,  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases e glicoamilases. Estas últimas estão entre as mais importantes enzimas utilizadas nos processos biotecnológicos atuais, devido à crescente importância do amido e açúcares, entre outros derivados, na era da moderna biotecnologia (GUPTA et al., 2003).

Além das endo e exoamilases mais dois grupos de amilases foram relatadas, as amilases desramificadoras e as transferases. As enzimas desramificadoras consistem em um terceiro grupo de enzimas conversoras do amido. Essas enzimas atuam diferentemente na pululana, um polímero de polissacarídeo constituído por unidades de maltotriose. São enzimas que hidrolisam somente ligações  $\alpha$ -1,6 sendo que as isoamilases (E.C. 3.2.1.68) hidrolisam apenas amilopectina resultando em polissacarídeos lineares de cadeia longa, e as pululanases tipo I (E.C. 3.2.1.41) hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 em pululana e amilopectina. Um grupo de especial de pululanases são as denominadas pululanases do tipo II, que hidrolisam ligações tanto do tipo  $\alpha$ -1,4 quanto  $\alpha$ -1,6 e são denominadas  $\alpha$ -amilase-pululanase ou amilopululanase sendo os produtos de hidrólise a maltose e a maltotriose (MORAES et al., 2004)

Dessa forma, essas são as formas diferenciadas de hidrolisar a pululana. Transferases constituem um quarto grupo de enzimas conversoras ou modificadoras

de amido. As transferases quebram ligações glicosídicas  $\alpha$ -1, 4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase (EC 2.4.1.25) e ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) formam uma nova ligação  $\alpha$ -1, 4 e ao mesmo tempo liga a extremidade redutora à não redutora (FUENTEFRIA; VALENTE, 2004).

Amilases apresentam grande importância biotecnológica tais como aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, processamento de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica. Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (MORAES et al., 2004; TACHIBANA et al., 1999; FUENTEFRIA; VALENTE, 2004).

As amilases utilizadas na indústria têxtil, na qual a baixa resistência dos fios de tecidos é minimizada com a aplicação de goma de amido que é posteriormente eliminada. Para que o tecido não seja prejudicado durante esse processo utiliza-se uma amilase de origem bacteriana, capaz de atuar em altas temperaturas (110°C). Além disso, na indústria alimentícia, a aplicação das amilases ocorre para reduzir a turbidez produzida pelos amidos, e reduzir a viscosidade dos sucos de frutas, transformam o amido de cacau em dextrinas reduzindo assim sua viscosidade e melhorando os xaropes de chocolate, e também atuam na melhoria da textura da massa de panificação, acelerando a fermentação realizada pelas leveduras do fermento (OLIVEIRA et al., 2010).

### 1.6.2 Celulases

As plantas têm como principal componente estrutural a celulose. Trata-se de um homopolímero linear composto de unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas ( $\beta$ -1,4), encontrado na natureza em associação com outros polissacarídeos e lignina. Pode variar em diversos graus de cristalinidade, (40-90%), dependendo da origem botânica, sendo o restante constituído da fração amorfa. A celulose é o substrato orgânico mais abundante na natureza para produção de glicose. A conversão da celulose a glicose decorre pelo processo de sacarificação gradual de polímero pela ação das celulases (PRETORIUS, 2003).

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Importante função na produção de Biocombustíveis de 2ª geração, e aplicações na indústria têxtil como o amaciamento e efeitos sobre o jeans. Estas enzimas são biocatalisadoras altamente específicas que atuam em sinergia para a liberação de açúcares. As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas, sendo classificadas pela Enzyme Commission (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada. As celulases são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, sendo divididas em três grandes grupos, as endonucleases, que clivam ligações internas da fibra celulósica, as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose, e a  $\beta$ -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO et al., 2010).

Endoglucanase (EC 3.2.1.4) é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, de forma randômica, ela hidrolisa as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. As exoglucanases são divididas em glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74), que é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero, e celobio-hidrolase (3.2.1.91), que participa da hidrólise primária da fibra, realizando o fenômeno de ruptura física do substrato, deixando as regiões cristalinas exposta às celulases, e liberando o dissacarídeo celobiose, principal produto da degradação da celulose. Celobiose são duas unidades de glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4. A degradação da celobiose pela celobiase ( $\beta$ -glicosidase) resulta na formação de glicose, sendo uma das etapas da transformação da celulose em um açúcar fermentável, com inúmeras aplicações industriais (FUENTEFRÍA, 2004).

As enzimas do complexo celulolítico atuam com maior aproveitamento quando em conjunto, do que em ação isolada (CASTRO et al., 2010).

### 1.6.3 Hemiceluloses

As hemiceluloses são os polissacarídeos mais abundantes encontrados na natureza, ocorrendo nas paredes celulares das plantas, sendo constituídas por polímeros lineares ou ramificados, contendo de dois a seis diferentes açúcares ou seus derivados. Para uma completa e eficiente degradação das hemiceluloses há a

necessidade de um sistema de enzimas. Uma dessas enzimas é a xilanase, responsável pela degradação da xilana, principal hemicelulose das plantas. Na indústria, as xilanases são produzidas principalmente por fungos filamentosos, e são aplicadas na indústria de papel e celulose, auxiliando no branqueamento da polpa facilitando a remoção da lignina. Quando associadas com celulasas, essas enzimas podem ser utilizadas para aprimorar o processo de extração de óleos vegetais, na clarificação de sucos de frutas e vinhos, na fabricação de café solúvel, no melhoramento da reidratação de vegetais secos e de textura dos derivados lácteos (KULKARNI et al.,1999).

#### 1.6.4 Invertases

A invertase ( $\beta$ -fructofuranosídeofrutohidrolase, EC.3.2.1.26) é uma enzima que hidrolisa a sacarose, originando uma mistura, em quantidades iguais de glicose e frutose. A mistura de monossacarídeos recebe o nome de açúcar invertido, por apresentar a propriedade de desviar o plano de luz polarizada no sentido anti-horário (levogiro), em contraposição à solução aquosa de sacarose de partida para a ação da invertase, que desvia a luz plano polarizada no sentido horário (dextrogiro). A invertase pode ser considerada a primeira das carboidrases a ser estudada. Sua atividade foi detectada, pela primeira vez, em 1828, quando se observou que a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso (NOVAKI, 2010).

Em processos industriais a invertase ou  $\beta$ -frutofuranosidase é usada para obtenção do xarope de açúcar invertido. O açúcar invertido (xarope de glicose e frutose) é amplamente utilizado na indústria de confeitos, na panificação e produtos afins, na formulação de cremes para recheio e de geleias. O uso da invertase está principalmente relacionado à indústria alimentícia, tanto na fabricação do xarope de glicose e frutose (açúcar invertido) quanto com a formação dos frutooligossacarídeos (SAID, 2004). Os frutooligossacarídeos (FOS) são açúcares não convencionais, não metabolizados pelo organismo humano e não calóricos. São considerados prebióticos uma vez que promovem seletivamente o crescimento de probióticos como *Acidophilus* e *Bifidus*. Essa característica faz com que os FOS promovam uma série de benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol sérico até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer (PASSOS; YORK, 2003). A invertase hidrolisa a ligação glicosídica (tipo  $\alpha\beta$ ) de carboidratos possuidores de um radical  $\beta$ -

fructofuranosil não substituído, sendo a sacarose seu substrato preferencial (PARAZZI JUNIOR, 2006).

#### 1.6.5 Pectinases

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pecticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Algumas das aplicações destas enzimas nas indústrias de alimentos incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento proteico de alimentos infantis e extração de óleos. A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pecticas em: protopectina, ácido pectínico, ácido pectico e pectina, sendo estes três últimos totais ou parcialmente solúveis em água. Possuem estrutura de ligações axiais de unidades de ácido  $\alpha$ -1, 4-D-galacturônico e contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como correntes laterais (GARGEL et al., 2011).

A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de microrganismos, mas os fungos filamentosos são os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (BLANDINO et al., 2001). A produção de pectinases por microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular, pela composição do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH e temperatura do cultivo, além de outros fatores (CORDEIRO; MARTINS, 2009).

Existem basicamente três tipos de pectinases, pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pecticas e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (GARGEL et al., 2011; SAKAI et al., 1993).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e avaliar a produção de enzimas de leveduras isoladas em frutos de Guavira (*Campomanesia adamantium*), Ingá (*Inga edulis*) e Pinha (*Annona squamosa*).

### 2.2 Objetivos específicos

Isolar leveduras a partir de frutos colhidos na região de Cerrado;  
Realizar identificação morfológica e molecular das linhagens isoladas;  
Selecionar as linhagens promissoras para a produção das enzimas CMCase, pectinase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase, amilase e invertase.

O artigo a seguir foi elaborado segundo as normas da Revista **Applied Biochemistry and Biotechnology**.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a conclusão da Dissertação, podemos adquirir uma infinidade de conhecimentos sobre identificação molecular, processos fermentativos e determinação de enzimas de leveduras. As leituras para compreensão dos fundamentos da Biologia molecular, e da fermentação permitiram estabelecer a importância do isolamento e caracterização de leveduras, constituindo a relevante área da pesquisa, a bioprospecção, inserida no campo do conhecimento da Biotecnologia.

Em relação aos resultados encontrados, todas as linhagens isoladas foram identificadas em gênero por meio da técnica de PCR-RFLP, e confirmadas pela técnica de sequenciamento, que através da comparação com depósitos em bancos de dados foi capaz de identificar todas as espécies.

Das nove leveduras isoladas, 44,44% (4) foram identificadas por PCR-RFLP como pertencente ao gênero *Candida*, e pelo sequenciamento como *Candida citri* e *Candida hainanensis*, 44,44% (4) dos isolados foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pichia*, e sequenciados como *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii*, *Pichia kudriavzevii* e *Meyerozyma (Pichia) caribbica*, os 11,11% (1) restante foram identificadas como pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, porém o processo de identificação por sequenciamento está em execução.

Quanto a produção de enzimas, as metodologias utilizadas apresentaram boa reprodução, com a detecção de duas linhagens com produção promissora de enzimas.

Será dada continuidade a esta pesquisa, finalizando-a com a identificação das linhagens que ainda não foram sequenciadas.

Como perspectivas para futuros estudos com estas linhagens, poderíamos citar a otimização do processo de cultivo para a produção das enzimas, a caracterização das enzimas produzidas, e ainda a purificação para aplicação industrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, E. S. **Diversidade genética de gabirobeiras (*Campomanesia* spp.) por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares RAPD.** 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2011.

ÁVIDOS, M. F. D; FERREIRA, L. T. Frutos do Cerrado – preservação gera muito mais frutos. **Biociência**, n.30, v.3 p.36-41, 2003.

BARNETT, J. A. **Yeasts, Characteristics and Identification**, 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2000.

BORÉM, A. A história da Biotecnologia. **Biociência**, n. 34, v. 1. p. 23-29, 2005.

BRIZZIO, S. et al. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeast isolated from glacial and subglacial Waters of northwest Patagonia (Argentina). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p.519-525. 2007.

CAMPOS, R. P. HIANE, P. A. RAMOS, M. I. L. RAMOS FILHO, M. M. MACEDO, M. L. R. Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal. p. 41-49. 2012.

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**. Viçosa, v.38, n. 2. p. 292-298. 2009.

CARAMORI, S. S; SOUZA, A. A; FERNANDES, K. F. Caracterização bioquímica de frutos de *Inga alba* (Sw.) Willd. e *Inga cylindrica* Mart. (Fabaceae). **Health and Environment Journal**, v. 9, n. 2, p. 16-22. dez. 2008.

CASTRO, A. M; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova** [online]. v.33, n.1, p. 181-188. 2010.

CORDEIRO, C. A. M; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 29, n. 1, p. 135-141, 2009.

CÔRREA, G. C; NAVES, R. V; ROCHA, M. R; CHAVES, L. J; BORGES, J. D. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**. v.24, n.4, p.42-47, 2008.

COUTO, F. M. M; NEVES, R. P; PORTO, A. L. F. **Leveduras produtoras de b-glicosidase e pectinase**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Biologia de fungos) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

CRUZ, T.M.L.; COUTO F.M.M.; FRANÇA, G.S.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P. **Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro**. 2009. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Recife. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009.

ESTEVE-ZARZOSO, B. BELLOCH, C. URUBURU, F. QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematics Bacteriology**. v. 49, p. 329-337, 1999.

FARIAS, M. V. VITAL, M. J. S. **Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil.** 2008. 116f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais). Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, 2008.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas.** 3 ed. EMBRAPA, CENARGEN. Brasília. 220p. 1998.

FERNANDES, M. L. P; SILVA, E. M. Prospecção de bactérias e leveduras lipolíticas do estado do Tocantins promissoras em aplicações industriais. In: 9º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. **Resumos.** Universidade Federal de Tocantins. Palma. 2013.

FOKKEMA, N. J. The phyllosphere as an ecologically neglected milieu: a plant pathologist's point of view. *In* Microbial Ecology of Leaves, ANDREWS, J. H; HIRANO, S. S. (Eds.), **Springer-Verlag**, New York. p.3-18, 1991.

FUENTEFRIA, A. M. VALENTE, P. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *hibiscus rosa-sinensis*.** 2004. 131f. Dissertação (mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

GAVIRIA, J. V; OSÓRIO, E. C. Diversidad de levaduras asociadas a inflorescencias de mango y flores de "lulo arbóreo". **Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial.** v. 10, n. 2, p. 160-169, 2012.

GARGEL, C. A. SILVA, R. BAFFI, M. A. **Rastreamento de leveduras autóctonas para a produção de pectinase, tanase e invertase.** 2011, 54f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, UNESP. São José do Rio Preto, 2011.

GUPTA, R. GIGRAS, P. MOHAPATRA, H. Goswami, V. K. Chauhan, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. v. 38. n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HELD, M; SCHMID, A; VAN BEILEN, J. B; WITHOLT, B. Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals. **Pure and Applied Chemistry**. Research triangle Park. v. 72, n. 7, p. 1337-1343, 2000.

HAGLER, A. N; ROSA, C. A; MORAIS, P. B; MENDONÇA-HAGLER, L. C; Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 39, n.10 p. 973-977. 1993.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (Eds). **The yeasts: a taxonomic study. Fourth Revised and Enlarged Edition**. Elsevier, Amsterdam. 1998.

KULKARNI, N. SHENDYE, A. RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Federation of European Microbiological Societies – FEMS Microbiology Reviews**. v. 23,n. 4, p. 411-456, 1999.

LANDELL, M. F. **Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no parque de itapuã-viamão/RS**. 2009. 187f. Tese (Doutorado em microbiologia agrícola e do ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2009.

LORENZI H; BACHER L; LACERDA M; SARTORI S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Plantarum, p. 640, 2006.

MAMBUSCAY, M. L. A; LÓPEZ, A. W. A; CUERVO, M. R. A; ARGOTE, V. F. E; CADAVID, E. O. Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**. Ed. Especial. n. 2, p. 136-144,. 2013.

MARIN, R.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; ZUANAZZI, J.Â.S.; HENRIQUES, A. T. Volatile Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 2, p.172-177, 2008.

MARQUES-MARÇAL, V. V. M. **Isolamento e caracterização morfogenética de leveduras com fenótipo killer e seu potencial no antagonismo de fitopatógenos**. 2005. 99f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2005.

MAUTONE, J. N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do parque de Itapuã, RS, Brasil**. 2008. 124f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: Vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria Nacional de Biodiversidade e Florestas, 534p. 2011.

MOURA, N. F. et al. Variabilidade entre procedências e progênies de Pequizero (*Caryocar brasiliense* Camb.) **Revista Scientia Forestalis**, v. 41, n. 97, p.103-112, 2013.

MONTEIRO, V. N; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**. Artigo Convidado. v. 3, n. 5, p. 9-23, Goiás, 2009.

MORAES, L.M.P. Amilases. *In*: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 230-265, 2004.

MYERS, N; MITTERMEIER, R.A; MITTERMEIER, C.G; FONSECA, G.A.B; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.



NOVAKI, L. HASAN, S. D. M. KADOWAKI, M. K. ANDRADE, D. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **Engevista**. v.12, n. 2, p.131-140, 2010.

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**. v. 40, n. 2, p. 401-404, 2010.

OLIVEIRA, R. Q; ASSIS, S. A; ROSA, C. A; UETANABARO, A. P. T. **Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do Semi-árido baiano**. 2007. 123f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2008.

OLIVEIRA, A. P. A; SILVESTRE, M. A; GARCIA, N. F. L; VIEIRA, M. V; PAZ, M. F; FONSECA, G. G; LEITE, R. S. R. Seleção de leveduras isoladas de frutos do cerrado sul-mato-grossense para a produção de enzimas de interesse industrial. In: XXI CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA (XXI ALAM). 2012. **Resumos**. Santos/SP.

OLIVEIRA, K. B. OLIVEIRA, B. H; Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista eletrônica de farmácia**. Curitiba, v. IX, n. 1, p. 89-99, 2012.

PARAZZI JUNIOR, O. GALLO, G. R. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase**. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. Piracicaba. 2006.

PASSOS, L. M. L. PARK, Y. K; Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PEIXOTO, A. B. **Estudo da produção de enzimas e gomas de leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil**. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil, pp. 123- 180 in SER, H; HARRISON, J. S. (Eds): **The Biology of Yeasts**, Vol. 1. Academic Press, London, 1987.

PHAFF, H.J. Specific habitats of yeasts and their isolation. **The United States Federation for Culture Collections Newsletter**, v.18, n.4, p.11-12, 1990.

PHAFF, H. J.; STARMER W.T. Specificity of natural habitats for yeasts and yeast-like organisms. In: SKINNER, F.A.; PASSMORE, S. M.; DAVENPORT, R. R. (Eds.). **Biology and Activities of Yeasts**. London: Academic Press, 1980. 310 p.

PIETROWSKI, G. A. M; WOSIACKI, G. NOGUEIRA, N. **Isolamento, seleção, identificação e aplicação de leveduras não-convencionais com potencial para a produção de aromas em fermentado de maçã**. 2011. 200f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2011.

PRADA, G. M. M.; PAGNOCCA, F. C. Ascomycetous yeasts associated with naturally occurring fruits in a tropical rain forest. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 1, p. 39-46, 1997.

PRAKASHAM, R. S. RAO, C. S. RAO R. S. SARMA, P. N. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 102, n. 1, p. 204-211, 2007.

PRETORIUS, I.S.; DU TOIT, M; VAN RENSBURG, P. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technology Biotechnology**. v. 41, n. 1, p.3-10, 2003.

REZENDE, M Q. PEREZ, A L. JANSSEN, A. VENZON, M. **Uso do ingá (*Inga subnuda*) em cafeeiros sob sistemas agroflorestais pode diminuir os danos causados pelas principais pragas do café.** Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza, 2011.

RODRIGUES, E. T. GINANI, V. **A influência dos frutos do Cerrado na diversificação da gastronomia.** 2004. 92f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Nacional De Brasília. Brasília, 2004.

ROMERO, P. PATIÑO, B. QUIRÓS, M. GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. VALDERRAMA, M. J. SILÓNIZ, M. I. PEINADO, J. M. Differential detection of *Debaryomyces hansenii* isolated from intermediate-moisture foods by PCR-RFLP of the IGS region of rDNA. **Federation of European Microbiological Societies – FEMS Yeast Research.** v. 5, n. 4, p. 455-461, 2005.

SANTOS, M. S.; PETKOWICZ, C. L. O.; HAMINIUK, C. W. I.; CÂNDIDO, L. M. B. Polissacarídeos Extraídos da Gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): Propriedades Químicas e Perfil Reológico. **Artigos Técnico Científico.** Curitiba, v.20, n.especial, p.352-358, 2010.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 500p., 2004.

SANTOS, R. S.; SEVERO, J.; HAAS, L. I. R.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. **Otimização do método de RT-PCR para frutos de guabiroba.** In: Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, s.n., 2008.

SANTOS, T. T; **Identificação e análise do potencial enzimático de leveduras isoladas do afloramento rochoso do morro da pioneira – Bahia.** 2012, 54f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biologia) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das almas, 2012.

SILVA, M. S. REZENDE, R. P; UETANABARO, A. P, T. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau.** 2011, 83f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2011.

SILVA, M. H. R; GUERRA, O. G; BLINI, R. C. B. Isolamento de linhagens de levedura de folhas de espécies arbóreas da biodiversidade do cerrado produtoras de amilases. **Colloquium Vitae**. v.. 5, n. Especial, p. 09-15, Presidente Prudente, 2013.

SOBRINHO, R. B. **Potencial de exploração de Annonaceas no nordeste do Brasil**. 17ª semana internacional da fruticultura, floricultura e agroindústria. Fortaleza, 2010.

SUGITA, T. NISHIKAWA, A. Fungal identification method based on DNA sequence analysis: Rassessment of the method of the Pharmaceutical Society of Japan and the Japanese Pharmacopeia. **Journal of Health Science**. v. 49, n. 6, p. 531-536, 2003.

TACHIBANA, Y.; et al. Purification and Characterization of an Extremely Thermostable Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from a Newly isolated *Hyperthermophilic Archaeon*, a *Thermococcus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 5, p. 1991-1997, 1999.

TAO, X; ZHENG D; LIU, T; WANG, P; ZHAO, W; ZHU, M; JIANG, X; ZHAO, Y; WU, X. A Novel Strategy to Construct Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Very High Gravity Fermentation. **Plos One**. v. 7, n. 2. 2012.

# ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE FRUTOS DO CERRADO

## ISOLATION AND SELECTION OF YEASTS FOR INTEREST ENZYME INDUSTRIAL PRODUCTION FROM FRUITS OF CERRADO

Miguel Augusto Machado de Araújo

<sup>1</sup>Mestrando em Biotecnologia pela UCDB – Universidade Católica Dom Bosco;

Contato: miguel\_biomed@yahoo.com.br

### RESUMO

O cerrado destaca-se por sua biodiversidade, que inclui diversos microrganismos, entre estes há relatos de leveduras, as quais são produtoras de enzimas de interesse para a aplicação industrial, e portanto merecem ser prospectadas, o que tem sido realizando principalmente entre fungos filamentosos e bactérias. Este trabalho apresenta os resultados da bioprospecção e avaliação de nove leveduras isoladas dos frutos do colhidos no Cerrado, Ingá (*Inga edulis*), Pinha (*Annona squamosa*) e Guavira (*Campomanesia adamantium*). Após caracterização morfológica das colônias e células, foi aplicada a técnica PCR, RFLP/PCR com digestão pela enzima *Hinf* I, e sequenciamento das regiões ITS1-5.8rDNA-ITS2. As espécies identificadas foram *Candida citri*, *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii*, *W. (Pichia) kudriavzevii*, *Meyerozyma (Pichia) caribbica* e *Saccharomyces* sp. A prospecção das enzimas foi realizada com cultivo por 72h/28°C em meio líquido contendo fontes de carbono para favorecer a produção de  $\beta$ -glicosidases, amilases, pectinases, invertases, xilanases e CMCase. Nas condições em que o experimento foi realizado, apenas as enzimas invertase,  $\beta$ -glicosidase e pectinase puderam ser consideradas com potencialidade para continuidade da pesquisa. O isolado *Meyerozyma (Pichia) caribbica* produziu invertase ao redor de 16,00 U/mL. Quanto a pectinase, a segunda enzima mais

produzida, com cerca de 3,0 U/mL pela cepa *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii*. E a cepa *Meyerozyma (Pichia) caribbica* produziu cerca de 2,0 U/mL de  $\beta$ -glicosidase. As demais enzimas produziram quantidades inferiores a 1,0 U/mL, mas os resultados podem ser considerados animadores, uma vez que há poucos relatos de avaliação de enzimas de aplicação comercial por leveduras.

**Palavras-chave:** Invertase, Pectinase, Celulase, Amilase,  $\beta$ -glicosidase.

### ABSTRACT

The cerrado is notable for its biodiversity, including many microorganisms, among these there are reports of yeasts, which are producing enzymes of interest for industrial applications, and therefore deserve to be prospected, which has been performing mainly among filamentous fungi and bacteria. In the Midwest region a group of researchers stands for initiating and maintaining a collection of yeasts isolated from local material. This paper presents the results of bioprospecting and evaluation nine yeasts harvested the fruits of the Cerrado, Inga (*Inga edulis*), Pine Cone (*Annona squamosa*) and Guavira (*Campomanesia adamantium*). After morphological characterization of colonies and cells, was applied to PCR, RFLP/PCR digestion with *Hinf* I enzyme, and sequencing of ITS1-5.8rDNA-ITS2 regions. The identified species were *Candida citri*, *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii*, *W. (Pichia) kudriavzevii*, *Meyerozyma (Pichia) caribbica* and *Saccharomyces* sp. The prospect of enzyme was performed with cultured for 72h/28°C in a liquid medium free of carbon sources, plus substrates for stimulating the production of  $\beta$ -glucosidases, amylases, pectinases, invertase, xylanases and CMCases. In the conditions of this experiment, only the enzymes invertase,  $\beta$ -glucosidase and pectinase could be considered with potential for further research. The isolated *Meyerozyma (Pichia) caribbica* produced invertase around 16.00 U/mL. Pectinase emphasis was given as the second most enzyme produced with about 3.0 U/ml for strain *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii*. And the strain *Meyerozyma (Pichia) caribbica* produced about 2.0 U/mL  $\beta$ -glucosidase. The other enzymes produced very small amounts, but the results can be considered encouraging, since there are few reports of enzymes evaluation yeast commercial application.

**Keywords:** Invertase, Pectinase, cellulase, amylase, Enzyme Activity.

## INTRODUÇÃO

As enzimas estão entre os bioprodutos mais importantes e são utilizadas em grande quantidade de processos nas áreas industrial, médica, têxtil, papel e celulose, biotecnologia ambiental e alimentar. O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial pela fácil obtenção através de procedimentos biotecnológicos, e as vantagens em relação aos catalisadores químicos, com maior especificidade, menor consumo energético e processos mais limpos. As principais enzimas de aplicação industrial são as amilases, pectinases, celulasas, xilanases (Haq et al. 2006).

Regularmente, as fontes mais conhecidas de enzimas naturais para aplicação nos processos industriais são os tecidos animais e vegetais, seguidos pelos microrganismos, usados para a estabilização de cervejas, sucos e vinhos, entre outras aplicações. Dentre os microrganismos mais utilizados em processos comerciais de produção de enzimas estão os fungos filamentosos, as bactérias e as leveduras (Farias e Vital 2008; Landell e Valente 2006).

As espécies frutíferas do Cerrado, apresentam elevados teores de açúcares, vitaminas, proteínas e sais minerais, sendo utilizadas como matéria prima para produção de doces, geleias, sorvetes, licores ou consumo *in natura*. O interesse industrial pelas frutas do Cerrado foi intensificado após os anos 40, por causa da maior procura por leveduras como agentes de processos fermentativos, como a indústria farmacêutica, que passou a integrar os processos em escala industrial (Klink e Machado, 2005). A crescente produção de resíduos durante o processamento de frutas tem despertado o interesse na sua utilização em bioprocessos para obtenção de subprodutos com alta aplicabilidade industrial (Silva et al. 2013).

As leveduras são utilizadas na indústria em processos de fermentação alcoólica, mas tem sido pouco investigada para produção de enzimas, embora apresentem como vantagem em relação aos fungos filamentosos e bactérias, o fato da maioria das espécies não apresentar características patogênicas, além de as leveduras apresentarem tamanho maior que as bactérias (que são grande produtoras de enzimas – entretanto de difícil purificação) permitindo melhor desempenho nos processos industriais (Landell, 2006).

As leveduras são fungos unicelulares, geralmente redondos ou ovais, com grande capacidade de reprodução, por esporos e ou brotamento, gerando novas

células de forma mais rápida do que a maioria dos outros fungos. Possui grande capacidade de produzir enzimas, e assim assimilar diversas fontes de carbono, como glicose, manose, celobiose, ribose, xilose e fontes de nitrogênio, tais como nitrato de potássio, lisina, e alguns aminoácidos. Em função desta habilidade, as leveduras têm despertado interesse na produção de enzimas de aplicação em escala industrial (Alves-Prado et al. 2010).

O Cerrado brasileiro compreende regiões de clima tropical e subtropical, caracterizado por extensas áreas com cobertura de árvores e arbustos e solo recoberto por gramíneas, sazonalidade de invernos secos e verões chuvosos. Apesar de sua importância biológica, o Cerrado brasileiro conta com poucos estudos sobre sua diversidade microbiana, haja vista a crescente demanda mundial de energia menos poluente e renovável (Pereira et al. 2012).

Os fungos filamentosos são usados na produção de enzimas em larga escala, vários deles capazes de produzir diversas enzimas simultaneamente. Porém, as leveduras têm se mostrado como uma alternativa para a produção de enzimas comerciais. Por ser unicelular, as leveduras apresentam algumas vantagens frente aos fungos filamentosos, como crescimento relativamente simples. Além disso, a clonagem de genes e manipulação genética pode aumentar a produção enzimática, apenas sugerindo, assim, que a produção comercial de enzima por leveduras seja possível (Ceccato-Antonini et al. 2004).

A abordagem clássica no isolamento de novas linhagens de microrganismos e enzimas continua sendo importante passo para o desenvolvimento de novos processos e produtos biotecnológicos. Portanto, em razão do potencial de encontrar leveduras com potencial atividade enzimática, objetivou-se bioprospectar nos frutos do Cerrado Guavira (*Campomanesia adamantium*), Pinha (*Annona squamosa*) e Ingá (*Inga edulis*) para o isolamento de leveduras e sua avaliação de produção das enzimas celulasas, amilases, xilanases, pectinases e invertases.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O isolamento e identificação taxonômica de leveduras foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande/MS, e Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN). O sequenciamento foi realizado no



laboratório de Biotecnologia Genômica da Universidade Católica de Brasília (UCB). A avaliação do potencial para produção enzimática foi realizada no laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER) da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA-UFGD).

Os isolados foram depositados no banco de leveduras do grupo Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL), composto por pesquisadores da Região Centro Oeste que dedicam-se a isolar leveduras desta região e a avaliar seu desempenho em fermentação alcoólica e produção enzimática.

### **OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Os frutos em estudo foram coletados diretamente das plantas, no período de outubro de 2013 a abril de 2014, época de forte frutificação das espécies. Foram selecionados somente frutos com maior grau de maturação, ou seja, aqueles que apresentaram visualmente e ao toque, derme delgada e polpa com alta suculência. A coleta ocorreu nas coordenadas 22°14'16" S e 54°48'02" W. Na região da Grande Dourados/MS. De acordo com (Pereira et al. 2012), a região apresenta área de relevo plano e suave ondulado, banhado pelo Córrego Capão Alto, o clima tem precipitações irregulares, variando de 1000 a 1500 mm/ano, com chuvas no verão e seca no inverno. Na região predomina a vegetação de Cerrado. Foram coletadas cerca de 500g de frutos maduros em partes diferentes de cada planta, para cada espécie, os quais não apresentavam sintoma biótico ou abiótico de doença.

### **ISOLAMENTO E ANÁLISE MORFOLÓGICA DE LEVEDURAS**

Os frutos foram lavados com água destilada e hipoclorito de sódio a 2%, macerados com água peptonada 0,8% e aliqotado proporcionalmente com 9mL de água/1g da amostra e o extrato colocado sob agitação durante 25 min em temperatura ambiente.

A seguir, as amostras foram diluídas ( $10^{-5}$ ) com água peptonada estéril, e então 100  $\mu$ L desta diluição foram transferidos para placas de Petri com meio YEPD (1% extrato de leveduras, 2% de peptona e 2% de glicose), e adicionado 25mg/mL de ampicilina para inibir o crescimento bacteriano ao meio. Com auxílio de alça de

Drigalski o extrato foi espalhado homoganeamente na superfície do meio. As semeaduras foram realizadas em triplicata, incubando a 28°C durante três dias. As colônias isoladas foram mantidas no mesmo meio de triagem (Gaviria e Osorio 2012).

A identificação fenotípica foi realizada após os três dias de semeadura, com base nas características macroscópicas, segundo Kurtzman et al. (1998). Os caracteres observados foram elevação, aspecto, cor, forma, tamanho, superfície e tipo de borda.

As características microscópicas foram observadas em microscópio óptico (1000X) e constaram de forma das células. Após a caracterização fenotípica, os isolados foram selecionados para posterior análise molecular.

### **EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO**

Para as extrações de DNA foram adotados os protocolos estabelecidos por Oliveira et al. (2013) a partir de quatro colônias de leveduras previamente incubadas em meio YEPD a 28°C por 48h. As colônias foram lavadas duas vezes com solução salina (PBS) pH 7,2/4°C e centrifugadas a 14000 × *g*/3 min, em seguida foram acrescentadas 300µL de PBS e utilizando 25µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubadas a 65°C/15 min. Em seguida foram acrescentados 500µL de Dodecil Sufato de Sódio a 10% e os tubos foram homogeneizados por inversão, incubados a 65°C/6 min. A seguir foram adicionados 800µL de clorofórmio e agitado em *vortex*. Em seguida foram adicionados 400µL da solução de precipitação proteica (3M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>, 2M CH<sub>3</sub>COOH) e homogeneizado novamente. Centrifugou-se por 14000 × *g*/10 min. O sobrenadante foi tratado com 1mL de etanol gelado, homogeneizado por inversão até a formação de um precipitado, que foi centrifugado a 14000 × *g*/5 min. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 1mL de etanol 70% ao sedimento formado. Foi realizada nova centrifugação do a 14000 × *g*/3 min e o sobrenadante descartado. O sedimento foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 50uL de tris-EDTA (10mM Tris HCl pH 7,4, 1mM EDTA pH 8.0) e estocado a -20°C. A qualidade e concentração dos DNAs extraídos foram avaliados em espectrofotômetro e eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador ultravioleta.

## PCR/RFLP (ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO)

A identificação molecular das leveduras foi realizada a partir do crescimento aeróbico em meio YEPD a 28°C de leveduras (Gaviria e Osorio 2012). O DNA genômico foi extraído e purificado a partir de 7 mL de cultura. A identificação dos isolados foi realizado através do PCR-RFLP de região ITS1-5.8S-ITS2, descrito por Zarzoso et al. (1999). Para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TATTGA TAT GC-3'). Os produtos de PCR foram digeridos com 1U de endonuclease *HinfI* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a 37°C por 2 horas.

Para a amplificação dos fragmentos referentes às regiões ITS e, foram utilizados 0,5µl (aproximadamente 100ng/µl) de DNA genômico, ressuspensos em 49,5µl da mistura de PCR: 0,5µM de oligonucleotídeos, 10µM dNTPs, 1X tampão da Taq, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, e 0,5U de Taq polimerase. As reações foram realizadas em um termociclador automático (M.J. Research, EUA) sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C/3 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min, anelamento a 52°C/45 min (ITS) e extensão a 72°C/1 min, com uma extensão final a 72°C/10 min. Os produtos de PCR e os fragmentos de restrição foram analisados em géis de agarose 1% em 1X tampão TBE (Tris-borato, EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador ultravioleta.

## SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1-5.8S-ITS2

Para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TATTGA TAT GC-3'). Ambas as cadeias de DNA foram gerados em um sequenciador automatizado ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA), e o alinhamento determinado manualmente por meio do software BioEdit v.7.2.5 (Hall 1999).

As sequências foram reunidas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank utilizando a ferramenta de busca de similaridade entre as sequências (Altschul et al. 1990; Begerow et al. 2010).

## **CULTIVO DAS LINHAGENS ISOLADAS PARA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS INÓCULO**

Todos os isolados de levedura foram cultivados em placas contendo meio YEPD Agar por 72h/28°C e em seguida três colônias foram inoculadas em meio YEPD líquido composto com fontes de carbono para a indução da produção de enzimas.

### **PRODUÇÃO DAS ENZIMAS PELAS LINHAGENS ISOLADAS**

A produção das enzimas foi determinada para as linhagens isoladas usando meio líquido YEPD, do qual a glicose (ou dextrose) foi removida, mantendo em sua formulação o extrato de levedura-1% m/v; peptona-2% m/v, pH 6,5. Os microrganismos foram cultivados em meio líquido adaptado ao YEP e concentração dos substratos adequados para induzir a produção de enzimas, cada qual com uma única fonte de carbono, carboximetilcelulose a 3% m/v (Sigma®), xilana a 0,5% m/v (Sigma®), amido comercial a 1% m/v (Maisena®), pectina a 1% m/v (Sigma®), celobiose a 1% m/v (Sigma®) e sacarose a 1% m/v (Sigma®).

Os meios foram incubados em agitador rotativo do tipo BOD (Marconi®) a 28°C e 150 ciclos min<sup>-1</sup> por 72 h. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 20mL de meio, cada qual com uma fonte de carbono. Todos os cultivos foram realizados em duplicata. Os frascos foram inoculados com 0,5mL de suspensão celular (10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup>), obtidos a partir da pré inoculação em meio YEPD a 28°C/72h.

Após o cultivo todo o conteúdo do meio foi centrifugado a 1000 × g/10min em centrífuga CETRIBIO modelo 80-2B. O sobrenadante isento de células foi transferido a outro tubo e então classificado como extrato enzimático extracelular (EEE) e o restante do material, contendo células do processo fermentativo foi lavado com 10mL de solução tampão de acetato de sódio (50mM pH 5,0). Este procedimento foi realizado duas vezes, a fim de eliminar o material sobrenadante, este extrato foi classificado como extrato enzimático intracelular (EEI).

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

**Atividade de  $\beta$ -glicosidase:** Seguiu-se a metodologia de Leite et al (2008). Para isso, os tubos receberam 50 $\mu$ L de extrato enzimático, 250 $\mu$ L de tampão acetato 100mM, pH 6,0 e 250 $\mu$ L de 4-nitrofenol  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4mM, Sigma®. Após reagir por 10min/60°C, a reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2000mM e a absorbância foi quantificada por espectrofotometria com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 410nm.

**Atividade das demais enzimas:** As demais enzimas foram avaliadas pela quantidade de açúcar redutor presente ao final da reação enzimática, quantificados com 3,5-ácido dinitrosalisílico ou DNS (Miller 1959). Descrito por Damiano et al. (2006), com a incubação de 0,1 mL de extrato enzimático, com 0,9 mL de suspensão contendo os substratos em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 6,0 a 50°C durante 10min. Os controles foram preparados com a adição do extrato enzimático após a adição do reagente 3,5-ácido dinitrosalisílico.

Para ambas as determinações das atividades enzimáticas, utilizou-se controles da reação colorimétrica para descontar as contribuições do extrato enzimático (branco da enzima), e do substrato (branco da reação).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade necessária de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol dos respectivos produtos de ação sobre os substratos em 1 minuto de reação.

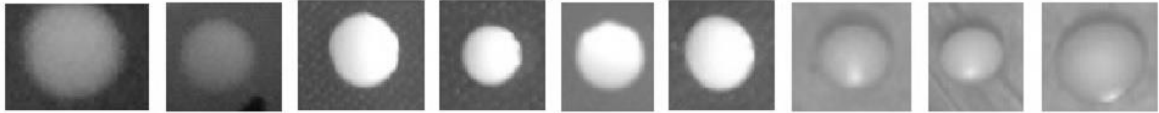
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ISOLAMENTO

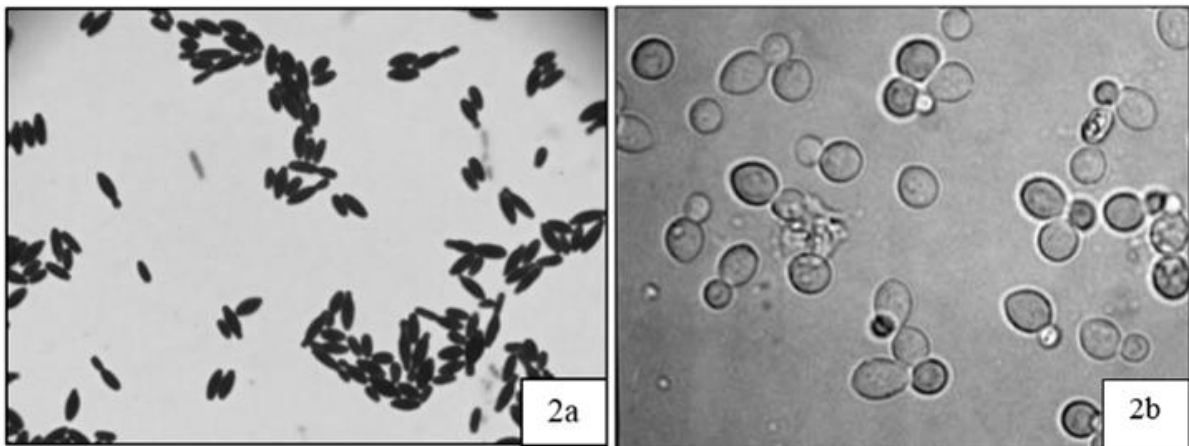
Foram obtidos nove isolados de leveduras a partir dos frutos Ingá (I1, I2), Pinha (P1, P2, P3, P4) e Guavira (Gual, Guall e Gualll).

A análise macroscópica das colônias e das células resultou que os nove isolados de leveduras em aspectos morfológicos semelhantes. Predominou a superfície lisa em toda a extensão das colônias, inclusive nas bordas. Todas apresentaram elevação do tipo convexo e crescimento satisfatório (Figura 1) no tempo de incubação de três dias. Entretanto foi notada diferença no formato das células. Nos

quatro isolados a partir do fruto da Pinha (P1, P2, P3, P4) as células apresentaram forma elipsoide (Figura 2a), condizente com o gênero *Pichia*, conforme Lima et al. (2009), descrevem as células da espécie como arredondadas, elipsoides, alongadas e ocasionalmente cônicas. Para os demais isolados a partir de frutos de Ingá (I1, I2), e Guavira (Gual, Guall e Gualll) as células se apresentaram globosas (Figura 2b).

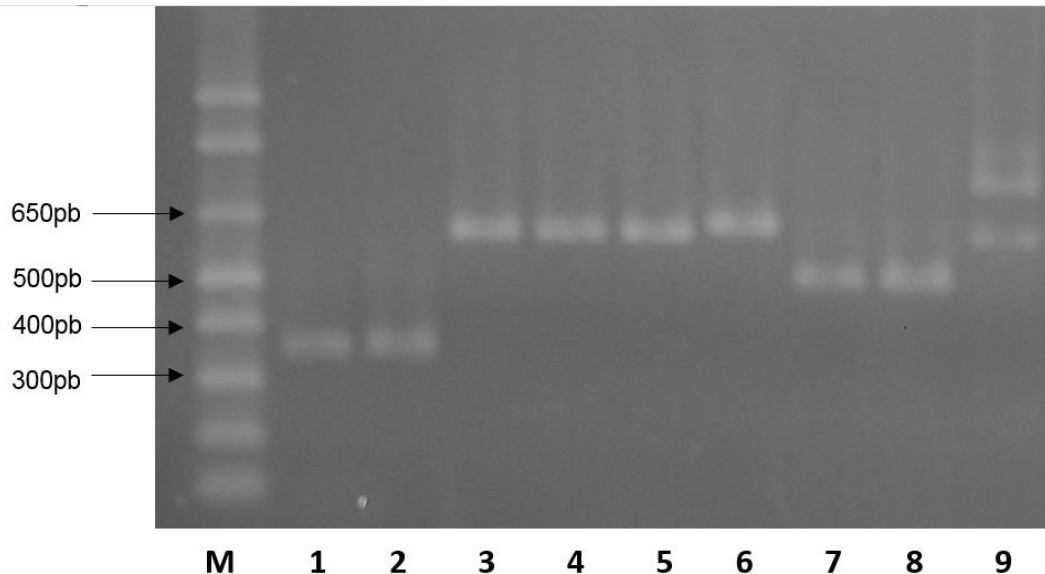


**Figura 1** – Morfologia colonial dos isolados (I1, I2, P1, P2, P3, P4, Gual, Guall e Gualll).



**Figura 2a e 2b** – Morfologia celular dos isolados. Legenda: 2a: Células alongadas coradas pelo método de GRAM, presença de brotamento em algumas células. 2b: Células arredondadas coradas pelo método do azul de metileno (Aumento de 1000x).

A concentração do DNA obtido a partir da extração foi, em todas as amostras, superior a  $1000\text{ng}/\mu\text{l} \pm 10,0$  e pureza de  $1,92 \pm 0,07$  na relação de comprimento de onda de  $A_{260}/A_{280}$ , indicando uma amostra com alto grau de pureza e boa qualidade. Após a extração de DNA, foram obtidos a partir da técnica de PCR convencional, fragmentos com diferentes tamanhos, indicando amplificação do DNA das leveduras isoladas, observando uma variação de 400pb a 700pb entre os isolados dos frutos (Figura 3).



**Figura 3**– Eletroforese de produtos de PCR – Agarose 1% corado com brometo de etídio (Sigma). Legenda: Coluna M: Marcador de pares de bases 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®), Colunas 1-2: I1, I2, Colunas 3-6: P1, P2, P3, P4, Colunas 7-9: Gual, Guall e Gualll. As setas indicam o tamanho de algumas bandas do marcador.

Os isolados P1, P2, P3 e P4 apresentaram fragmentos de aproximadamente 620pb, correspondendo ao gênero *Pichia*. Os isolados I1, I2 apresentaram fragmentos de aproximadamente 380pb, inferindo que estas leveduras pertencem ao gênero *Candida*. E dos isolados Gual, Guall, foram amplificados fragmentos de aproximadamente 500pb, indicando também o gênero *Candida*, e a amostra Gualll, apresentou dois fragmentos de amplificados de, aproximadamente, 600pb e, 680pb, o que corresponde ao gênero *Saccharomyces*.

A análise dos fragmentos digeridos pela enzima *Hinf I* referentes à região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) resultou em 44,44% (4) para o gênero *Candida*, 11,11% (1) para o gênero *Saccharomyces*, e 44,44% (4) para o gênero *Pichia* (Tabela 1).

**Tabela 1: Produtos de PCR e fragmentos de restrição pela *Hinf I* para os 9 isolados de leveduras obtidos de frutos do Cerrado.**

| Linhagem | Gênero               | PCR-ITS | <i>Hinf I</i> |
|----------|----------------------|---------|---------------|
| I1       | <i>Candida</i>       | 380     | 200 + 180     |
| I2       | <i>Candida</i>       | 380     | 200 + 180     |
| P1       | <i>Pichia</i>        | 620     | 320 + 300     |
| P2       | <i>Pichia</i>        | 620     | 320 + 300     |
| P3       | <i>Pichia</i>        | 620     | 320 + 300     |
| P4       | <i>Pichia</i>        | 620     | 320 + 300     |
| Gual     | <i>Candida</i>       | 500     | 375 + 125     |
| Guall    | <i>Candida</i>       | 500     | 375 + 125     |
| Gualll   | <i>Saccharomyces</i> | 650     | 370+370+125   |

De acordo com Las Heras-Vazquez et al. (2003), duas técnicas moleculares para identificação podem ser usadas com grande eficiência, pois ao comparar as técnicas convencionais de identificação, os resultados são muito semelhantes, mas a concordância total só ocorre através das técnicas moleculares, pois somente dessa forma a classificação em nível taxonômico de espécie é possível.

Após a realização do sequenciamento da região ITS1-5,8S rDNA-ITS2, as sequências contíguas foram comparadas com sequências depositadas nos bancos de dados BLAST (Basic Local Alignment Search Tool- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar a porcentagem máxima de identidade, as quais variaram entre 81 e 99% (Tabela 2).

**Tabela 2: Caracterização molecular dos isolados de frutas do Cerrado**

| Linhagem                              | Espécie                                  | Identidade Máxima (%) | Acesso     |
|---------------------------------------|--|-----------------------|------------|
| <b>Ingá (<i>I. edulis</i>)</b>        |  |                       |            |
| I1                                    | <i>Candida citri</i>                     | 96/103 (93)           | HM803243.1 |
| I2                                    | <i>Candida citri</i>                     | 96/103 (93)           | HM803243.1 |
| <b>Pinha (<i>A. squamosa</i>)</b>     |  |                       |            |
| P1                                    | <i>Meyerozyma (Pichia) caribbica</i>     | 579/580 (99)          | FN428931.1 |
| P2                                    | NR                                       | -                     | -          |
| P3                                    | <i>Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii</i> | 519/525 (99)          | JQ901931.1 |
| P4                                    | <i>Pichia kudriavzevii</i>               | 491/496 (99)          | JQ808004.1 |
| <b>Guavira (<i>C. adamantium</i>)</b> |  |                       |            |
| Gual                                  | NR                                       | -                     | -          |
| Guall                                 | <i>Candida hainanensis</i>               | 214/264 (81)          | EU284099.1 |
| Gualll                                | NR                                       | -                     | -          |

NR: Não realizado

As linhagens de leveduras obtidas a partir dos frutos do Ingá, apresentaram 93% de valor máximo de identidade para *Candida citri* de acordo com o banco de dados GenBank. E os isolados da Pinha mostraram valor de identidade de 100% para *Meyerozyma (Pichia) caribbica*, e 99% para *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii* e *Pichia kudriavzevii*, de acordo com Kurtzman e Robnett (1998), é considerado adequado para caracterizar um isolado em nível de espécie. A linhagem Guall isolada da Guavira apresentou valor máximo de identidade de 93% com *Candida hainanensis*.

Os três gêneros identificados são frequentemente isolados de frutos, vários estudos identificam a presença destes (Guimarães et al. 2005; Gaviria e Osorio 2012).



## POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS DAS LINHAGENS ISOLADAS

Os autores Alves-Prado et al. (2010) reconhecem a importância da avaliação de frutos do Cerrado brasileiro na prospecção de microrganismos e de sua produção de produtos metabólicos. Eles avaliaram fungos filamentosos e bactérias selecionados de frutas do Cerrado da região Centro Oeste para produção de enzimas celulolíticas.

**Tabela 3: Produção de  $\beta$ -glicosidases, CMCCase e Xilanase em meio líquido (28°C/72h)**

|               | Atividade enzimática em U/mL |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|               | $\beta$ -glicosidase         |                 | CMCase          |                 | Xilanase        |                 |
|               | Intra                        | Extra           | Intra           | Extra           | Intra           | Extra           |
| <b>I1</b>     | ND                           | ND              | 0,17 $\pm$ 0,01 | ND              | 0,37 $\pm$ 0,02 | 0,21 $\pm$ 0,01 |
| <b>I2</b>     | ND                           | ND              | ND              | 0,14 $\pm$ 0,01 | 0,11 $\pm$ 0,01 | 0,13 $\pm$ 0,01 |
| <b>P1</b>     | 1,84 $\pm$ 0,18              | 0,18 $\pm$ 0,01 | 0,44 $\pm$ 0,02 | 0,08 $\pm$ 0,00 | 0,10 $\pm$ 0,00 | ND              |
| <b>P2</b>     | 0,54 $\pm$ 0,00              | ND              | 0,42 $\pm$ 0,01 | ND              | 0,18 $\pm$ 0,00 | 0,46 $\pm$ 0,00 |
| <b>P3</b>     | 0,17 $\pm$ 0,02              | ND              | ND              | 0,12 $\pm$ 0,01 | ND              | 0,14 $\pm$ 0,00 |
| <b>P4</b>     | 0,2 $\pm$ 0,02               | ND              | ND              | ND              | ND              | 0,1 $\pm$ 0,01  |
| <b>Gual</b>   | ND                           | ND              | ND              | 0,13 $\pm$ 0,00 | 0,11 $\pm$ 0,00 | 0,18 $\pm$ 0,01 |
| <b>Guall</b>  | ND                           | ND              | ND              | 0,12 $\pm$ 0,02 | ND              | ND              |
| <b>Gualll</b> | 0,13 $\pm$ 0,01              | ND              | ND              | ND              | ND              | 0,13 $\pm$ 0,01 |

ND: Não detectado.

De acordo com Leite et al. (2008), a aplicação da enzima purificada pode ser inviável, portanto, a necessidade de testar as enzimas brutas mostra perfis de grande aplicação biotecnológica. Ao comparar a produção de  $\beta$ -glicosidase da levedura *Aureobasidium pullulans* com o fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* obteve-se respectivamente, 1,3U/mL e 7,0U/mL de produção máxima da enzima  $\beta$ -glicosidase, demonstrando que em leveduras, a produção desta enzima não é muito alta, apesar deste valor ser referenciado como um dos maiores já produzidos por *A. pullulans*.

Quando foi feita a prospecção de xilanase, a atividade foi mínima, caracterizando assim que os isolados não apresentam boa capacidade em hidrolisar compostos lignocelulósicos. Esses resultados concordam com a literatura, onde segundo Motta e Filho (2008), de um total de 349 leveduras selvagens analisados, foram obtidas somente duas linhagens produtoras de xilanase, avaliados em dois

meios de culturas diferentes, que apresentarem a atividade enzimática em torno de 2 U/mL. Somente a linhagem *Meyerozyma (Pichia) caribbica*, foi relevante na produção de  $\beta$ -glicosidase (1,84U/mL), levando em consideração que (Dongyang Liu et al, (2012) descreveram a produção de b-glicosidase por espécies de *Pichia* em linhagens recombinantes, com a inserção de genes do fungo filamentososo *Aspergillus fumigatus*, alcançando então valores acima de 100 U/mg.

Nesta pesquisa, a habilidade das leveduras em degradar celulose foi avaliada com a utilização de caboximetilcelulose como substrato. Assim como Buzzini e Martini (2002), esta pesquisa não obteve nenhuma linhagem positiva para o caráter celulolítico. As pesquisas que evidenciam valores elevados de atividade celulolítica de fungos em sua maioria destacam espécies de fungos filamentosos, com isolamento de diferentes locais, como água e material em decomposição como relatado por Basso et al. (2010) que descreve as linhagens *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Acremonium/Penicillium* e *Trichoderma*, isolados de madeira de decomposição e bagaço de cana-de-açúcar como produtores de enzimas celulolítica.

**Tabela 4: Produção de Invertase, Amilase e Pectinase em meio líquido (28°C/72h)**

|               | Atividade enzimática em U/mL |              |             |             |             |             |
|---------------|------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|               | Invertase                    |              | Amilase     |             | Pectinase   |             |
|               | Intra                        | Extra        | Intra       | Extra       | Intra       | Extra       |
| <b>I1</b>     | ND                           | 0,23 ± 0,01  | ND          | ND          | 0,79 ± 0,02 | 0,11 ± 0,00 |
| <b>I2</b>     | ND                           | 0,58 ± 0,02  | ND          | ND          | 0,31 ± 0,02 | 0,11 ± 0,02 |
| <b>P1</b>     | 15,83 ± 0,80                 | 0,75 ± 0,025 | ND          | ND          | 2,8 ± 0,03  | 0,8 ± 0,01  |
| <b>P2</b>     | 10,09 ± 0,39                 | 1,25 ± 0,40  | ND          | ND          | 1,7 ± 0,01  | 0,2 ± 0,00  |
| <b>P3</b>     | 4,52 ± 0,18                  | 0,54 ± 0,01  | 0,16 ± 0,01 | ND          | 2,35 ± 0,02 | 0,1 ± 0,00  |
| <b>P4</b>     | 0,46 ± 0,025                 | 0,54 ± 0,00  | 0,11 ± 0,01 | ND          | 0,4 ± 0,02  | 0,6 ± 0,02  |
| <b>Gual</b>   | 0,11 ± 0,00                  | 0,12 ± 0,00  | ND          | ND          | 0,65 ± 0,00 | 1,0 ± 0,01  |
| <b>Guall</b>  | 0,1 ± 0,00                   | 0,09 ± 0,00  | ND          | 0,10 ± 0,00 | ND          | 0,11 ± 0,02 |
| <b>Gualll</b> | 0,1 ± 0,00                   | 0,15 ± 0,01  | ND          | 0,10 ± 0,00 | 0,53 ± 0,10 | 0,44 ± 0,02 |

ND: Não detectado.

Os resultados obtidos para prospecção de leveduras com habilidade de produzir Amilases resultam em número restrito de cepas selecionadas, pois a capacidade de utilizar amido como fonte de carbono é pouco frequente em leveduras como atestam os resultados apresentados por Farias e Vital (2008), que obteve somente 5% das linhagens capazes de produzir amilases.

Como resultados mais promissores do processo de indução com diferentes fontes de carbono, foi obtido da enzima Invertase (Tabela 4) pelas espécies *Meyerozyma (Pichia) caribbica* em  $15,83 \pm 0,80$ , *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii* em  $10,09 \pm 0,39$ , e *Pichia kudriavzevii* em  $4,52 \pm 0,18$  obtidas dos frutos da Pinha (*Annona squamosa*).

A sacarose é o substrato para a produção de invertase, um subproduto da manufatura de açúcar e rico em sacarose utilizado para a produção industrial de invertase por *S. cerevisiae*. Porém, os isolados Gual e Guall, que foram identificados como *Candida* sp. e *Candida hainanensis*, não se mostraram potencialmente produtores desta enzima ( $<0,1$  U/mL).

De acordo com Gargel et al. (2011), dentre as 13 espécies de leveduras testadas, *Candida stellata*, foi a única a apresentar atividade enzimática para invertase, atingindo 7,76U/mL, enquanto a linha comercial Fleischmann® de *Saccharomyces cerevisiae*, descrita como boa produtora de invertase apresentou somente 2,53 U/mL. Uma das justificativas para tal feito indicado pela autora é que na contagem de células viáveis, a espécie *C. stellata* apresentou cerca de cinco vezes mais células do que *Saccharomyces cerevisiae*, tendo como principal alteração, o pH do mosto, que ficou acima de 6,0 para *S. cerevisiae*, o que pode favorecer a contaminação por bactérias, prejudicando assim seu desenvolvimento.

O gênero *Pichia* apresenta um grande número de espécies e, conseqüentemente, inclui algumas atraentes no ponto de vista industrial. Para Rodriguez et al. (1995), a espécie *Pichia anomala* apresentou rendimento de produção de invertase 30% superior aos valores obtidos com *Saccharomyces* sp. Moharib et al. (2000), descrevem a produção de enzimas pécticas em leveduras da espécie *Pichia pinus* isoladas de resíduos dos frutos de manga, demonstrando a importância tecnológica do isolamento desses microrganismos.

As enzimas que hidrolisam substâncias pécticas, as pectinases, apresentam grande aplicação na indústria alimentícia, com aplicabilidade em indústrias para clarificar ou aumentar o rendimento de extração de sucos. Essa habilidade pode ser aplicada na fabricação de sucos, ou bebidas alcólicas, como a produção de vinhos, e na extração de azeite e fermentação de chás, café e cacau, de forma que um grande número de agentes microbianos produz uma ou mais enzimas do complexo pectinolítico (Silva et al. 2005).

A linhagem *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii* produziu 2,35U/mL de pectinase e *Meyerozyma (Pichia) caribbica* produziu 2,8U/mL. De acordo com Blanco et al. (1999), diversos gêneros de leveduras apresentam atividade pectinolítica, inclusive *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. e *Kluyveromyces marxianus*, isolados de grãos de café e cacau.

Buzzini e Martini (2002), encontraram cerca de 10% de leveduras produtoras de pectinases, isoladas de solo, água e insetos, enquanto Silva et al. (2005), encontrou 7% de leveduras produtoras de pectinases isoladas de frutos.

Entretanto, em função dos métodos utilizados servirem como triagem, existe a necessidade de novas pesquisas acerca do tema, a metodologia aplicada neste estudo mostrou-se um bom teste de triagem para espécies de leveduras, que possam ser ótimas produtoras de enzimas. Esses resultados abrem novas perspectivas para seleção de microrganismos, em especial, de leveduras com atividade na fermentação de frutos do Cerrado.

## CONCLUSÕES

Conclui-se com a execução deste trabalho que nove linhagens de leveduras foram isoladas e identificadas a partir de frutos do Cerrado, e apenas três linhagens (*Meyerozyma (Pichia) caribbica*, *Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii* e *Pichia* sp.) apresentaram potencial biotecnológico para a produção de enzimas invertases, pectinases e  $\beta$ -glicosidases.

## AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso Do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro para esta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool *J Mol Biol* 215:403-410 doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2S0022-2836(05)80360-2 [pii]
- Alves-Prado HF, Pavezzi FC, Leite RSR, de Oliveira VM, Sette LD, Da silva R (2010) Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado *Appl Biochem Biotechnol* 161:333-346 doi:10.1007/s12010-009-8823-5
- Baraldo Junior A, Borges DG, Tardioli PW, Farinas CS (2014) Characterization of [beta]-Glucosidase Produced by *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation and Partially Purified Using MANAE-Agarose *Biotechnology Research International* 2014:8 doi:10.1155/2014/317092
- Basilio AC, de Araujo PR, de Moraes JO, da Silva Filho EA, de Moraes MA, Jr., Simoes DA (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process *Curr Microbiol* 56:322-326 doi:10.1007/s00284-007-9085-5
- Basso TP, Gallo CR, Basso LC (2010) Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:1282-1289
- Batistote M, Cardoso CAL, Ramos DD, Ernandes JR (2010) Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar *Ciência e Natura* 32:83 - 95
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010) Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures *Appl Microbiol Biotechnol* 87:99-108 doi:10.1007/s00253-010-2585-4
- Blanco P, Sieiro C, Villa TG (1999) MiniReview Production of pectic enzymes in yeasts *Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters* 175:1-9
- Buzzini P, Martini A (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments *J Appl Microbiol* 93:1020-1025 doi:1783 [pii]
- Carvalho RVd, Corrêa TLR, Silva JCMd, Viana AP, Martins MLL (2008) Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima *Food Science and Technology (Campinas)* 28:380-386
- Damiano VB, Ward R, Gomes E, Alves-Prado HF, Da Silva R (2006) Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2 *Appl Biochem Biotechnol* 129-132:289-302
- Farias MVd, Vital MJS (2008) Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em roraima, Brasil. Universidade Federal de Roraima - UFR

- Gargel CA, Silva Rd, Baffi MA (2011) Rastreamento de leveduras autóctonas para a produção de pectinase, tanase e invertase. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- Gaviria JV, Osorio EC (2012) Diversidad de levaduras asociadas a inflorescencias de mango y flores `lulo arbóreo` Rev Bio Agro 10
- Guimarães TM, Bonfim TMB, Pichet CMTF (2005) Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a elaboração de vinhos Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acid symposium series 41:95-98
- Haq I-U, Javed MM, Khan TS (2006) An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10 African Journal of Biotechnology 5:5
- Klink CA, Machado RB (2005) A conservação do Cerrado brasileiro Megadiversidade 1
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (1998) The Yeast, a taxonomic study vol 4th.
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences Antonie Van Leeuwenhoek 73:331-371
- Landell MF, Valente P (2006) Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do parque de itapuã-viamão/RS. Universidade federal do rio grande do sul - UFRGS
- Las Heras-Vazquez FJ, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez JM, Rodriguez-Vico F (2003) Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers FEMS Yeast Res 3:3-9 doi:S1567135602001344 [pii]
- Leite RSR, Alves-Prado HF, Cabral H, Pagnocca FC, Gomes E, Da-Silva R (2008) Production and characteristics comparison of crude -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes Enzyme and Microbial Technology 43:391-395
- Lima AF, Park YK (2003) Produção e caracterização de b-glicosidase vegetal e microbiana e sua aplicação para conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas. Universidade estadual de Campinas - Unicamp
- Lima JRCd, França FPd, Leite SGF (2009) Biodegradação de resíduo proveniente da indústria do biodiesel por *pichia guilliermondii* mpo2. Universidade Federal do Rio de Janeiro
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar Analytical Chemistry 31

- Motta FB, Filho FM (2008) Triagem, seleção, produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres. Universidade estadual de Campinas - UNICAMP
- Moharib, SA, el-Sayed, ST, Jwanny, EW. Evaluation of enzymes produced from yeast. *Nahrung*, v. 44, n. 1, 2000.
- Novaki L, Hasan SDM, Kadowaki MK, Andrade D (2010) Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja ENGEVISTA 12:131-140
- Oliveira RFd, Cereda MP, Oliveira CEd (2013) Leveduras com atividade de fermentação em caldo de cana, isoladas sob estresse, de frutos do Cerrado. Universidade Católica Dom Bosco - UCDB
- Pereira ZV, Fernandes SSL, sangalli A, Mussury RM (2012) Usos múltiplos de espécies nativas do bioma Cerrado no Assentamento Lagoa Grande, Dourados, Mato Grosso do Sul Revista Brasileira de Agroecologia 7(2):126-136
- Ponzzes CMPBSd, Rosa CA, Trindade RdC, Pereira GE (2010) Diversidade e seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de uvas utilizadas na produção de vinhos no vale do são francisco, Brasil Programa de pós-graduação em biotecnologia
- Ratti RP, Hokka CO, Sousa CPd (2009) Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces tubercidius*, endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do Cerrado de São Carlos-SP. Universidade federal de São Carlos - UFSCar.
- Ravindar DJ, Elangovan N (2013) Molecular identification of amylase producing *Bacillus subtilis* and detection of optimal conditions *Journal of Pharmacy research* 6:426 - 430
- Rodriguez J, Perez JA, Ruiz T, Rodriguez L (1995) Characterization of the invertase from *Pichia anomala* *Biochemical Journal* 306
- Silva CAA, Lacerda MPF, Leite RSR, Fonseca GG (2013) Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses *Electronic Journal of Biotechnology* 16:9
- Silva EGd, Borges MdF, Medina C, Piccoli RH, Schwan RF (2005) Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits *Federation of European Microbiological Societies - Yeast Research* 5:859-865
- Uenojo M, Pastore GM (2007) Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas *Química Nova* 30:388 - 394
- Zarzoso BE, Belloch C, Uruburu F, Querol A (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribossomal internal transcribed spacers *International Journal of Systematics Bacteriology* 49:329 - 337

# APÊNDICES



Apêndice A – Características morfológicas dos isolados de leveduras.

**Tabela 1 – Triagem morfológica colonial e celular dos isolados de leveduras**

| Isolado                                  | Identificação | Colônias |        |                  | Células |                               |
|--|---------------|----------|--------|------------------|---------|-------------------------------|
|  |               | Diâmetro | Cor    | Aspecto          | Forma   | Tipo de reprodução vegetativa |
| <i>Candida hainanensis</i>               | <b>Gual</b>   | 3mm      | Branca | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |
|  | <b>Guall</b>  | 3mm      | Branca | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |
|  | <b>Gualll</b> | 3mm      | Branca | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |
| <i>Candida citri</i>                     | <b>I1</b>     | 2mm      | Creme  | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |
| <i>Candida citri</i>                     | <b>I2</b>     | 2mm      | Creme  | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |
| <i>Meyerozyma (Pichia) caribbica</i>     | <b>P1</b>     | 5mm      | Branca | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |
|  | <b>P2</b>     | 4mm      | Branca | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |
| <i>Wickerhamomyces (Pichia) ciferrii</i> | <b>P3</b>     | 4mm      | Branca | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |
| <i>Pichia kudriavzevii</i>               | <b>P4</b>     | 5mm      | Branca | Lisa e brilhante | Oval    | Brotamento multipolar         |

Apêndice B – Características moleculares das linhagens isoladas.

I1

*Candida citri* strain 11-469 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene.

| <b>Score</b> | <b>Expect</b> | <b>Identities</b> | <b>Gaps</b> | <b>Strand</b> |
|--------------|---------------|-------------------|-------------|---------------|
| 152 bits(82) | 3e-33         | 96/103(93%)       | 0/103(0%)   | Plus/Minus    |

I2

*Candida citri* strain 11-469 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene.

| <b>Score</b> | <b>Expect</b> | <b>Identities</b> | <b>Gaps</b> | <b>Strand</b> |
|--------------|---------------|-------------------|-------------|---------------|
| 152 bits(82) | 3e-33         | 96/103(93%)       | 0/103(0%)   | Plus/Minus    |

P1

*Pichia caribbica* ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain IMUFRJ 51970

| <b>Score</b>   | <b>Expect</b> | <b>Identities</b> | <b>Gaps</b> | <b>Strand</b> |
|----------------|---------------|-------------------|-------------|---------------|
| 1064 bits(576) | 0.0           | 579/580(99%)      | 1/580(0%)   | Plus/Plus     |

P3

*Wickerhamomyces ciferrii* strain NU17L71 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2.

| <b>Score</b>  | <b>Expect</b> | <b>Identities</b> | <b>Gaps</b> | <b>Strand</b> |
|---------------|---------------|-------------------|-------------|---------------|
| 933 bits(505) | 0.0           | 519/525(99%)      | 3/525(0%)   | Plus/Minus    |

P4

*Pichia kudriavzevii* strain GY1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2.

| <b>Score</b>  | <b>Expect</b> | <b>Identities</b> | <b>Gaps</b> | <b>Strand</b> |
|---------------|---------------|-------------------|-------------|---------------|
| 887 bits(480) | 0.0           | 491/496(99%)      | 2/496(0%)   | Plus/Plus     |

Guall

*Candida hainanensis* strain AS2.3478 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene.

| <b>Score</b>  | <b>Expect</b> | <b>Identities</b> | <b>Gaps</b> | <b>Strand</b> |
|---------------|---------------|-------------------|-------------|---------------|
| 195 bits(105) | 6e-46         | 214/264(81%)      | 18/264(6%)  | Plus/Minus    |