

1 **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COMUNIDADE DE LEVEDURAS DE**  
2 **FRUTOS DA FLORESTA AMAZÔNICA**

3 Tayanny Margarida M. **ALMEIDA**<sup>1</sup>; Maxwel A. **ABEGG**

4 Universidade Federal do Amazonas – UFAM

5 Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia - ICET

6 <sup>1</sup>Bolsista CNPq: Graduação em Farmácia

7 [tayannymenezes182@hotmail.com](mailto:tayannymenezes182@hotmail.com); [maxabegg@gmail.com](mailto:maxabegg@gmail.com)

## 8 RESUMO

9 Leveduras de importância biotecnológica são geralmente isoladas de frutos. No presente  
10 trabalho, sete espécies de frutos de plantas nativas da floresta Amazônica foram  
11 coletados nos arredores do município de Itacoatiara-AM e examinados para a  
12 verificação da presença de leveduras de superfície e endofíticas. Porções de frutos  
13 estéreis e não estéreis superficialmente foram incubados por até sete dias em ágar  
14 extrato de levedura-peptona-dextrose (YEPD) e ágar WLN (*Wallerstein Laboratory*  
15 *Nutrient Agar*). As leveduras que apresentaram morfologia colonial diferenciada foram  
16 repicadas duas vezes sucessivas para isolamento e caracterização da morfologia celular.  
17 Um total de 31 cepas de leveduras foram caracterizadas fenotipicamente e testadas com  
18 relação ao seu potencial biotecnológico, através da verificação da habilidade de  
19 crescimento em meio com 50% de glicose, tolerância ao álcool e termotolerância e  
20 ainda para a produção de enzimas de interesse, particularmente amilase, caseinase,  
21 gelatinase, maltase, celobiase e esterase. Apenas um isolado apresentou atividade de  
22 amilase e gelatinase, e 24 cepas cresceram a 41 °C e 13 cresceram a 50 °C. Os 31  
23 isolados de leveduras foram triados, através de PCR *fingerprinting*, para  
24 sequenciamento das regiões D1/D2 do 26S do rDNA. Até o momento, as identidades  
25 das seguintes espécies foram confirmadas: *Meyerozyma caribbica* e *Hanseniaspora*  
26 *opuntiae*. Assim foi possível encaminhar a conclusão da caracterização molecular de  
27 isolados de leveduras de frutos deste estudo e de projeto anterior, o que permitirá a  
28 análise da diversidade de leveduras em sete espécies de frutos Amazônicos e verificar a  
29 existência de cepas candidatas a estudos de interesses biotecnológicos.

30 **Palavras-chave:** *leveduras, frutos, biotecnologia.*

31

32 **ABSTRACT**

33 Yeasts of biotechnological importance are usually isolated from fruits. In the present  
34 study, seven fruit species of plants native to the Amazon rainforest were collected in the  
35 vicinity of Itacoatiara-AM and examined for the presence of surface and endophytic  
36 yeast. Servings of fruits surface sterile and non-sterile were incubated for up to seven  
37 days on agar yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) and WLN agar (*Wallerstein*  
38 *Laboratory Nutrient Agar*). Yeasts that showed different colony morphology were  
39 passaged twice in succession for isolation and characterization of cell morphology. A  
40 total of 31 strains of yeasts were phenotypically characterized and tested with respect to  
41 their biotechnological potential, by checking their ability to grow in medium with 50%  
42 glucose, thermotolerance and ethanol tolerance and for the production of enzymes of  
43 interest, particularly amylase, caseinase, gelatinase, maltase, cellobiase and esterase,  
44 Only one isolate showed amylase and gelatinase activity, and 24 strains grown at 41 ° C  
45 and 13 grew at 50 ° C. The 31 yeast isolates were screened by PCR fingerprinting for  
46 sequencing of the D1/D2 regions of the 26S rDNA. So far, the identities of the  
47 following species were confirmed: *Meyerozyma caribbica* and *Hanseniaspora opuntiae*.  
48 Thus it was possible to forward the completion of the molecular characterization of  
49 yeast isolates from the fruits of this study and a previous one, which allows the analysis  
50 of seven diverse species of yeast Amazon fruits and verify the existence of candidate  
51 strains of interest biotechnology studies.

52 **Keywords:** yeasts, fruits, biotechnology.

53

## 54 1. INTRODUÇÃO

55 As leveduras constituem um grupo de microrganismos unicelulares  
56 pertencentes ao Reino *Fungi* que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por  
57 fissão binária. Possuem núcleo organizado com membrana nuclear (célula eucariótica),  
58 são aclorofiladas, a nutrição é heterotrófica através de absorção dos nutrientes, a parede  
59 celular é rígida, podem produzir células especializadas: os esporos. Mas, ao contrário  
60 dos fungos filamentosos, elas não formam corpos de frutificação (Kurtzman e Fell  
61 1998). Apresentam uma relação bastante grande com os basidiomicetos e com os  
62 ascomicetos, devido à produção de esporos e por isso são encontradas em seus  
63 respectivos filios. Podem também ser encontradas entre os fungos mitospóricos, que são  
64 aqueles sem reprodução sexuada conhecida, constituindo um grupamento artificial  
65 (Hawksworth *et al.* 1995).

66 Atualmente em torno de 100 gêneros e 1500 espécies de leveduras estão  
67 descritas. No entanto, evidências correntes sugerem que essas espécies representam  
68 menos de 1% das que ocorrem na natureza (Kurtzman e Fell 1998; Lathar *et al.* 2010).

69 As leveduras são geralmente encontradas em folhas, frutos, grãos de cereais e  
70 outros substratos contendo açúcares, mas também podem ser isoladas do ar, do solo, de  
71 águas de lagos, rios e mares; da pele e do intestino de animais, incluindo associações  
72 com insetos. De fato, leveduras são comumente distribuídas ao longo da biosfera (Phaff  
73 *et al.* 1966; Webster e Weber 2007).

74 É notável que as maiores densidades de leveduras sejam associadas com  
75 concentrações de açúcares assimiláveis e outras fontes de carbono. Superfícies de folhas  
76 e exsudatos de plantas comumente sustentam grandes números de leveduras. Di Menna  
77 (1959 apud Webster & Weber, 2007) reportou  $10^5$  a  $10^7$  células viáveis/gramas de

78 folhagens frescas. Flores e frutos em decomposição e outros materiais de plantas  
79 também suportam um amplo espectro de espécies em grandes números.

80 Os frutos naturalmente contêm altas concentrações de açúcar, assim espécies  
81 de leveduras estão presentes, podendo ser facilmente isoladas. Distintas espécies de  
82 levedura são supostamente presentes e associadas com diferentes frutos em ambientes  
83 naturais. Insetos representam fontes ricas para leveduras, especialmente os associados à  
84 madeira e espécies de drosófila, sendo transportadores naturais destas entre frutos  
85 (Lathar *et al.* 2010).

86 A floresta Amazônica ocupa a área norte do Brasil, ocupando ao redor de 47%  
87 do território nacional. É a maior formação de floresta do planeta, condicionada pelo  
88 clima úmido equatorial. Possui grande variedade de flora e fauna, vivendo entre a  
89 floresta densa e campos abertos. Três tipos de florestas são comuns: floresta densa em  
90 solo firme (terra-firme), florestas alagadas periodicamente (várzea) e florestas alagadas  
91 sazonalmente (igapó) (Rosa e Péter 2006). Diferentemente de florestas temperadas, nas  
92 florestas tropicais as espécies de plantas apresentam flores e frutos em diferentes  
93 períodos do ano, característica que produziria alimento e substrato para a colonização de  
94 leveduras ao longo do ano (Rosa e Péter 2006).

95 Atualmente, sequências de DNA de cepas desconhecidas de leveduras têm sido  
96 comparadas com aquelas de cepas de referência autênticas para a identificação de  
97 espécies. É claro que métodos genético-moleculares precisam ser usados para a  
98 identificação de leveduras se quisermos obter uma estimativa adequada de sua  
99 biodiversidade. Ainda, métodos moleculares mais rápidos de identificação serão  
100 necessários se grandes números de isolados devem ser examinados (Landell 2006;  
101 Fuentefria 2007).

102 Pelo fato de que leveduras são metabolicamente diversas, as mesmas são  
103 usadas em muitos processos industriais, como na produção de etanol (bebidas, industrial  
104 e combustível), vitaminas, ácidos orgânicos, carotenóides e enzimas. Um vasto número  
105 de leveduras catabolizam compostos benzênicos e podem possivelmente provarem-se  
106 valiosas para a limpeza de dejetos de indústrias químicas bem como para  
107 biossintetizarem novos compostos úteis para humanos. Avanços em técnicas  
108 moleculares tornaram leveduras também altamente atrativas para a síntese de proteínas  
109 farmacologicamente ativas e outros compostos (Webster e Weber 2007).

110 Considerando a importância da análise da biodiversidade de leveduras em  
111 frutos ou da busca por cepas biotecnologicamente uteis para comercialização, o objetivo  
112 deste trabalho foi ampliar a caracterização preliminar da comunidade de leveduras  
113 associadas a frutos da floresta Amazônica, para identificação de novas espécies e/ou  
114 cepas alternativas com potencial para utilização em aplicações biotecnológicas.

115

## 116 **2. METODOLOGIA**

### 117 **2.1. Coleta de Amostras**

118 As amostras foram coletadas no período compreendido entre junho e dezembro  
119 de 2012 nos arredores do município de Itacoatiara, com exceção do fruto Cubiu que foi  
120 coletado no município de Rio Preto da Eva – AM (Figura 1).

121 Padronizou-se a coleta asséptica, em recipientes estéreis, coletando-se nove  
122 unidades de cada fruto diretamente da árvore, com objetivo de assegurar somente a  
123 presença de leveduras da amostra e não de contaminações (fungos filamentosos,  
124 bactérias ou leveduras do solo) e em seguida foram transportadas ao Laboratório de

125 Micologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (UFAM-ICET) para seu  
126 processamento.

## 127 **2.2. Isolamento de leveduras de frutos**

128 Deve -se considerar que diferentes técnicas são utilizadas para o isolamento de  
129 leveduras, de acordo com o material de partida (Limtong et al. 2010). Neste estudo, para  
130 o isolamento de leveduras dos frutos, padronizou-se realizar a esterilização superficial  
131 de cinco dos nove frutos, por imersão em álcool etílico 95% (1 min), hipoclorito de  
132 sódio (5 min), novamente em álcool etílico 95% (1 min) e em água destilada (1 min).  
133 Em seguida, pedaços dos frutos foram cortados como auxílio de uma faca desinfetada  
134 em ambiente asséptico, e depositados em béqueres estéreis previamente tarados, que  
135 seguiram para pesagem. A fração de cada fruto foi então macerada em um almofariz  
136 estéril em ambiente asséptico sendo adicionados 50 ml de água destilada estéril,  
137 formando uma mistura. Desta mistura, 0,1 ml foram espalhados em triplicatas com o  
138 auxílio da alça de *Drigalsky* em placas contendo o meio YEPG (Figura 3) (glicose 20 g,  
139 peptona 20 g, extrato de levedura 10 g, ágar 20 g, pH 4,5), contendo cloranfenicol (50  
140 mg L<sup>-1</sup>) para inibir o crescimento de fungos filamentosos e bactérias.

141 Paralelamente à condução da atual proposta, cada fruto foi igualmente  
142 processado e semeado no ágar WLN (Figura 3) (*Wallerstein Laboratory Nutrient Agar*),  
143 a fim de propiciar uma análise mais fiel da comunidade de leveduras associadas aos  
144 frutos em estudo. Desta forma, considerando o projeto PIBIC anterior com proposta  
145 semelhante, foi possível o isolamento de leveduras em meio YEPG a partir de 15 frutos  
146 de 7 diferentes espécie e de 9 frutos de 7 diferentes espécies no meio WLN.

147 As placas foram incubadas a 30 °C por até sete dias. Após a incubação,  
148 representantes dos tipos morfológicos das colônias de leveduras foram isoladas por

149 estriação em ágar YEPG (Lachance *et al.* 2001; Landell 2006; Lee *et al.* 2011, Sipiczki  
150 2011).

### 151 **2.3. Identificação fenotípica preliminar das leveduras**

152 Para a realização da identificação fenotípica, os isolados foram novamente  
153 repicados para placas por estriação em ágar YEPG e incubadas a 30 °C por até sete dias  
154 para assim realizar a análise fenotípica.

155 As cepas de leveduras foram caracterizadas preliminarmente em termos  
156 morfológicos e foram avaliadas algumas características fisiológicas dos isolados, para  
157 iniciar o procedimento de identificação convencional das leveduras, seguindo métodos  
158 padrão (Yarrow 1998; Barnett *et al.* 2000; Landell 2006).

159 Quanto à morfologia colonial, foram observadas as características coloniais  
160 como cor (branca, creme, amarelada, laranja, rosa, vermelha, marrom, preta), brilho  
161 (brilhante, opaca), forma (circular, oval ou fusiforme), margem (regular, irregular,  
162 lobada ou com raízes), superfície (lisa ou rugosa), elevação (plana, convexa, umbonada  
163 ou vulcão) e consistência (cremosa, mucóide, butirosa, membranosa, esfarelada, dura,  
164 seca) (Yarrow 1998).

165 As características celulares observadas ao microscópio óptico foram: forma e  
166 tamanho da célula, presença de pseudomicélio, tipo de reprodução assexuada  
167 (brotamento e/ou fissão) e, caso fosse por brotamento, o tipo de brotamento (multipolar,  
168 bipolar, unipolar), presença de ascósporos e de balistosporos (Kurtzman e Fell 1998;  
169 Barnett *et al.* 2000).

### 170 **2.4. Produção de ascos**

171 A produção de ascósporos pelas leveduras com afinidade ascomicética foi  
172 verificada utilizando como meio o ágar acetato e incubação a 30 °C por sete dias. Em



173 microscopia óptica foram observadas a presença ou ausência de conjugação, forma e  
174 número de ascósporos por asca e liberação ou não de esporos logo após sua formação.

## 175 **2.5. Microcultivo em lâmina**

176 O microcultivo em lâmina foi a técnica utilizada para observação de pseudo-  
177 hifa ou de hifa verdadeira, utilizando o meio de cultura ágar fubá (1,7% de fubá de  
178 milho, 0,5% de ágar, 0,04% de cloranfenicol, pH 4,0).

## 179 **3. Verificação do potencial biotecnológico**

### 180 **3.1. Produção de amilase**

181 A atividade amilolítica dos isolados foi verificada através da degradação do  
182 amido solúvel (Strauss *et al.* 2001; Mautone *et al.* 2010). Após, sete dias de incubação  
183 foi adicionada uma solução de lugol a placa de ágar amido (0,67% de YNB, 0,2% de  
184 amido solúvel, 2% de ágar, pH 6), observando-se após 30 minutos, um halo nítido  
185 amarelado ao redor do crescimento das cepas consideradas positivas.

### 186 **3.2. Produção de caseinase**

187 A atividade caseinolítica foi testada em placas de Petri contendo o meio ágar  
188 caseína (0,67% de YNB, 0,5% de glicose, 5% de leite desnatado em pó, 2% de ágar, pH  
189 7,0 ajustado com KOH 5N), (Strauss *et al.* 2001). A revelação foi realizada após sete  
190 dias de incubação a 25 °C, com adição de HCl 1N na superfície do meio deixando reagir  
191 com a caseína por 1 hora.

### 192 **3.3. Produção de gelatinase**

193 A atividade de protease foi verificada através da hidrólise de gelatina,  
194 utilizando o meio malte-gelatina (10% extrato de malte, 12% gelatina) em tubos de  
195 ensaio (Trindade *et al.* 2002). As leveduras após serem crescidas em ágar YEPG por  
196 48h a 25 °C foram inoculadas na superfície do meio (em tubos) e incubadas por 21 dias

197 a 25 °C. Após esse período, deixaram-se os tubos cerca de 2 horas a 4 °C e, em seguida,  
198 foi avaliada a atividade enzimática através do grau de hidrólise do meio.

### 199 **3.4. Produção de celobiase e esterase**

200 A capacidade de degradar celobiase e a atividade de esterase foi verificada através  
201 do método réplica em placas. As cepas foram previamente inoculadas em água destilada  
202 estéril por 24 horas para exaurir as reservas energéticas endógenas. Então foram  
203 inoculadas em placas contendo o respectivo meio (0,67% YNB, 2% ágar e 0,5%  
204 celobiose ou Tween 20 0,5%), conforme Yarrow (1998). Após 7 dias de incubação a 25  
205 °C, a atividade enzimática foi mensurada através da intensidade do crescimento  
206 colonial, sendo classificado como negativo (-), fraco (W), positivo (+), e ótimo (++), em  
207 comparação ao crescimento das mesmas cepas no controle negativo (sem celobiose ou  
208 Tween 20) e no controle positivo (com glicose).

### 209 **3.5. Habilidade de utilização de maltose**

210 Foi realizada a triagem utilizando ágar YP (1% extrato de levedura, 2% peptona) ou  
211 caldo contendo 2% de maltose. Cepas formando colônias grandes em placas de YPM  
212 foram incubadas a 30 °C por 48 horas e testadas para cultivo em YPM caldo a 30 °C por  
213 24 horas comparando seu crescimento a uma OD<sub>600nm</sub> (Lee *et al.* 2011).

### 214 **3.6. Tolerância ao etanol**

215 Os isolados foram examinados para sua tolerância a alto conteúdo de álcool, através  
216 de inoculação em placas de ágar YEPG contendo 15 a 30% de álcool. As cepas que  
217 conseguiram crescer em placas com álcool foram ainda testadas por cultura em caldo  
218 YEPG contendo 15% de álcool sob agitação e comparadas em termos de crescimento a  
219 uma OD<sub>600nm</sub> em espectrofotômetro (Lee *et al.* 2011).

### 220 **3.7. Teste de tolerância a 50% de glicose**

221 Para testar a capacidade de cepas selvagens de leveduras de crescer em meio com  
222 alta concentração de glicose, os isolados foram cultivados em placas contendo ágar  
223 YEPG modificado (acrescido de glicose 50%). Para controle positivo foi utilizado o  
224 meio com glicose 2%, incubação a 30°C (Barnett *et al.* 2000; Landell 2006). As cepas  
225 que conseguiram crescer em placas foram ainda testadas por cultura em caldo YEPG  
226 contendo glicose 50% a temperatura ambiente sob agitação (200 rpm) e comparadas a  
227 uma OD<sub>600nm</sub> em espectrofotômetro (Lee *et al.* 2011).

### 228 **3.8. Termotolerância**

229 Para caracterização da resposta ao estresse térmico, os isolados foram semeados em  
230 triplicata em placas de Petri contendo ágar YMA (*Yeast extract Malt Agar*) e incubação  
231 nas temperaturas de 30 °C, 38 °C e 41 °C por no máximo 72 horas. Os isolados que  
232 conseguiram crescer em placas foram ainda testados em caldo YMA, sendo a densidade  
233 óptica monitorada a 600nm em espectrofotômetro (Lee *et al.* 2011).

### 234 **3.9. Armazenamento das culturas fúngicas**

235 Como meio de manutenção dos isolados obtidos, foi utilizado o meio YEPG. Os  
236 isolados puros foram semeados em tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado,  
237 conservados em geladeira de 4 à 8 °C e repicados bimestralmente (Odds 1991).  
238 Igualmente, os isolados foram semeados em *ependorfs* contendo caldo YEPG,  
239 adicionado glicerol 20% e armazenados em freezer a -20 °C.

### 240 **3.10. Caracterização molecular das cepas isoladas**

241 Os 31 isolados representativos foram selecionados e enviados em *ependorfs*  
242 estéreis contendo ágar inclinado YEPG para a Profa. Dra. Patrícia Valente,  
243 coordenadora do Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia,  
244 Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS,

245 Porto Alegre – RS, para triagem de isolados por PCR *fingerprinting* e posterior  
246 sequenciamento do rDNA de isolados representativos dos padrões obtidos no  
247 *fingerprinting*.

248

## 249 **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### 250 **4.1. Isolamento de leveduras de frutos**

251 Foram obtidos um total de 31 isolados a partir dos frutos: caju (fruto do  
252 cajueiro - *Anacardium occidentale* L.); taperebá ou cajá (fruto do cajazeiro – *Spondias*  
253 *mombin* L.); fruto do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer); cubiu (*Solanum*  
254 *sessiliflorum* Dunal. Para os frutos que não obtiveram nenhum isolado no projeto atual,  
255 no projetor anterior foram obtidos 29 isolados do fruto abiu, 2 isolados do fruto jambo e  
256 7 isolados do fruto murici. Considerando o projeto atual e o projeto anterior ao qual o  
257 mesmo deu continuidade, foram isolados um total de 113 leveduras a partir de 7  
258 diferentes espécies de frutos nativos ou de importância no Estado do Amazonas.

### 259 **4.2. Identificação fenotípica preliminar das leveduras**

#### 260 **4.2.1. Identificação morfológica colonial e celular**

261 Seguindo os métodos de (Yarrow 1998), observou-se que a morfologia colonial  
262 das leveduras de cada fruto não variou muito (Figura 4) e (Tabela 1). Quanto à  
263 morfologia celular, as características analisadas também variaram pouco (Figura 4) e  
264 (Tabela 2).

265 A partir da análise da Tabela 1, que mostra as características macro  
266 morfológicas dos isolados obtidos, foi possível verificar o percentual de cepas  
267 apresentando determinada característica. Exemplificando, no caso do fruto Tucumã, em  
268 relação à cor, 89% das cepas apresentaram cor creme e 11% na cor bege, 100% com

269 forma circular, margem regular e superfície lisa, 58% exibiram textura seca e 42%  
270 cremosa, 63% opacas e 37% brilhantes. Em relação ao fruto Cubiu, 50% dos isolados  
271 apresentaram cor creme, 25% branca e 25% bege, 100% das cepas exibiram forma  
272 circular, margem regular, superfície lisa, textura seca e elevação elevada, 50%  
273 brilhantes e 50% opacas.

274 Logo, na (Tabela 2) que mostra as características micromorfológicas dos  
275 isolados, observa-se que todos apresentaram reprodução sexuada por brotamento  
276 unipolar. Em relação à forma celular, 74% das cepas apresentaram a forma elipsoidal  
277 oval, 23% globosas e 3% alongadas.

278 Considerando que caracteres morfológicos apresentam pouco poder  
279 discriminatório para identificação de gênero/espécie no caso de leveduras e que não  
280 existe uma uniformidade na literatura de análise destes caracteres, a similaridade das  
281 cepas somente poderia ser discriminada com base em dados bioquímicos ou  
282 principalmente, moleculares.

#### 283 **4.2.2. Produção de ascos**

284 As observações micromorfológicas em relação à observação de ascos foram  
285 relativamente difíceis, mas, ainda assim, foi possível visualizar algumas características.  
286 Em correspondência aos tipos de ascos 97% apresentaram-se esféricos e 3% ausentes, e  
287 quanto ao número de ascos 77% exibiram quatro ascos e 23% dois ascos por asca  
288 (Tabela 2).

#### 289 **4.2.3. Microcultivo em lâmina**

290 Após observação microscópica a 400x, constatou-se que 74% dos isolados  
291 testados apresentaram morfologia de blastosporos sem a ocorrência de pseudo-hifa ou

292 hifa verdadeira, apenas 3% das cepas apresentaram hifa verdadeira e 23% pseudo-hifas  
293 (Tabela 2).

### 294 **4.3.Verificação do potencial biotecnológico**

#### 295 **4.3.1. Produção de amilase**

296 Dos 31 isolados analisados, apenas a cepa Fw-6211 apresentou atividade amilolítica  
297 (Figura 5), observando-se, após um período de 30 minutos, um nítido halo amarelado ao  
298 redor do crescimento da cepa. O restante do meio tornou-se corado de violeta. A reação  
299 se deve à captura do iodo pelas duas moléculas polissacarídeas (amilose e amilopectina)  
300 constituintes da estrutura básica do amido, formando um composto escuro (MacFaddin  
301 2000).

302 Landell 2006, em sua pesquisa com filoplanos de bromélias do parque de Itapuã-  
303 Viamão/RS, identificou apenas 21,1% das leveduras com afinidade ascomicética  
304 apresentaram-se positivas e todos os isolados de *Prototheca* foram negativos. A  
305 produção de amilase por leveduras isoladas de diferentes substratos de Mata Atlântica  
306 foi testada por Buzzini & Martini (2002), que obtiveram um baixo percentual de  
307 leveduras amilolíticas utilizando uma metodologia similar. Fuentesfria & Valente (2005),  
308 analisando leveduras de filoplano, obtiveram apenas 22% de produtores de amilase.  
309 Porém, outros autores encontraram alto percentual de leveduras capazes de degradar  
310 amido isoladas de diferentes substratos (Straus *et al.* 2001). Isso provavelmente reflete a  
311 diversidade dos habitats de onde as leveduras avaliadas foram isoladas.

#### 312 **4.3.2. Produção de caseinase e gelatinase**

313 De acordo com os resultados analisados, nenhum isolado apresentou atividade  
314 caseinolítica. A atividade proteolítica foi verificada através da hidrólise da gelatina,  
315 sendo que apenas a cepa Fw-6211 liquefez completamente o meio de cultura após a

316 retirada dos tubos da refrigeração, cerca de 2 horas a 4 °C. Trindade *et al.* (2002)  
317 avaliaram a produção de enzimas por leveduras isoladas de polpa de frutas tropicais em  
318 três condições: caseinase pH 5,0, caseinase pH 7,0 e gelatinase. Foi observada uma  
319 variação da produção de caseinase em diferentes pH, sendo que o pH ótimo variou com  
320 a fruta de onde as leveduras tinham sido isoladas. Braga *et al.* (1998) testaram a  
321 produção de caseinase por leveduras isoladas da fruta amazônica amapa  
322 (*Parahancornia amapa*) e de moscas *Drosophila* associadas. Aproximadamente 26%  
323 dos isolados analisados foram capazes de hidrolisar a caseína. Alguns isolados  
324 fortemente proteolíticos tiveram a produção de caseinase testada em diferentes pH. As  
325 maiores atividade foram encontradas em pH 3,0 a 5,0. O teste utilizado no referente  
326 projeto para produção de caseinase foi em pH 7,0, o que sugere a possibilidade de  
327 obtenção de mais isolados proteolíticos se diferentes pH forem testados.

#### 328 **4.3.3. Produção de celobiase e esterase**

329 Nenhum isolado apresentou atividade em relação às enzimas celobiase e  
330 esterase. Fuentefria & Valente (2005) em estudos com leveduras isoladas de *Hibiscos*  
331 do Parque Farroupilha (RS), obtiveram 43% dos isolados produtores de esterase,  
332 enquanto 63% dos isolados de filoplano de bromélia do Parque de Itapuã produziram a  
333 enzima (Landell *et al.* 2005). Cerca de 80% dos isolados de filoplano de *Hibiscos rosa-*  
334 *sinensis* obtidos por Fuentefria & Valente (2005) foram produtores de celobiase. Os  
335 isolados de filoplano de bromélias do Parque de Itapuã apresentaram 58% de isolados  
336 positivos na produção da enzima (Landell *et al.* 2005). Aparentemente a produção de  
337 celobiase é comum em isolados de filoplano, o que é esperado, pois a celobiase é um  
338 componente da parede celular de plantas (Lynd *et al.* 2002). Estamos atualmente

339 revisando o nosso procedimento de teste de triagem desta enzima, a fim de descartar  
340 algum erro experimental.

#### 341 **4.3.4. Habilidade de utilização de maltose**

342 Isolados de leveduras foram repicados em placas contendo ágar YPM e  
343 observou-se o crescimento durante 48 horas. Um total de 27 cepas formaram colônias  
344 grandes em placas de ágar. Não foi possível realizar a segunda etapa do experimento  
345 por falta de tempo hábil em função de que as demais atividades demandaram o tempo  
346 do projeto. Os testes seguirão em curso até a apresentação final do projeto.

#### 347 **4.3.5. Tolerância ao etanol e a 50% de glicose**

348 A partir das amostras observadas, nenhum dos 31 isolados cresceram em placas  
349 contendo ágar YMA acrescido de 15 e 30% de etanol, numa tentativa de isolar as  
350 estirpes que podiam tolerar altas concentrações de álcool.

351 A capacidade dos isolados de crescer em meio com concentrações elevadas de  
352 açúcar foi examinada por cultura em ágar YEPG acrescido de 50% de glicose. Das 31  
353 cepas obtidas e testadas, nenhuma conseguiu tolerar altas concentrações de glicose.

354 Lee *et al.* (2011), em seu estudo com leveduras de vinhos, apresentaram dezoito  
355 isolados com bom crescimento em caldo YP contendo 30% de glicose. Também foi  
356 analisado a tolerância dos isolados ao álcool, nenhum dos isolados cresceram em placas  
357 de ágar YPD contendo 30% de álcool e vinte e quatro isolados foram selecionados com  
358 base em sua capacidade de formar colônias em placas de ágar YPD contendo 15% de  
359 álcool

#### 360 **4.3.6. Termotolerância**

361 De acordo com os procedimentos realizados, foi possível observar que 25 cepas  
362 conseguiram crescer a 38 °C e 24 cresceram a 41 °C. Sendo que, não era esperado um



363 número tão elevado de leveduras crescendo em altas temperaturas. A metodologia foi  
364 modificada, não sendo mais realizado o teste em caldo YMA. A partir desse ponto,  
365 todos os 24 isolados que cresceram a 41 °C (Tabela 3) foram submetidos a um novo  
366 teste, sendo semeados em ágar YMA e incubados a 50 °C com observação durante 72  
367 horas. A partir da análise da (Tabela 3) pode-se observar que 13 cepas conseguiram  
368 crescer a 50 °C (Figura 5), sendo que as mesmas cepas foram isoladas dos frutos  
369 Taperebá e Tucumã. Onde 3 isolados são do fruto Taperebá e 10 isolados do fruto  
370 Tucumã, o que mostra a relevante capacidade dessas leveduras de tolerar altas  
371 temperaturas. Auesukaree *et al.* (2012), isolaram três cepas de *S. cerevisiae* (C3723,  
372 C3751 e C3867) de frutas tailandesas. Estas mostraram-se tolerantes a 41 °C e  
373 demonstraram rendimentos elevados de etanol

#### 374 **4.3.7. Caracterização molecular das cepas isoladas**

375 Quanto ao envio das cepas selecionadas, foi realizado em dezembro de 2012. Os  
376 31 isolados representativos foram selecionados e enviados em eppendorfs estéreis  
377 contendo ágar inclinado YEPG. A extração do DNA dos isolados foi realizada com  
378 sucesso. Para acompanhar e participar da caracterização molecular dos isolados obtidos,  
379 a bolsista permaneceu em Porto Alegre-RS por um período de 14 dias. Dos isolados  
380 analisados, 7 isolados foram identificados, sendo 5 do projeto PIBIC anterior e 2 da  
381 atual proposta.

382 Entre os isolados do fruto Abiu do projeto anterior, as cepas 1411 e 1523 foram  
383 identificadas como *Pichia kudriavzevii* e a cepa 1531 foi identificada como *Pichia*  
384 *manshurica*. A cepa 5412 do fruto Taperebá foi identificada como *Candida tropicalis* e  
385 o isolado 2511 do fruto Jambo foi identificado como *Kodamaea ohmeri*. Na atual  
386 proposta do projeto PIBIC, a cepa Fw-5812 do fruto Taperebá foi identificada como

387 *Hanseniaspora opuntiae* e o isolado 3811 do fruto Caju foi identificado como  
388 *Meyerozyma caribbica*.

#### 389 **4.4. Armazenamento das culturas fúngicas**

390 A metodologia para armazenamento foi modificada. Não sendo mais realizada  
391 a preservação em água destilada estéril de 4-8 °C, pois essa técnica não demonstrou  
392 bons resultados no projeto anterior. A (Figura 5) ilustra os isolados puros em tubos com  
393 ágar YEPG inclinado e em eppendorfs com caldo YEPG, adicionado glicerol 20%.

394

### 395 **5. CONCLUSÃO**

396 A partir de todos os frutos coletados, foram evidenciados microrganismos com  
397 morfologia típica de leveduras. Os isolados de leveduras foram identificados  
398 fenotipicamente pela metodologia convencional e parte das cepas selecionadas para  
399 caracterização e identificação molecular na UFRGS foram analisadas, e 6 espécies  
400 foram identificadas através do sequenciamento do DNA das leveduras, sendo elas  
401 *Candida tropicalis*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica*,  
402 *Hanseniaspora opuntiae* e *Meyerozyma caribbica*. Foi realizada uma verificação  
403 preliminar do potencial biotecnológico dos isolados obtidos através da análise da  
404 produção de enzimas extracelulares.

405 Como o interesse do uso de microrganismos como fonte biotecnológica de  
406 enzimas extracelulares cresce a cada dia, este trabalho buscou apresentar novas  
407 alternativas para a indústria com a prospecção de enzimas novas a partir de frutos  
408 nativos da região.

409 Analisando-se o potencial biotecnológico dos 31 isolados obtidos dos frutos,  
410 verificou-se que apenas o isolado Fw-6211 apresentou resultado positivo para as

411 enzimas amilase, gelatinase, maltase e crescimento a 41 °C. E outras 24 cepas  
412 conseguiram tolerar a temperatura de 41 °C e 13 isolados toleraram a temperatura de 50  
413 °C. Aparentemente a cepa Fw-6211 é candidata ao aprofundamento da caracterização  
414 de seu potencial biotecnológico e encaminhamento para futuros estudos de otimização  
415 de produção enzimática.

416

## 417 **6. AGRADECIMENTOS**

418 Ao Senhor Raimundo Nazaré por disponibilizar seu sítio para a coleta dos  
419 frutos. À Professora Dr. Patrícia Valente pela recepção no Laboratório de Micologia da  
420 UFRGS. Ao colega Maurício Ramírez pela ajuda nos experimentos moleculares. A  
421 Universidade Federal do Amazonas – UFAM e a CNPq pela concessão da bolsa de  
422 iniciação científica.

423

## 424 **7. REFERÊNCIAS**

425 AUESUKAREE, C., *et al.* Characterization and gene expression profiles of  
426 thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolates from Thai fruits. Journal of  
427 Bioscience and Bioengineering, Japan, vol. 114 n. 2, 144-149, 2012.

428 BARNETT, J.A., *et al.* Yeasts, Characteristics and Identification. 4<sup>th</sup> Ed. Cambridge  
429 University Press, 2000. 811p.

430 BRAGA, A.A., *et al.* Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for  
431 extracellular proteinases production. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v.  
432 21, p. 353-359, 1998.

433 BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and  
434 yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*,  
435 Oxford, v.93, p.1020-1025, 2002.

436 FUENTEFRIA, A.M. Bioprospecção de leveduras *killer* com potencial para aplicação  
437 em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos. Tese de Doutorado,  
438 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 144p.

439 FUENTEFRIA, A.M.; VALENTE, P. Screening of enzyme-producing yeast and yeast-  
440 like fungi from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* in Brazil. *Revista Tecno-*  
441 *Lógica*, Santa Cruz do Sul, v. 9, n. 1, p. 9-24, 2005.

442 HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species  
443 estimate revisited. *Mycological Research*, vol.105, p.1422-1432, 2001.

444 KURTZMAN, C.P.; J.W. FELL. *The yeasts, a taxonomic study*. 4<sup>th</sup> Ed. Amsterdam:  
445 Elsevier Science Publishers, 1998. 1088 p.

446 LANDELL, M.F. Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos  
447 leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã – Viamão/RS.  
448 Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2006.  
449 136p.

450 LANDELL, M.F. *et al.* Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras  
451 associadas a bromélias da Praia da Pedreira, Parque de Itapuã - RS. *Revista Tecno-*  
452 *lógica*, Santa Cruz do Sul, v.9 n.2, p.55-67, 2005.

453 LATHAR, P.K.; SHARMA, A.; THAKUR, I. Isolation and random amplified  
454 polymorphic DNA analysis of wild yeast species from 17 different fruits. *Journal of*  
455 *Yeast and Fungal Research*, vol.1, n.8, p.146-151, 2010.

456 LEE, Y.J.; CHOI, Y.R.; LEE, S.Y.; PARK, J.T.; SHIM, J.H.; PARK K.H.; KIM, J.W.  
457 Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Microbiology*,  
458 vol.39, n.1, p.33-39, 2011.

459 LYND, L.R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.  
460 *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v.66, p.506-577, 2002.

461 LIMTONG, S.; KAEWWICHIAN, R.; AM-IN, S.; BOONMAK, C.;  
462 JINDAMORAKOT, S.; YONGMANITCHAI, W.; SRISUK, N.; KAWASAKI, H.;  
463 NAKASE, T. Three anamorphic yeast species *Candida sanitii* sp. nov., *Candida sekii*  
464 sp. nov. and *Candida suwanaritii*, three novel yeasts in the Saturnispora clade isolated  
465 in Thailand. *FEMS Yeast Research*, vol.10, p.114-122, 2010.

466 MACFADDIN, J.P.; LIPPINCOTT, P. Biochemical tests for identification of medical  
467 bacteria. Williams & Wilkins, 2000. 912p.

468 ODDS, F.C. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. *Medical*  
469 *Mycology*, 29(6): 413-415, 1991.

470 PHAFF, H.J. Specific habitats of yeasts and their isolation. *USFCC Newsletter*, vol. 18,  
471 n. 4, p. 11-12, 1990.

472 ROSA, C.; PÉTER, G., Eds. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer-  
473 Verlag Berlin Heidelberg, 2006. 577p.

474 SIPICZKI, M. Dimorphic cycle in *Candida citri* sp. nov., a novel yeast species isolated  
475 from rotting fruit in Borneo. *FEMS Yeast Research*, vol.11, p.202-208, 2011.

476 STRAUS, M.L.A., et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic  
477 enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, vol.91,  
478 p.182-190, 2001.

479 TRINDADE R.C. *et al.* Yeast associated with fresh and frozen pulps of Brazilian  
480 tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology*, London, v. 25, p. 294-300, 2002.

481 WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. *Introduction to fungi*. Third edition. Cambridge  
482 University Press. Cambridge, UK, 2007.

483 YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Em  
484 *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4<sup>th</sup> Ed., p. 77-100. Editado por C.P. KURTZMAN & J.  
485 W. FELL. Amsterdam: Elsevier, 1998.

486

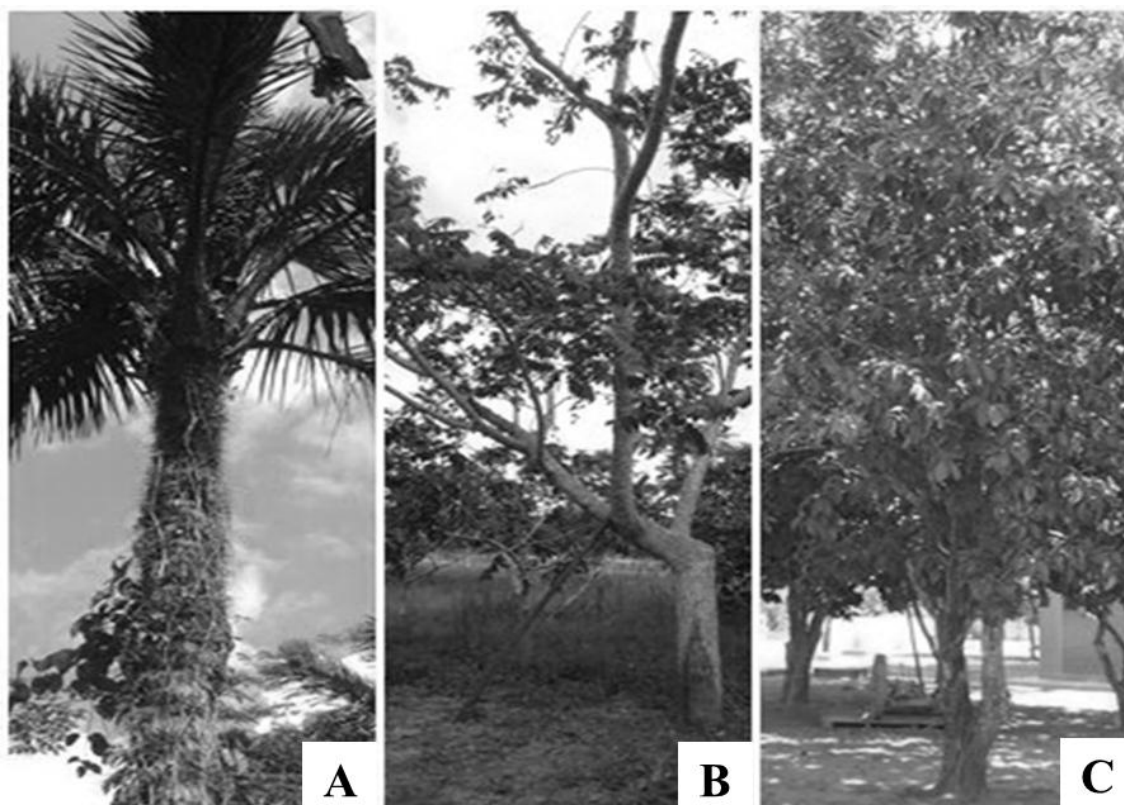


Figura 1. Exemplos de locais de coleta de frutos – (A) Arredores do Município de Itacoatiara – Tucumã; (B) Arredores do Município de Itacoatiara – Taperebá e (C) Itacoatiara/São Jorge – Abiu.

488

489

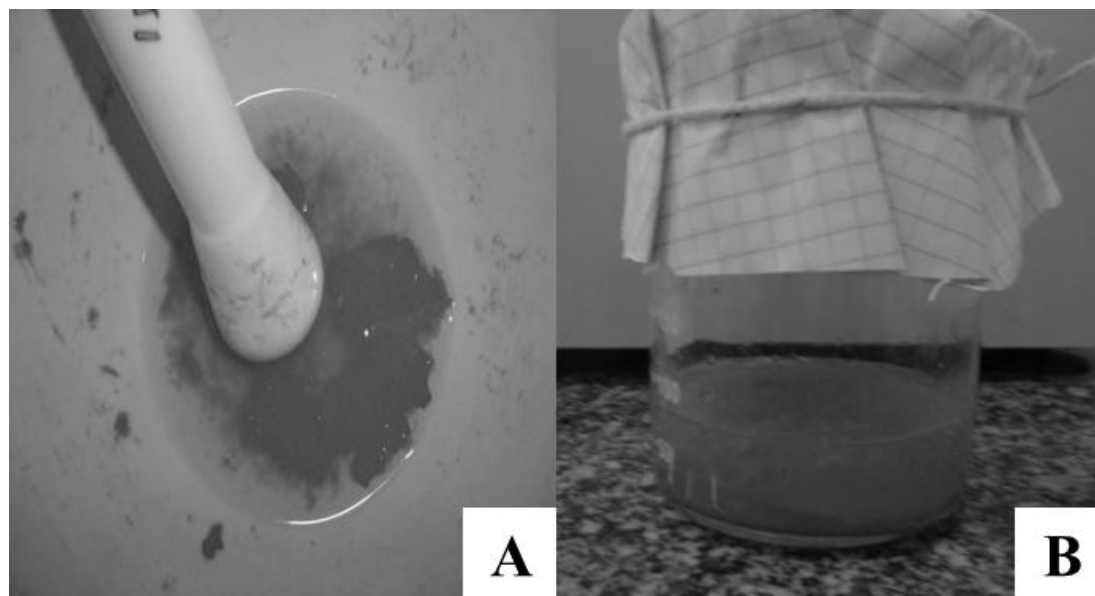


Figura 2. Isolamento das leveduras - (A) Fruto taperebá sendo macerado e (B) Mistura do fruto com água destilada estéril.

490

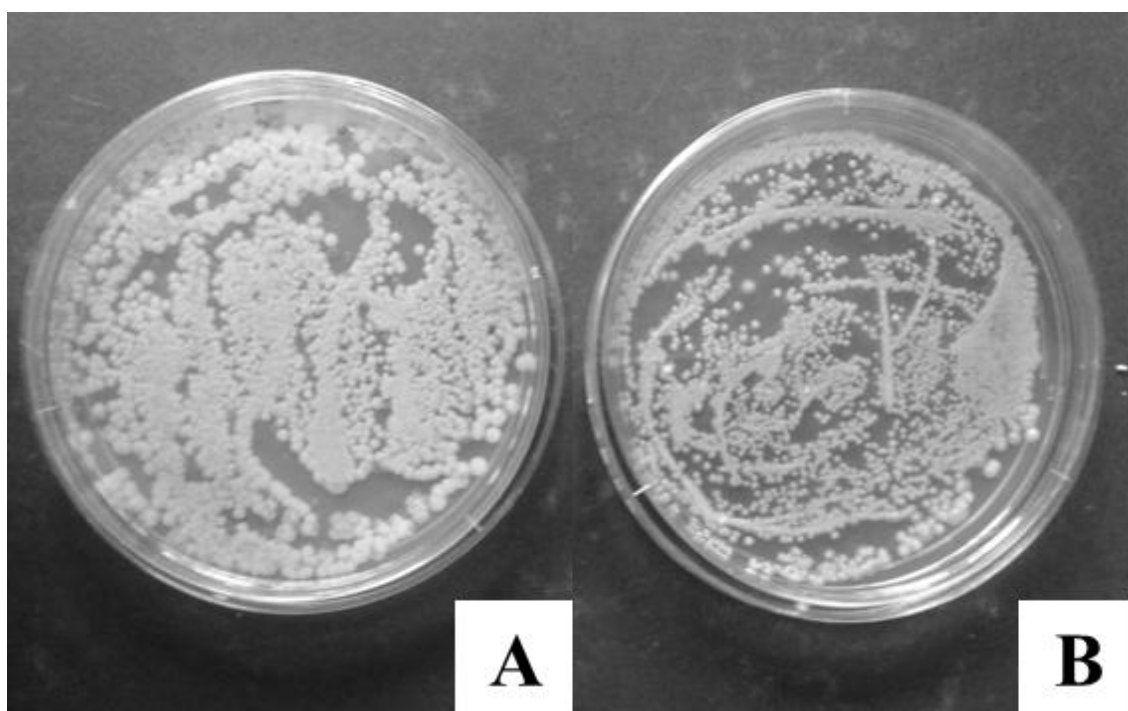


Figura 3. Crescimento de leveduras nos meios (A) Leveduras semeadas em meios diferentes. Leveduras no meio WLN e (B) ágar YEPG.

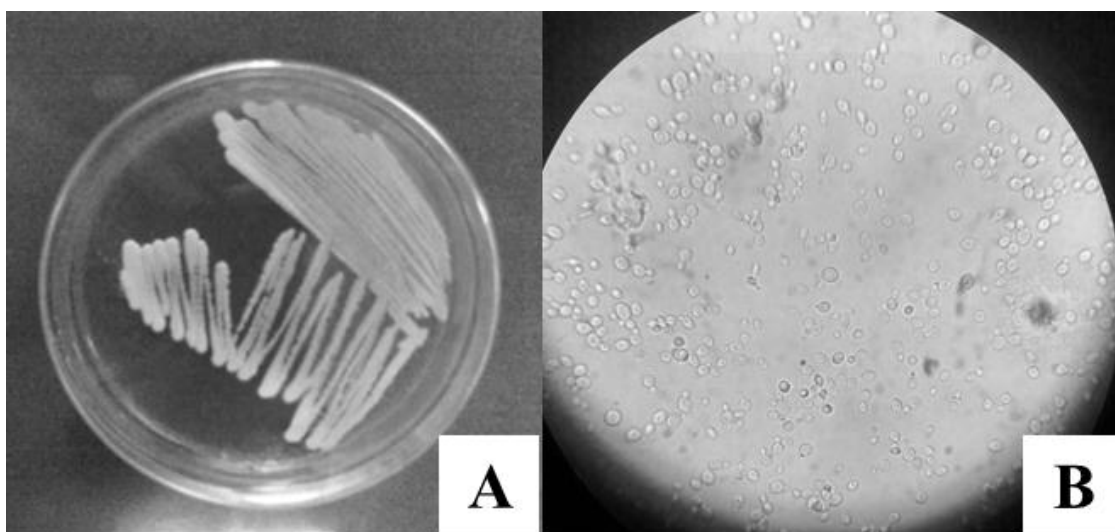


Figura 4. (A) Leveduras Isoladas. Morfologia Colonial Macroscópica; (B) Morfologia Colonial Microscópica (B).



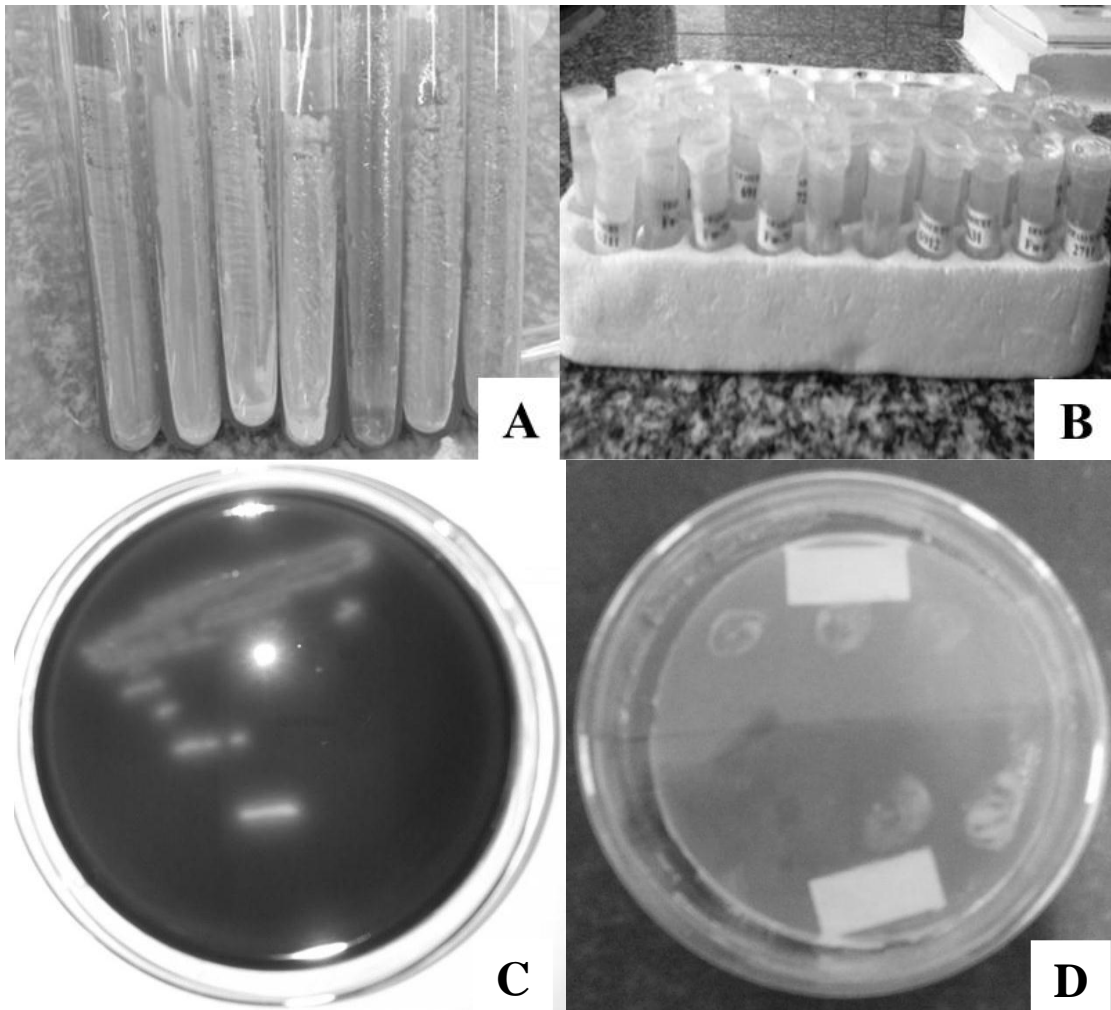
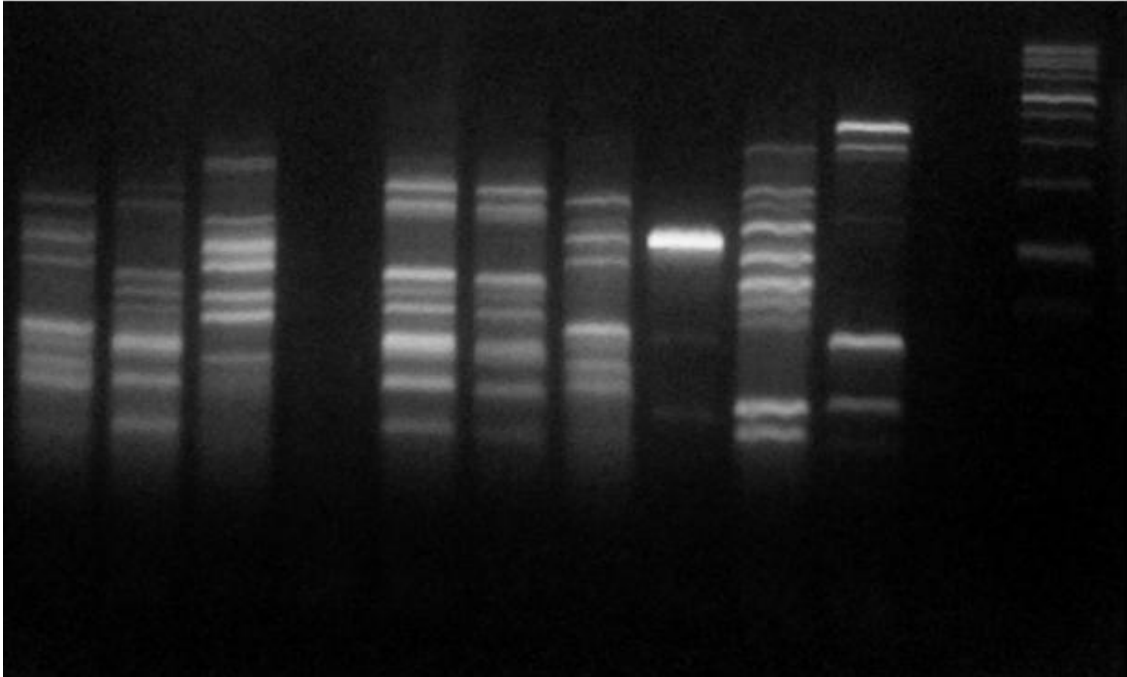


Figura 5. (A) Armazenamento dos isolados. Tubos com ágar YEPG inclinado; (B) Eppendorfs com caldo YEPG; (C) Produção de amilase, cepa Fw-6211 positiva para a produção de amido e (D) Termotolerância dos isolados a 50 °C (D).

W2414 B3117 7321 B3116 B3112 B3321 W1312 W5516 1422 B3215 Controle Marcador



496

497

| Figura 6. Resultados preliminares da caracterização molecular (PCR *fingerprinting*) de alguns isolados.

499 **Tabela 1.** Morfologia colonial dos isolados obtidos, margens regulares e superfícies  
500 lisas.

Cepa	Cor	Brilho	Forma	Elevação	Textura
<b>Fruto 3 – Caju (<i>Anacardium científica</i>)</b>					
Ft-3811	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
<b>Fruto 5 - Taperebá (<i>Spondias mombin</i> L)</b>					
Ft-5411	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Creмоса
Ft-5511	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Seca
Ft-5731	Branca	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-5431	Creme	Brilhante	Circular	Côncava	Seca
Fw-5731	Branca	Brilhante	Circular	Elevada	Seca
Fw-5811	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Creмоса
Fw-5812	Creme	Brilhante	Circular		Seca
<b>Fruto 6 – Cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal)</b>					
Ft-6911	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Seca
Fw-6211	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-6911	Branca	Brilhante	Circular	Elevada	Seca
Fw-6912	Bege	Opaca	Circular	Elevada	Seca
<b>Fruto 7 – Tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer)</b>					
Ft-7131	Creme	Brilhante	Circular	Côncava	Creмоса
Ft-7212	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Ft-7431	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Creмоса
Ft-7521	Bege	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Ft-7631	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Creмоса
Ft-7731	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Creмоса
Ft-7732	Bege	Brilhante	Circular	Reta	Creмоса
Ft-7831	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Creмоса
Ft-7911	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-7121	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-7211	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-7212	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-7331	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-7431	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Creмоса
Fw-7611	Creme	Brilhante	Circular	Elevada	Creмоса
Fw-7631	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-7711	Creme	Opaca	Circular	Côncava	Seca
Fw-7811	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca
Fw-7911	Creme	Opaca	Circular	Elevada	Seca

502 **Tabela 2.** Morfologia celular dos isolados obtidos, pelo tipo de reprodução brotamento  
 503 unipolar.

Cepa	Forma Celular	Hifa	Tipo de Ascospórios	Número de Ascospórios
<b>Fruto 3 – Caju (<i>Anacardium occidentale</i>)</b>				
Ft-3811	Globosa	Pseudo-hifa	Esféricos	4
<b>Fruto 5 - Taperebá (<i>Spondias mombin</i> L)</b>				
Ft-5411	Elipsoidal oval	Ausência	Esféricos	4
Ft-5511	Elipsoidal oval	Pseudo-hifa	Esféricos	4
Ft-5731	Elipsoidal oval	Ausência	Esféricos	4
Fw-5431	Elipsoidal oval	Ausência	Esféricos	4
Fw-5731	Globosa	Ausência	Esféricos	2
Fw-5811	Elipsoidal oval	Ausência	Esféricos	4
Fw-5812	Elipsoidal oval	Ausência	Esféricos	2
<b>Fruto 6 – Cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal)</b>				
Ft-6911	Elipsoidal oval	Ausência	Esféricos	2
Fw-6211	Elongada	Ausência	Esféricos	4
Fw-6911	Elipsoidal oval	Ausência	Esféricos	2
Fw-6912	Elipsoidal oval	Ausência	Ausente	-
<b>Fruto 7 – Tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer)</b>				
Ft-7131	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Ft-7212	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Ft-7431	Globosa	Pseudo-hifa	Esféricos	4
Ft-7521	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Ft-7631	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Ft-7731	Globosa	Pseudo-hifa	Esféricos	4
Ft-7732	Esférica	Ausência	Esféricos	4
Ft-7831	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Ft-7911	Globosa	Pseudo-hifa	Esféricos	4
Fw-7121	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Fw-7211	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Fw-7212	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Fw-7331	Esférica	Ausência	Esféricos	4
Fw-7431	Globosa	Hifa Verdadeira	Esféricos	2
Fw-7611	Globosa	Ausência	Esféricos	2
Fw-7631	Globosa	Pseudo-hifa	Esféricos	4
Fw-7711	Globosa	Ausência	Esféricos	4
Fw-7811	Globosa	Ausência	Esféricos	2
Fw-7911	Esférica	Pseudo-hifa	Esféricos	4

505 **Tabela 3.** Termotolerância dos isolados a 41 °C e 50 °C.

Cepa	41 °C	50 °C
<b>Fruto 3 – Caju (<i>Anacardium científica</i>)</b>		
3811	++	-
<b>Fruto 5 - Taperebá (<i>Spondias mombin</i> L)</b>		
Ft-5731	++	+
Fw-5431	++	+
Fw-5731	++	+
Fw-5811	++	-
<b>Fruto 6 – Cubiu (<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal)</b>		
Ft-6911	++	-
Fw-6211	++	-
<b>Fruto 7 – Tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer)</b>		
Ft-7131	++	+
Ft-7431	++	-
Ft-7521	++	-
Ft-7631	++	-
Ft-7731	++	+
Ft-7732	++	+
Ft-7831	++	+
Ft-7911	++	+
Fw-7121	++	-
Fw-7211	++	+
Fw-7331	++	+
Fw-7431	++	-
Fw-7611	++	-
Fw-7631	++	+
Fw-7711	++	-
Fw-7811	++	+
Fw-7911	++	+
<i>Legenda: ++, forte crescimento; +, crescimento positivo; -, crescimento negativo.</i>		

506

507

## 10. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Nº	Descrição	Ago 2012	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2013	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento bibliográfico	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	X
2	Coleta de amostras e isolamento de fungos	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x		
3	Identificação fenotípica dos isolados						x	X	x	x			
4	Avaliação do potencial biotecnológico dos isolados			x	x	x	x	X	x	x	x	x	
5	Envio de isolados de interesse para caracterização molecular										x	x	
6	Análise dos resultados								x	x	x	x	
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final. Preparação da Apresentação Final para o Congresso												X