

# **UFRB**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
BACHARELADO EM BIOLOGIA**

**THIARA TEIXEIRA SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DO POTENCIAL  
ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO  
AFLORAMENTO ROCHOSO DO MORRO DA PIONEIRA -  
BAHIA**

**CRUZ DAS ALMAS – BA**

**2012**

**THIARA TEIXEIRA SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DO POTENCIAL  
ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO  
AFLORAMENTO ROCHOSO DO MORRO DA PIONEIRA -  
BAHIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biologia do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Marcia Luciana Cazetta**  
**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca**

**CRUZ DAS ALMAS – BA**

**2012**

S237 Santos, Thiara Teixeira.  
Identificação e análise do potencial enzimático de leveduras isoladas do  
afloramento rochoso do Morro da Pioneira – Bahia /Thiara Teixeira Santos.\_  
Cruz das Almas - Ba, 2012.  
54 f.; il.

Orientadora: Marcia Luciana Cazetta  
Coorientador: Fernando Carlos Pagnocca

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.  
Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

1. Enzimas. Levedura. 2. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 572.7

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Gilvanete e Deodato, às minhas  
irmãs, Jady e Ladine, pelo apoio,  
amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

**À Deus, por me conceder a vida, por permitir que eu completasse mais uma etapa na minha caminhada, me dando forças para superar os momentos difíceis e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho!!**

**Agradeço a minha mãe, Gilvanete, ao meu pai, Deodato e às minhas irmãs, Jady e Ladine, por terem estado sempre presente, por serem meu porto seguro, pelo apoio constante, alegria, carinho e amor incondicional.**

**À Professora Dra. Marcia Luciana Cazetta pela paciência, apoio e dedicação disponibilizada na realização deste trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos, pela compreensão e por estar sempre disposta a solucionar as minhas dúvidas. Obrigada por ter sido minha orientadora ao longo desses anos, pela confiança e amizade. Obrigada por tudo!!**

**Ao Professor Dr. Fernando Carlos Pagnocca pela co-orientação e pelo auxílio.**

**Ao Professor André de Azevedo Neto, pela ajuda constante.**

**Aos Professores Fabiano Martins, Alessandra Caiafa e à Norma Barreto por terem ajudado na realização deste trabalho.**

**Às minhas amigas, Fernanda Borges, Tamires Almeida e Leila Leone, que mesmo longe estavam sempre me apoiando.**

**Aos colegas de laboratório: Juliana Mota, Tiago Freitas, Luana Oliveira, Carine Mascena, Ércia Xavier, Leonardo Caldas, Tiaguinho, Daniel, Barbara, Pedro Paulo, pelo incentivo, apoio e momentos de descontração enquanto desenvolvíamos nossos trabalhos.**

**Às pessoas especiais como Thayane Macêdo, Leila Bastos, Caroline Damasceno e Erika Tanan, que ao longo da graduação conquistaram a minha amizade.**

**Aos colegas da CCC (Coordenadoria de Contratos e Convênios – UFRB), pelo apoio, especialmente à Cristiano, Túlio e Marta, pela compreensão.**

**À Nívea Couto e Egidene Bittencourt, que de alguma forma também estiveram presente em diversos momentos durante essa jornada.**

**À todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente nessa caminhada.**

**MUITO OBRIGADA!!**

*"A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca  
penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência."*

Johan Wolfgang Von Goethe

## RESUMO

As leveduras são micro-organismos unicelulares que possuem ampla diversidade morfológica e bioquímica, presentes em diversos habitats da Terra, com alto potencial biotecnológico. O estudo da biodiversidade e a bioprospecção de novas fontes microbianas de ambientes inexplorados são de fundamental importância para a utilização desses micro-organismos em diversos setores econômicos, especialmente na produção de biocompostos com valor econômico agregado. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar leveduras isoladas do afloramento rochoso do Morro da Pioneira localizado na Serra da Jibóia, município de Santa Terezinha - Bahia, e analisar o seu potencial biotecnológico com relação à produção de enzimas de interesse industrial, bem como observar o crescimento em meios com alta concentração de sal e açúcar. As leveduras foram isoladas de flores e água de tanques de bromélias, por meio de técnicas clássicas, com o uso de meio seletivo. Os isolados foram estudados quanto à produção das enzimas celulase, amilase, inulinase e protease. Para a análise das atividades amilolíticas, celulolíticas e proteolíticas as leveduras foram plaqueadas em meio YP contendo 1% de amido, carboximetilcelulose e leite em pó desnatado (caseína), respectivamente, como únicas fontes de carbono e proteína. A capacidade de produção dessas enzimas foi avaliada pela medida do halo de hidrólise sobre a superfície dos meios. A produção de inulinase foi avaliada pelo plaqueamento das leveduras em meio YNB contendo inulina como única fonte de carbono e acompanhado o crescimento das colônias. Para analisar o crescimento em meios hipertônicos, as leveduras foram plaqueadas em meio YNB contendo 10% de NaCl e 5% de glicose e em meio contendo 50% de glicose. Para a identificação das espécies foram utilizados métodos tradicionais, através da morfologia celular e colonial e testes de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, bem como o Sistema de Identificação de Leveduras API 20 C AUX. Foi utilizado o método MSP-PCR para agrupamento das estirpes através do padrão de bandas. De acordo com a capacidade enzimática apresentada pelos morfotipos, 75% das leveduras apresentaram capacidade de crescer em inulina, 58% foram capazes de produzir a enzima amilase, 42% produziram protease e nenhuma das leveduras isoladas foi capaz de produzir a enzima celulase. Para tolerância osmofílica 83% cresceram em meio composto por 50% de glicose e 64% cresceram no meio NaCl 10% e glicose 5%. Os métodos utilizados para a identificação das leveduras permitiram identificar cinco espécies (*Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondi*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis* e *Cryptococcus laurenti*) e três isolados apenas ao nível de gênero (*Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Cryptococcus sp.*), podendo representar possíveis novos biótipos ou espécies novas.

**Palavras-chave:** bioprospecção, enzimas, osmotolerância.

## ABSTRACT

Yeasts are unicellular micro-organisms that have extensive biochemical and morphological diversity present in various habitats on Earth, with high biotechnological potential. The study of biodiversity and bioprospecting of new microbial sources of unexplored environments are essential for the use of these micro-organisms in various economic sectors, especially in the production of economic value added biocompostos. Thus, this study aimed to identify the yeasts isolated from the rocky outcrop of Morro da Pioneira located in the Serra da Jiboia, the city of Santa Terezinha, and analyze the potential of biotechnology in the production of enzymes of industrial interest, as well as observe the growth in media with high concentration of salt and sugar. The yeasts were isolated from flowers and water tanks of bromeliads, using classical techniques, with the use of selective medium. The isolates were studied for the production of cellulase enzymes, amylase, protease and inulinase. For the analysis of amyolytic activity, cellulolytic and proteolytic yeast cells were plated in YP medium containing 1% of starch, carboxymethyl cellulose and milk powder (casein), respectively, as sole source of carbon and protein. The production capacity of these enzymes was evaluated by measuring the hydrolysis halo on the surface of the media. Inulinase production was evaluated by plating the yeast in YNB medium containing inulin as sole carbon source and maintained the growth of colonies. To examine the growth in medium hypertonic, yeast cells were plated on YNB medium containing 10% NaCl and 5% glucose and medium containing 50% glucose. For species identification we used traditional methods, through the colonial and cellular morphology and assimilation tests of compounds of carbon and nitrogen as well as the yeast identification system API 20 C AUX. We used the MSP-PCR method for grouping the strains through the banding pattern. According to the capacity provided by the enzymatic morphotypes 75% of yeast were capable of growing in inulin, 58% were able to produce the enzyme amylase, protease and 42% produced no yeast isolates were capable of producing the cellulase enzyme. To 83% osmophilic tolerance grew in the media composed of 50% glucose and 64% grew in the media whit 10% NaCl 5% glucose. The methods used for identification of yeasts identified five species (*Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondi*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis* and *Cryptococcus Laurenti*) and only three isolates to genus (*Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* and *Cryptococcus sp.*) may represent potential new biotypes or new species.

**Keywords:** bioprospecting, enzymes, osmotolerance.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção enzimática de acordo com o tamanho do halo de hidrólise formado em meio sólido.....	25
Tabela 2: Resultado para crescimento dos isolados em inulina.....	32
Tabela 3: Medidas dos halos de hidrólise das leveduras isoladas do Morro da Pioneira para produção de amilase.....	33
Tabela 4: Medidas dos halos de hidrólise das leveduras isoladas do Morro da Pioneira para produção de protease.....	34
Tabela 5: Crescimento das leveduras em meio NaCl 10% e Glicose 5% e meio Glicose 50%.....	36
Tabela 6: Agrupamento das estirpes isoladas do Afloramento Rochoso do Morro da Pioneira com base nas características morfológicas das colônias e células.....	37
Tabela 7: Identificação dos isolados pelo Sistema de Identificação de Leveduras API 20 C AUX.....	39
Tabela 8: Assimilação de compostos de carbono e nitrogênio pelas estirpes.....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.: Localização da Serra da Jibóia no estado da Bahia.....	20
Figura 2.: Estirpes de leveduras positivas (com formação de halo de hidrólise) e negativas (sem halo de hidrólise) para produção de amilase.....	24
Figura 3.: Formação de halo de hidrólise característico de micro-organismos produtores de celulase.....	24
Figura 4.: Formação de halo de hidrólise por proteases em meio composto por leite em pó...25	
Figura 5.: Estirpes de leveduras isoladas do afloramento rochoso do Morro da Pioneira.....	30
Figura 6.: Produção de enzimas pelos isolados do Morro da Pioneira.....	32
Figura 7.: Resultado negativo para produção de celulase.....	35
Figura 8.: MSP-PCR das leveduras isoladas do Afloramento Rochoso do Morro da Pioneira.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CEIS:** Centro de Estudos de Insetos Sociais
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- dNTPs:** Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Magnésio
- MSP:** Metilação específica
- NaCl:** Cloreto de Sódio
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato monossódico
- PCR:** Reação em cadeia da polimerase
- pH:** Potencial hidrogeniônico
- SDS:** Dodecil sulfato de sódio
- UNESP:** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- YMA:** Yeast malt agar
- YNB:** Yeast nitrogen base

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1.INTRODUÇÃO.....	14
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1.Fungos.....	15
2.2.Leveduras.....	16
2.3.Enzimas.....	17
2.4. Tolerância a fatores de estresse.....	19
2.5.Serra da Jibóia - Morro da Poneira.....	20
3.OBJETIVOS.....	22
3.1.Objetivos Gerais.....	22
3.2.Objetivos Específicos.....	22
4.METODOLOGIA.....	23
4.1. Isolamento.....	23
4.2. Estudo da produção de diferentes enzimas pelos isolados.....	23
4.2.1. Atividade amilolítica, celulolítica e proteolítica.....	23
4.2.2. Atividade inulolítica.....	26
4.3. Crescimento dos isolados em meios hipertônicos.....	26
4.4. Assimilação de etanol.....	27
4.5. Produção extracelular de compostos amilóides.....	27
4.6. Taxonomia convencional de leveduras.....	27
4.7. Agrupamento das estirpes por microsátélites (MSP-PCR).....	28
4.8. Identificação das leveduras pelo Sistema API 20 C AUX.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30

5.1. Isolamento.....	30
5.2. Atividade enzimática.....	31
5.3. Crescimento das leveduras em meios hipertônicos.....	36
5.4. Identificação dos isolados.....	37
5.4.1. Agrupamento por características morfológicas.....	37
5.4.2. Agrupamento dos isolados através do Método MSP – PCR.....	38
5.4.3. Identificação dos isolados através do Sistema API 20 C AUX.....	39
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	44
ANEXO I.....	54

## 1. INTRODUÇÃO

O Reino Fungi compreende um grupo de organismos eucariotos, heterotróficos, com ampla distribuição espacial, composto por seres unicelulares, como as leveduras, e por seres pluricelulares, como os fungos filamentosos. As leveduras são fungos caracteristicamente ovais, esféricos ou triangulares, naturalmente encontrados em frutos ou em substratos com grande disponibilidade de matéria orgânica, especialmente açúcares. Apresentam importância econômica, sendo utilizadas por diversos setores comerciais, devido à produção de compostos microbianos de grande interesse industrial, como na produção de alimentos, enzimas, produtos farmacêuticos, biocombustíveis, entre outros. Entretanto, a capacidade em se adaptarem e resistirem a condições de estresse é o que permite o sucesso da aplicação desses micro-organismos nos diversos setores industriais.

Atualmente, é grande o interesse em obter leveduras de ambientes naturais para a utilização em processos industriais. Entretanto, no Brasil, apesar da grande biodiversidade, poucos são os trabalhos com esse enfoque. O Recôncavo da Bahia, por exemplo, é uma região que abriga uma grande variedade de espécies constituintes da fauna e flora. Contudo, apesar desta região apresentar grandes dimensões territoriais, existem poucos estudos no que diz respeito à composição da biodiversidade, especialmente com relação ao levantamento de espécies microbianas (procariotos e eucariotos), bem como seu potencial biotecnológico na produção de biocompostos.

A Serra da Jibóia, localizada no Recôncavo Sul da Bahia, caracteriza-se por apresentar uma grande diversidade de flores e frutos nativos, incluindo várias espécies de bromélias e orquídeas, sendo um local ideal para a bioprospecção e o estudo de comunidades de leveduras. Essa região, embora composta de vários tipos de vegetação, tem sido pouco explorada cientificamente, especialmente do ponto de vista microbiano.

Assim, devido à notória presença das leveduras na natureza, bem como a sua importância nos diversos setores econômicos, esse trabalho teve como objetivo identificar leveduras isoladas de flores e água de tanque de bromélias existentes no afloramento rochoso do Morro da Pioneira, na região da Serra da Jibóia – BA, e observar o seu potencial biotecnológico na produção de diferentes enzimas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

Os micro-organismos são os menores seres vivos encontrados na natureza, podendo ser localizados em praticamente todos os nichos da Terra. São responsáveis por manterem a estabilidade dos ecossistemas, a ciclagem dos elementos minerais e a degradação de poluentes no ambiente (TORTORA et al., 2005). Atualmente, o grande interesse na utilização dos micro-organismos para solucionar problemas nos diversos setores industriais, ambientais e na área da saúde, tem tornado a bioprospecção e o conhecimento de novas fontes microbiológicas uns dos focos principais da era biotecnológica (OLIVEIRA et al., 2006).

### **2.1. Fungos**

Os fungos caracterizam-se por serem micro-organismos eucarióticos, heterotróficos, com mais de 70.000 espécies identificadas, sendo estimado em um milhão e quinhentas mil espécies, distribuídas por diversos ambientes. Apresentam importância na natureza como um dos principais seres decompositores e destacam-se nas áreas médica e econômica, como patógenos, pragas e produtores de metabólitos de interesse industrial (RAVEN et al., 2007).

Durante muito tempo, os fungos foram classificados como vegetais, entretanto esses micro-organismos apresentam diversas características que os diferem das plantas: não sintetizam clorofila; a parede celular da maioria é composta por quitina e não celulose (com exceção de alguns fungos de ambientes aquáticos), e não armazenam amido como substância de reserva, mas glicogênio. Assim, a partir de 1969, os fungos passaram a constituir um reino à parte, o Reino Fungi (TRABULSI, 2004), compreendendo um grupo diverso, incluindo as leveduras (unicelulares), os bolores e os cogumelos (pluricelulares).

Segundo Trabulsi (2004), por não sintetizarem clorofila, esses organismos sobrevivem em estado de parasitismo, saprofitismo e simbiose no meio ambiente. Os fungos saprófitos vivem em substratos contendo matéria orgânica, muitas delas em decomposição, na água e no solo. Os parasitas vivem no interior e na superfície de vegetais e animais, nutrindo-se de substâncias provenientes de células vivas, já os simbiotes se associam a outros organismos e vivem em perfeita harmonia, prestando mútua ajuda em diversas funções.

## 2.2. Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, arredondadas, alongadas ou ovais, caracterizadas por se reproduzirem assexuadamente por brotamento ou fissão binária e, ao contrário dos fungos filamentosos, não apresentam corpo de frutificação (TORTORA et al., 2005). São micro-organismos que possuem notável diversidade metabólica e bioquímica, capazes de assimilar variados compostos orgânicos, garantindo grande capacidade de dispersão e adaptação a diferentes ecossistemas (PHAFF e STARMER, 1987). Em função disto, as leveduras apresentam uma ampla distribuição ao redor do mundo, podendo ser encontradas em diferentes ambientes e climas.

Atualmente mais de 600 espécies de leveduras já foram identificadas, distribuídas em 80 gêneros (RAVEN et al., 2007), podendo ser encontradas nos filos Ascomycota e Basidiomycota, além de estarem presente no agrupamento artificial conhecido como Deuteromicetos (WALKER, 1998), o qual é composto por fungos onde a reprodução sexuada é desconhecida (TRABULSI, 2004; TORTORA et al., 2005). Normalmente, as espécies de leveduras basidiomicéticas são encontradas em substratos compostos por substâncias mais complexas, como no solo e nas folhas, já as ascomicéticas são encontradas em substratos compostos principalmente por açúcares simples, como nos frutos (SANTOS et al., 1997).

As leveduras podem ser isoladas de ambientes terrestres, aquáticos ou aéreos, e estão constantemente associadas a vegetais (WALKER, 1998; FERNANDES, 2008), podendo ser encontradas em flores, folhas, frutos e exsudatos de árvores, interagindo de forma saprofítica. Tal relação ocorre porque as plantas representam excelentes habitats para esses micro-organismos, oferecendo uma grande disponibilidade de compostos orgânicos, resultantes das secreções das próprias plantas, além das deposições feitas pela ação do vento, chuva, insetos ou outros organismos (LANDELL, 2006). As leveduras ainda podem ser isoladas da água de mares, rios e lagos, da pele e do intestino de animais, em ambientes com altas concentrações de sal e açúcar (WALKER, 1998) na superfície externa de abelhas, moscas de frutas (*Drosophila*), borboletas, mariposas e inúmeros outros habitats (RUIVO, 2005).

Diversos estudos realizados sobre o substrato em que as leveduras ocorrem têm demonstrado que estas se desenvolvem em habitats bastante especializados (MORAES e ROSA, 2000). A alta especificidade percebida entre as leveduras e seus microhabitats pode ser influenciada por vetores, responsáveis por promoverem a dispersão de algumas espécies de leveduras, e por características próprias do habitat (ARAUJO et al., 1998), como a composição de nutrientes presentes no substrato, a presença ou ausência de compostos



inibitórios (MORAIS e ROSA, 2000), além da variação do pH, temperatura, atividade de água e oxigênio (FERNANDES, 2008). Os frutos, por exemplo, são excelentes microhabitats para uma variedade de espécies de leveduras na natureza, devido principalmente à alta concentração de açúcar e pH ácido (LACHANCE e STARMER, 1998).

Há milhares de anos, as leveduras têm sido utilizadas pelo homem em processos fermentativos (FUENTEFRÍA, 2004; MAUTONE, 2008). Atualmente, produtos biotecnológicos produzidos por leveduras são aplicados nos mais diversos setores comerciais, como em indústrias químicas, têxtil, alimentos, biocombustíveis, enzimas industriais e produtos farmacêuticos (WALKER, 1998; FUENTEFRÍA, 2004). No entanto, algumas indústrias têm preferido leveduras isoladas diretamente de ambientes naturais, por serem mais facilmente aceitas para a comercialização (FUENTEFRÍA, 2004).

### **2.3. Enzimas**

As enzimas são proteínas catalisadoras, responsáveis por aumentar a velocidade das reações químicas, sem sofrerem nenhum tipo de alteração durante a sua atividade (CHAMPE et al., 2006). Seu poder catalítico é frequentemente maior do que dos catalisadores não-biológicos, além de possuírem um alto grau de especificidade com os seus substratos, apresentando um ótimo funcionamento em condições moderadas de pH e temperatura (NELSON e COX, 2004).

Trabalhos referentes às enzimas datam do final do ano de 1700 e, atualmente, estudos sobre esses catalisadores biológicos apresentam importância prática nas áreas médicas, nas indústrias químicas, na fabricação de alimentos e na agricultura (NELSON e COX, 2004). As enzimas podem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas e animais, entretanto as de origem microbiana têm sido mais utilizadas nos setores industriais (GUPTA et. al, 2003) devido, especialmente, às facilidades econômica e operacional, quando comparado à extração em outras fontes, e, sobretudo, à ampla diversidade de moléculas encontrada nos micro-organismos (ZILLI et al., 2010).

Os fungos são capazes de produzir uma ampla variedade de enzimas utilizadas em processos bioquímicos que ocorrem nas próprias células. Tais enzimas são capazes de hidrolisar nutrientes e moléculas insolúveis como o amido, a celulose e as proteínas e transformá-los em substâncias responsáveis por promoverem o crescimento celular. As principais enzimas produzidas e utilizadas pelos fungos são: amilases, lipases, invertases,

lactases, proteinases, entre outras (TRABULSI, 2004). Atualmente, estudos utilizando as leveduras como produtoras de enzimas de interesse industrial têm sido bastante apreciados, devido, principalmente, a sua versatilidade metabólica, facilidade de cultivo, além de serem menos propícias a contaminação e apresentarem menos risco a saúde pública (LOCK, 2007).

A inulinase, por exemplo, é uma enzima importante na produção de xarope de frutose a partir da hidrólise enzimática da inulina (VERACHTERT e DE MOT, 1990) e é também utilizada na produção de oligossacarídeos (KIM et al., 1997), os quais apresentam grande aplicação na indústria de alimentos. A conversão de inulina em frutose utilizando a inulinase ocorre em uma única etapa, e apresenta um rendimento superior a 95%, obtendo um produto de boa qualidade quando comparado a outros métodos para a produção de xarope de frutose (VERACHTERT e DE MOT, 1990). Inicialmente, para a degradação de inulina, as enzimas utilizadas eram de origem vegetal, porém a quantidade obtida era insuficiente para ser usada comercialmente. Atualmente, a produção microbiana de inulinases têm se tornado mais viáveis, o que tem elevado o interesse por esta enzima (PESSONI et al., 2004), sendo as leveduras os organismos mais promissores para a sua produção (PAULA, 2007).

Na natureza inúmeros micro-organismos possuem a capacidade de produzir enzimas celulolíticas, porém, apenas alguns são eficazes na conversão de celulose a glicose (ROBSON e CHAMBLISS, 1989). Essas enzimas são utilizadas em vários processos nas indústrias alimentícias, têxtil, de papel, farmacêutica, bebidas, entre outros. Recentemente, esta enzima tem recebido grande atenção de pesquisadores devido à sua utilização no processo de hidrólise enzimática para a produção de etanol utilizando resíduos industriais como substrato (SILVA, 2008; SHIOTA et al., 2010).

Amilases são enzimas que se encontram amplamente distribuídas na natureza, responsáveis pela degradação da molécula de amido, com grande importância biotecnológica, sendo utilizada em diversos setores industriais. Atualmente, amilases de origem microbiana estão disponíveis comercialmente em grandes quantidades, com aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento desse carboidrato (GUPTA et al., 2003). Segundo Gundllapalli et al. (2002), apesar da amilase ser produzida, na sua maioria, por fungos filamentosos, várias espécies de leveduras foram identificadas como produtoras dessa enzima.

As proteases representam 60% das enzimas industriais (KUMAR et al., 2005), podem ter origem vegetal, animal ou microbiana (RODRIGUES e SANT'ANNA, 2001) e são utilizadas em diversas atividades, como na produção de bebidas, processamento de alimentos, fabricação de detergentes, processamento de couro e pele, na produção de fármacos, entre

outros (SOARES et al., 1999). São encontradas em diversos micro-organismos, como em bactérias, vírus, bolores e leveduras (FUENTEFRIA, 2004). Atualmente, diversos estudos têm comprovado a produção dessa enzima por muitas espécies de leveduras em quantidade significativas (LANDELL, 2006; SILVA NEVES, 2006; MAUTONE, 2008).

#### **2.4. Tolerância a fatores de estresse**

Uma das características mais impressionantes da vida na Terra é a capacidade que os organismos têm em se adaptarem as mais diversas condições ambientais. A adaptação dos micro-organismos às condições ambientais adversas obrigou-os a desenvolverem estruturas celulares e estratégias bioquímicas capazes de garantir a sua sobrevivência (SANTOS et al., 2001).

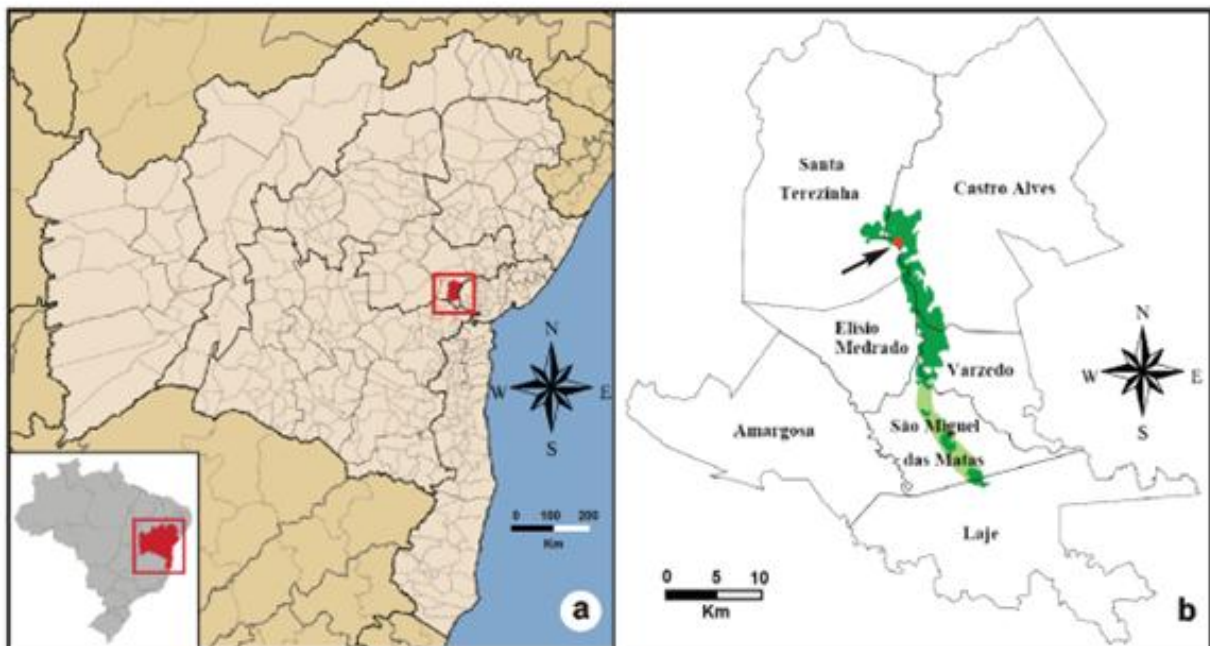
As leveduras estão suscetíveis a uma variedade de estresses, sejam físicos, químicos ou biológicos, tanto em ambientes naturais quanto em processos industriais (FOLCH-MALLOL, et. al, 2004). Entretanto, diversas linhagens de micro-organismos conseguem se adaptar às condições adversas por meio de respostas adaptativas, capazes de proteger estruturas celulares essenciais, reparar danos e permitir que a célula volte a sua condição normal durante o período de recuperação (MELO, 2006; MONACO, 2007).

Diversos mecanismos são utilizados pelas leveduras como resposta aos fatores de estresse: aumento da concentração de trealose nas células; produção de proteínas do choque térmico; aumento do nível de glicerol intracelular; alteração nas trocas iônicas e no arranjo lipídico da membrana plasmática (BIRCH e WALKER, 2000). Contudo, o tipo de resposta apresentado pelas leveduras, bem como a intensidade dos danos causados dependem do estado fisiológico ao qual se apresentavam as estirpes durante a exposição às injúrias, o tipo de estresse e a sua intensidade (BIRCH e WALKER, 2000; FOLCH-MALLOL, et. al, 2004).

Normalmente, as leveduras utilizadas em processos industriais possuem osmotolerância limitada (SALMON e MAURICIO, 1994), sendo que o aumento da osmolaridade externa promove a redução da taxa de crescimento e a perda de viabilidade das células (MAGER e VARELA, 1993). Segundo Estruch (2000), quando as células de leveduras são expostas ao estresse osmótico, estas perdem água e iniciam uma série de mecanismos de tolerância, envolvidos principalmente na síntese de trealose e glicerol, com a finalidade de evitar a desidratação e proteger as estruturas celulares essenciais.

## 2.5. Serra da Jibóia - Morro da Pioneira

A Serra da Jibóia, localizada na região do Recôncavo Sul da Bahia, é constituída por um conjunto de morros (Pioneira, Monte Cruzeiro, Oiti, Água Branca, entre outros) (JUNCÁ e BORGES, 2002) situados entre os domínios de Mata Atlântica e Caatinga (AB'SABER, 1977) com 6 km de extensão (Figura 1), apresentando como tipos vegetacionais trechos de caatinga na base dos morros, mata higrófila nas encostas e, nos topos, afloramento rochoso de origem gnáissico-granítica (VALENTE e PORTO, 2006), no qual se desenvolve uma vegetação de campo rupestre (QUEIROZ et al., 1996). Essa formação vegetal está tipicamente associada a áreas montanhosas, possuindo uma fisionomia variável, influenciada pelo microclima, topografia e solo local, se desenvolvendo em áreas relativamente pequenas (HARLEY, 1988).



**Figura 1:** Localização da Serra da Jibóia no estado da Bahia. Fonte: RAMOS et al., 2011 baseado em NEVE, 2005.

Atualmente, alguns estudos têm sido realizados com a finalidade de ampliar o conhecimento sobre a fauna e flora que compõe a região da Serra da Jibóia (JUNCÁ, 2006; COSTA NETO, 2007; VALENTE et al., 2009; RAMOS et al., 2011). Trabalhos referentes a diversidades de fungos dessa região são recentes e com ênfase em fungos conidiais filamentosos associados à decomposição de matéria orgânica. Marques et al. (2007), por

exemplo, ao estudarem as espécies de fungos conidiais lignícolas no Morro da Pioneira, na Serra da Jibóia, obtiveram 32 espécies, sendo que 18 dessas correspondem a novos registros para o Brasil. Outros trabalhos têm registrado um grande número de espécies fúngicas identificadas nessa região, demonstrando que a Serra da Jibóia representa um ambiente propício para o desenvolvimento de uma ampla diversidade de fungos (MARQUES et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; LEÃO - FERREIRA et al., 2009). O estudo da microbiota dessa região, além de ser essencial para compor a taxonomia das populações que ali se desenvolvem, é importante por poder revelar possíveis novas fontes de compostos de interesse biotecnológico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVOS GERAIS**

Identificar e avaliar o potencial enzimático de leveduras isoladas do afloramento rochoso do Morro da Pioneira, localizado na Serra da Jibóia, município de Santa Terezinha, Bahia.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar o potencial enzimático das leveduras isoladas, quanto à produção das enzimas: amilase, protease, celulase e inulinase.
- Observar o crescimento dos isolados em meios hipertônicos.
- Identificar as leveduras isoladas por meio de métodos morfológicos e bioquímicos.
- Criar um banco de leveduras provenientes da região do Recôncavo Baiano.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Isolamento

As estirpes de leveduras utilizadas nesse trabalho foram previamente isoladas de flores e água de tanques de bromélias existentes no afloramento rochoso do Morro da Pioneira, na região da Serra da Jibóia, Município de Santa Terezinha, Bahia, pela Professora Marcia Luciana Cazetta, utilizando técnicas clássicas descritas em Kurtzman e Fell (1998) e Barnett (2000), através de meios seletivos. Após purificação, cada morfotipo foi armazenado em tubos com tampa de rosca contendo solução de glicerol a 20% sob temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2. Estudo da produção de diferentes enzimas pelos isolados

#### 4.2.1 Atividade amilolítica, celulolítica e proteolítica

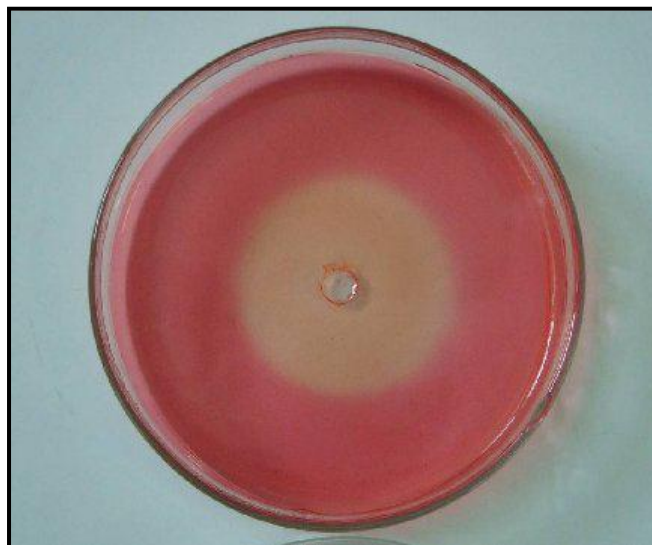
A fim de avaliar a produção das enzimas celulase, amilase e protease as leveduras isoladas foram plaqueadas, com o auxílio da alça de inoculação, na superfície do meio YP (extrato de levedura 1%, peptona 2% e ágar 1,5%) contendo 1% de carboximetilcelulose e amido como únicas fontes de carbono e leite em pó como fonte de proteína, respectivamente, em quadruplicata, durante 5 a 8 dias, a temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**Atividade Amilolítica** – A capacidade de degradar amido foi usada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas. Após o período de incubação, acrescentou-se solução de lugol (Iodo Metálico 1% + Iodeto de Potássio 2%) às placas e observou-se a formação de zona de hidrólise ao redor da colônia de levedura considerada positiva para a produção de amilase, o restante do meio, onde não houve a degradação de amido, a coloração permaneceu violeta (Figura 2.).



**Figura 2.** Estirpes de leveduras positivas (com formação de halo de hidrólise) e negativas (sem halo de hidrólise) para produção de amilase.

*Atividade Celulolítica* – Após o período de incubação, foram adicionados às placas aproximadamente 5 mL de solução corante vermelho congo a 1%. Após 15 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com solução salina a 0,85%. Esse procedimento permite a revelação, no meio de cultura, do halo de degradação do substrato proporcionado pela atividade da celulase (Figura 3.).



**Figura 3.** Formação de halo de hidrólise característico de micro-organismos produtores de celulase. (FONTE: CRUZ et al., 2011).



**Atividade Proteolítica** – A capacidade de degradar a proteína do leite em pó (caseína) pelas leveduras é utilizada para avaliar a produção de enzimas proteolíticas. Após o período de incubação, as leveduras produtoras dessa enzima apresentaram em volta da colônia um halo transparente indicando a hidrólise das proteínas (Figura 4.).



**Figura 4.** Formação de halo de hidrólise por proteases em meio composto por leite em pó.

Posteriormente, os halos formados e o tamanho das colônias foram medidos e os resultados expressos pela média dos crescimentos. Os limites para os tamanhos dos halos de degradação das enzimas amilase e protease foram estabelecidos segundo Mautone (2008), e os halos de degradação para celulase foram estabelecidos segundo Fuentesfria (2004) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Produção enzimática de acordo com o tamanho do halo de hidrólise formado em meio sólido.

<b>Enzimas</b>	<b>Negativo</b> (-)	<b>Produção Fraca</b> (w)	<b>Produção Intermediária</b> (+)	<b>Produção Forte</b> (++)
Amilase	Halo = 0	Halo $\leq$ 1,5 cm	1,5cm < halo < 2,4 cm	Halo $\geq$ 2,5 cm
Protease	Halo = 0	Halo $\leq$ 0,5 cm	0,5cm < halo < 0,9 cm	Halo $\geq$ 1,0 cm
Celulase	Halo = 0	Halo $\leq$ 1,5 cm	1,5cm < halo < 3,0 cm	Halo $\geq$ 3,0 cm

O Índice Enzimático (IE) foi determinado pelo método utilizado por Cruz et al., (2011), o qual consiste em relacionar o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia. As leveduras com IE igual ou superior a 2,0 foram classificadas com habilidade para produção das enzimas estudadas (STAMFORD et al., 1998).

#### **4.2.2 Atividade inulolítica**

Para a análise da produção da enzima inulinase, as leveduras isoladas foram plaqueadas na superfície do meio GYMP (glicose 2%, extrato de malte 1%, extrato de levedura 0,5%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2% e ágar 2%) e incubadas durante 48 horas a temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após o período de incubação, as colônias foram transferidas, com o auxílio da alça de inoculação, para 500µl de solução salina a 0,85% e posteriormente inoculadas em meio seletivo contendo 0,67% de YNB (yeast nitrogen base), 0,5% de inulina e 2% de ágar. As placas foram incubadas durante 5 dias, a temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após o período de incubação observou-se o crescimento da colônia e comparou-se aos controles positivos (meio YNB com 0,5% glicose) e negativos (meio YNB sem fonte de carbono) e os resultados foram classificados como negativos (-), fraca atividade (w), atividade intermediária (+) e forte atividade (++) .

#### **4.3. Crescimento dos isolados em meios hipertônicos**

Com a finalidade de avaliar a tolerância a alta concentração de cloreto de sódio e glicose, as leveduras foram plaqueadas na superfície do meio GYMP e incubadas durante 48 horas a temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após o período de incubação, as colônias foram transferidas, com o auxílio da alça de inoculação, para 500µl de solução salina a 0,85% e posteriormente inoculadas em meio contendo 0,67% de YNB, 10% de NaCl, 5% glicose e 2% de ágar e para o teste de tolerância a glicose 50%, os isolados foram transferidos para o meio contendo 0,67% de YNB, 50% de glicose e 2% de ágar, e incubadas durante 5 dias a temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após o período de incubação os resultados foram considerados como negativo (-), fraco (w), positivo (+), quando comparados aos controles positivo (meio YNB com 0,5% glicose) e negativo (meio YNB sem fonte de carbono).

#### **4.4. Assimilação de etanol**

Para análise da assimilação de etanol as leveduras foram plaqueadas na superfície do meio GYMP e incubadas durante 48 horas a temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após o período de incubação, as colônias foram transferidas, com o auxílio da alça de inoculação, para 500µl de solução salina a 0,85% e posteriormente transferidas para o meio contendo 0,67% de YNB, 2% de ágar e acrescentado aproximadamente 1,5ml de álcool etílico 95% como fonte de carbono, e incubados durante 5 dias a temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após incubação os resultados foram considerados como negativo (-), fraco (w), positivo (+), quando comparados aos controles positivo (meio YNB com 0,5% glicose) e negativo (meio YNB sem fonte de carbono).

#### **4.5. Produção extracelular de compostos amilóides**

Para avaliar a capacidade de produzir compostos polissacarídeos amilóides pelos isolados, adicionou-se solução de iodo a uma placa de Petri contendo o crescimento leveduriforme após 21 dias em meio composto por glicose 0,5%, YNB 0,67% e ágar 2% (YARROW, 1998). O resultado positivo foi evidenciado pela formação de um halo azulado ao redor da colônia, devido à reação do composto amilóide com a solução de iodo.

#### **4.6. Taxonomia convencional de leveduras**

As estirpes foram agrupadas por meio de estudo polifásico, utilizando métodos tradicionais, que incluem a observação da morfologia celular e colonial e testes de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio (YARROW, 1998). Assim, para a classificação morfológica, os isolados foram separados em grupos de acordo com suas características coloniais e celulares. As características coloniais observadas foram: pigmentação (vermelha, branca, creme), textura (rugosa, lisa) e brilho (brilhante, opaca). Para a morfologia celular foram realizadas lâminas a partir do crescimento dos isolados em meio GYMP, com aproximadamente 48 horas de crescimento, em temperatura de  $27 \pm 2$  °C, e a observação realizada em microscopia óptica. As características celulares observadas foram o

formato celular (ovóide, redonda e alongada) e tipo de brotamento (multipolar, bipolar e unipolar).

Para os testes bioquímicos as leveduras foram plaqueadas na superfície do meio GYMP e incubadas durante 48 horas a temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após o período de incubação, as colônias foram transferidas para 500µl de solução salina a 0,85% e posteriormente transferidas para placas de Petri contendo meio composto por 0,67% de YNB, 2% de ágar e 0,5% das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas (glicose, galactose, sacarose, maltose, xilose, L-arabinose, D-arabinose, ribose, metanol, glicerol, salicina, ácido láctico, citrato, hexadecano, ácido sacárico, xilitol, ácido galacturônico e nitrato).

#### **4.7. Agrupamento das estirpes por microsátélites (MSP-PCR)**

As extrações de DNA foram realizadas pela Professora Marcia Luciana Cazetta no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), na UNESP de Rio Claro, utilizando-se o protocolo modificado por Sampaio et al. (2001) e Almeida (2005). Para isso, duas alçadas da levedura cultivada em meio ágar YMA por 48 horas a 25 °C foram suspensas em 500µL do tampão de lise TNES (50 mmol Tris l-1; 250 mmol de NaCl l-1; 50 mmol EDTA l-1; 0,3%, p/v, SDS; pH 8). Em seguida, foram agitados em vórtex por 4 minutos e incubados por 1 hora a 65 °C. Em seguida o material foi centrifugado por 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante (~400µL), o qual continha o DNA genômico bruto, foi separado e armazenado em tubos de 1,5mL a -20° C, e utilizado para realização do MSP-PCR.

As estirpes foram agrupadas pelo método de “fingerprinting” utilizando-se microsátélites (MSP-PCR) de acordo com Meyer et al. (1993). Nesta etapa, misturou-se 4,0 µL de dNTPs (1,25mM de cada base), 2,5 µl de tampão 10X, 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,2 µL de Taq-polimerase (5 U/µL), 10,3 µL de água Milli-q estéril, 2,0 µL do primer (GTG)<sub>5</sub> e 5 µL de DNA (diluído 750 vezes). O programa utilizado no termociclador (PTC-100 TM Programmable Thermal Controller) para a amplificação foi 95 °C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos a 93 °C por 45 segundos, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, com a extensão final de 72°C por 6 minutos.

Para verificar o padrão de bandas, realizou-se uma corrida em gel de agarose 1,4% em TBE 0,5X a 90V e 50 mA por 3 horas. Em seguida, o gel foi corado por 25 minutos em brometo de etídeo e descorado a seguir por 5 minutos.

#### 4.8. Identificação das leveduras pelo Sistema API 20 C AUX

Para a identificação das leveduras por meio do sistema API 20 C AUX os isolados foram inoculados na superfície do meio GYMP e incubados durante aproximadamente 24 horas, a temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Após o período de crescimento, foi coletada uma alçada da massa celular de cada colônia bem isolada e transferida, assepticamente, para tubos contendo 10mL de solução salina, ajustado a uma turbidez equivalente à escala 2 de McFarland. Posteriormente 100µl da suspensão foi adicionado à ampola API-C Medium e homogeneizado. Em seguida, cada poço do painel de identificação foi preenchido com esta solução. O painel foi incubado em câmara úmida, previamente preparada, a aproximadamente 27 °C, por até 72 horas, com leituras em 48 e 72 horas. Considerou-se como resultado positivo e negativo, respectivamente, a presença ou ausência de turvação nos poços de cada carboidrato. A identificação foi obtida por meio de um perfil numérico de sete dígitos, cuja interpretação foi realizada com o auxílio do programa de identificação *apiweb*<sup>TM</sup>. Identificações listadas no index como excelente (%id  $\geq 99,9$ ), muito boa (%id  $\geq 99,0$ ), ou aceitável (%id  $\geq 90,0$ ), foram consideradas confiáveis.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento

Através da técnica de isolamento de leveduras foram obtidos doze isolados, os quais apresentaram diversos aspectos morfológicos que os diferenciavam entre si, como cor, textura e brilho das colônias, entre outras características (Figura 5.). Esses morfotipos foram isolados de flores pertencentes às espécies *Sobralia liliastrum*, *Epidendrum secundum*, *Fabaceae sp.*, *Mirtaceae sp.*, *Lamiaceae sp.*, e de água de tanque de bromélia pertencente à espécie *Alcantarea nahoumii*. Os isolados foram identificados como: OR1, OB1, OB2, OB3, OB4, ATB1, ATB3, L1, L2, LA1, LR1, M1. Dentre estes, 83% foram obtidos de flores e apenas 17% de água de tanque de bromélia.



**Figura 5.** Estirpes de leveduras isoladas do afloramento rochoso do Morro da Pioneira.

Os vegetais representam um excelente substrato para o desenvolvimento de inúmeras espécies de leveduras (WALKER, 1998; LANDELL, 2006; FERNANDES, 2008; MAUTONE, 2008). Diversas plantas, ao florescerem, produzem na base das suas flores o néctar, substância rica em carboidratos, constituindo um local ideal para o desenvolvimento de leveduras, especialmente as que estão associadas a insetos polinizadores, os quais são os principais responsáveis pela dispersão desses micro-organismos de flor em flor (RUIVO, 2007). As bromélias, por outro lado, caracterizam-se por possuírem folhas dispostas em

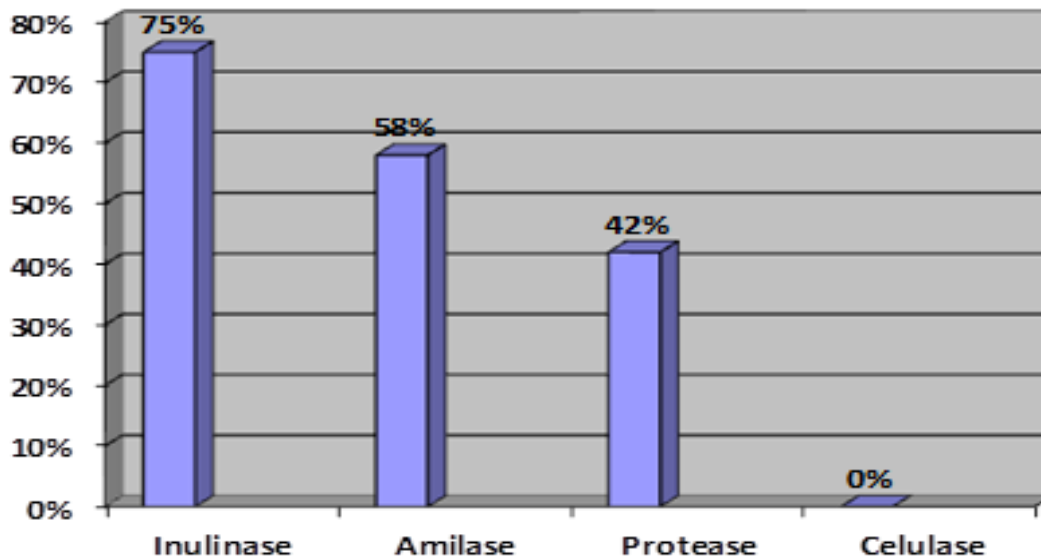
roseta, formando um compartimento que permite o acúmulo de água da chuva e o depósito de matéria orgânica, que serve de alimento para uma diversidade de organismos colonizadores desse substrato (LANDELL, 2006).

Atualmente, alguns trabalhos têm sido realizados com o objetivo de isolar leveduras de diversos tecidos vegetais (FUENTEFRIA, 2004; LANDELL, 2006; MAUTONE, 2008). Ruivo (2005), ao estudar um trecho de Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar (Núcleo Picinguaba), isolou 270 linhagens de leveduras em plantas e conseguiu identificar seis espécies novas, das quais uma espécie foi isolada dos frutos de *Leandra reversa* (planta conhecida como helicônia), duas espécies de água de tanque de bromélia e três espécies foram isoladas a partir de brácteas de outra espécie de helicônia (*Helicônia veneziana*).

Fuentefria (2004), ao realizar isolamento de leveduras e fungos semelhantes a leveduras do filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis* no Parque Farroupilha, no Rio Grande do Sul, obteve 61 linhagens de leveduras, pertencentes a 40 espécies, distribuídas entre os gêneros *Candida*, *Bullera*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Tremella*, entre outros. Segundo o autor, alguns isolados foram identificados somente até o nível de gênero, indicando que estes podem representar novas espécies de leveduras. Landell (2006), em estudo comparativo sobre a diversidade de leveduras associadas ao filoplano de bromélias em duas áreas do Parque de Itapuã, no Rio Grande do Sul, obteve 143 isolados, distribuídos em 58 espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Bullera*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Tilletiopsis* entre outros e, assim como no trabalho realizado por Fuentefria (2004), alguns isolados foram identificados somente até o nível de gênero, indicando possíveis novos biótipos ou novas espécies. Esses resultados evidenciam a diversidade e riqueza de espécies de leveduras associadas a espécies vegetais.

## 5.2. Atividade enzimática

De acordo com a capacidade de produzir halos de hidrólise nos meios de cultura, foi possível observar que 58% dos isolados produziram a enzima amilase, 42% produziram protease e nenhuma das leveduras isoladas foi capaz de produzir a enzima celulase. Para a produção de inulinase, 75% dos isolados mostram-se capazes de produzir essa enzima (Figura 6.).



**Figura 6.** Produção de enzimas pelos isolados do Morro da Pioneira.

Dentre os isolados capazes de produzir inulinases, cinco apresentaram produção intermediária e quatro tiveram crescimento fraco (Tabela 2). Segundo Paula (2007), diversos trabalhos apresentam espécies de leveduras dos gêneros *Candida*, *Sporotrichum*, *Pichia* e *Kluyveromyces* como produtoras de enzimas inulinolíticas. Dentre esses, vários estudos são feitos especialmente com leveduras do gênero *Kluyveromyces*, como no trabalho realizado por Treichel et al. (2011), que buscou otimizar a produção desta enzima em diferentes meios agroindustriais pré-tratados, bem como no trabalho realizado por Gaspari et al. (1999), cuja produção foi estudada por meio da imobilização da inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* para a degradação de extratos de *Helianthus tuberosus* L. Alguns fungos filamentosos também foram estudados para a produção de inulinases como no trabalho realizado por Personi et al. (2004), ao analisar a concentração de frutose originado da degradação de inulina obtida de rizóforos de *Vernonia herbacea* pela inulinase produzidas por *Penicillium janczewskii*.

**Tabela 2:** Resultado para o crescimento dos isolados em inulina.

LEVEDURAS	CRESCIMENTO
OB2	W*
ATB3	W
OB4	+
OB1	W
LA1	+
ATB1	+
L2	+



M1	+
OR1	W
LR1	-
OB3	-
L1	-

\*W= weak (fraco)

Embora 58% dos isolados do Morro da Pioneira tenham apresentado produção de amilase (Figura 6.), esta produção foi fraca, pois os halos apresentaram diâmetros entre 0,15 cm (LR1) a 1,15 cm (L2) (Tabela 3). Visto que, para as leveduras serem consideradas boas produtoras, os halos de degradação devem ser superiores a 2,5 cm (MAUTONE, 2008). De acordo com os resultados obtidos para o Índice Enzimático a maioria das leveduras produtoras do halo de hidrólise em meio contendo amilase, apresentaram habilidade em produzir a enzima amilolítica, visto que o IE foi igual ou superior a 2,0. Apenas a levedura identificada como LR1 não mostrou potencial para a produção dessa enzima, apresentando um IE de 1,20. Os índices variaram entre 1,20 (LR1) e 2,70 (OR1) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Medidas dos halos de hidrólise das leveduras isoladas do Morro da Pioneira para produção de amilase.

LEVEDURA	D(c) (cm)	D(h) (cm)	FPA	IE [D(h+c)/D(c)]	DP
LA1	0,90	0,92	W	2,02	0,3
OR1	0,60	1,00	W	2,70	0,4
LR1	0,85	0,15	W	1,20	0,1
OB4	0,70	0,82	W	2,20	0,2
M1	0,80	1,00	W	2,25	0,3
L2	0,85	1,15	W	2,35	0,1
ATB1	1,12	1,13	W	2,00	0,1
ATB3	-	-	-	-	-
L1	-	-	-	-	-
OB1	-	-	-	-	-
OB2	-	-	-	-	-
OB3	-	-	-	-	-

W: weak (fraco); D(c): diâmetro da colônia; D(h): diâmetro do halo de hidrólise; FPA: Fator de Produção de Amilase; IE: Índice enzimático; DP: Desvio Padrão.

Segundo Delatorre et al. (2010), em indivíduos eucarióticos, a enzima amilase atua em organelas e tecidos internos especializados, responsáveis pela nutrição do organismo, inviabilizando, na maioria dos casos, a extração para o uso comercial. Ao estudar a atividade

amilolítica em 175 isolados de folhas de figueiras do Parque Itapuã, RS, Mautone (2008) verificou que 29,1% foram capazes de produzir essa enzima. Já Landell (2006), ao analisar leveduras isoladas do filoplano de bromélias do mesmo parque obteve 40,2% dos isolados apresentando atividade amilolítica, sendo que 33,3% foram bons ou fortes produtores, diferindo deste trabalho o qual nenhum apresentou alta produção.

Quanto à produção de protease, todos os isolados foram testados e 42% dos morfotipos foram capazes de produzir essa enzima. Todos os isolados caracterizados como positivos para a produção da enzima foram classificados como fortes produtores. O tamanho dos halos variou entre 1,6 cm (ATB1) e 2,25 cm (OB1) (Tabela 4). De acordo com a metodologia para identificar o Índice Enzimático os isolados capazes de produzir o halo de hidrólise em meio contendo leite em pó, foram considerados aptos para a produção dessa enzima, pois os mesmos obtiveram IE superior a 2,0. Os índices variaram entre 2,30 (OB2) e 3,14 (OB1) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Medidas dos halos de hidrólise das leveduras isoladas do Morro da Pioneira para produção de protease.

LEVEDURA	D(c) (cm)	D(h) (cm)	FPP	IE [D(h+c)/D(c)]	DP
L1	0,90	1,85	++	3,05	0,1
ATB1	1,10	1,60	++	2,45	0,1
OB2	1,50	1,90	++	2,30	0,1
OB1	1,05	2,25	++	3,14	0,1
LR1	1,10	1,80	++	2,63	0,2
OB3	-	-	-	-	-
M1	-	-	-	-	-
OR1	-	-	-	-	-
LA1	-	-	-	-	-
L2	-	-	-	-	-
OB4	-	-	-	-	-
ATB3	-	-	-	-	-

W: weak (fraco); D(c): diâmetro da colônia; D(h): diâmetro do halo de hidrólise; FPP: Fator de Produção de Protease; IE: Índice enzimático; DP: Desvio Padrão.

Mautone (2008), ao estudar a produção de enzimas proteolíticas dos isolados do Parque Itapuã, RS, utilizou a caseína e a gelatina para determinar a capacidade enzimática dos isolados e foi observado que 46,3% das leveduras isoladas foram capazes de degradar a

caseína. O mesmo foi observado no trabalho realizado por Landell (2006), onde 49,2% dos isolados foram capazes de produzir a enzima, porém com resultados um pouco superiores aos que foram encontrados neste trabalho. Silva-Neves et al. (2006), ao estudar a produção extracelular de enzimas proteolíticas por 50 isolados de leveduras da região Amazônica, observaram que a maioria dos isolados foram capazes de produzir essas enzimas, sendo a espécie *Candida intermedia* a que apresentou a maior produção enzimática.

Enzimas celulolíticas representam um papel importante em diversas áreas como na microbiologia industrial, nutrição e na ecologia (SHIOTA et al., 2010). Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a produção de celulases por leveduras, como no estudo realizado por Fuentefria (2004) no Rio Grande do Sul, onde 38% dos isolados de leveduras foram capazes de produzir a enzima, bem como no trabalho de Cruz et al. (2011) realizado em Pernambuco, em que 18 dos 46 isolados de leveduras de frutos de meloeiro produziram celulase, nesse trabalho nenhuma levedura foi capaz de produzir essa enzima (Figura 7.).



**Figura 7.** Resultado negativo para produção de celulase.

### 5.3. Crescimento das leveduras em meios hipertônicos

De acordo com as análises feitas para a tolerância osmofílica, 67% das leveduras isoladas foram capazes de se desenvolver em meio contendo 10% de NaCl e 5% de glicose e 83% cresceram em meio composto por 50% de glicose (Tabela 5). Apesar da maioria dos isolados terem se desenvolvido nesses meios, o crescimento foi considerado fraco.

Sabe-se que leveduras diferem na capacidade de tolerar soluções hipertônicas, e esta é uma característica importante para a identificação fenotípica desses micro-organismos (FUENTEFRÍA, 2004; LANDELL, 2006). Diversas espécies de leveduras conseguem tolerar e se manterem ativas em altas concentrações de NaCl como, por exemplo, *Candida sorbitophila*, e em altas concentrações de açúcar como espécie *Zygosaccharomyces rouxii* (FERNANDES, 2008).

**Tabela 5:** Crescimento da leveduras em meio NaCl 10% e Glicose 5% e meio Glicose 50%.

LEVEDURAS	NaCl 10% e Glicose 5%	Glicose 50%
LR1	W*	W*
OB2	W	W
ATB3	W	W
OB1	W	W
L1	W	W
OB3	W	W
L2	W	W
M1	W	W
OB4	-	-
LA1	-	W
ATB1	-	+
OR1	-	-

\*W=weak (fraco)

Segundo Stewart et al. (1988) a tolerância ao estresse osmótico apresentada pelas linhagens de leveduras pode ser elevada após o aumento das concentrações de extrato de levedura e peptona no meio. Thomas et al. (1994) estudaram os efeitos de substâncias osmoprotetoras sobre a fermentação realizada pela espécie *Saccharomyces cerevisiae*, em alta concentração de glicose (35%, m/v) e observaram que quando betaína, glicina e prolina são adicionados ao meio, ocorre um aumento na quantidade de açúcar fermentado, indicado que o

acréscimo de tais aminoácidos no meio de produção com elevada concentração de açúcar auxilia no mecanismo de tolerância osmótica e consequentemente eleva a produção de etanol.

## 5.4. Identificação dos isolados

### 5.4.1. Agrupamento por características morfológicas

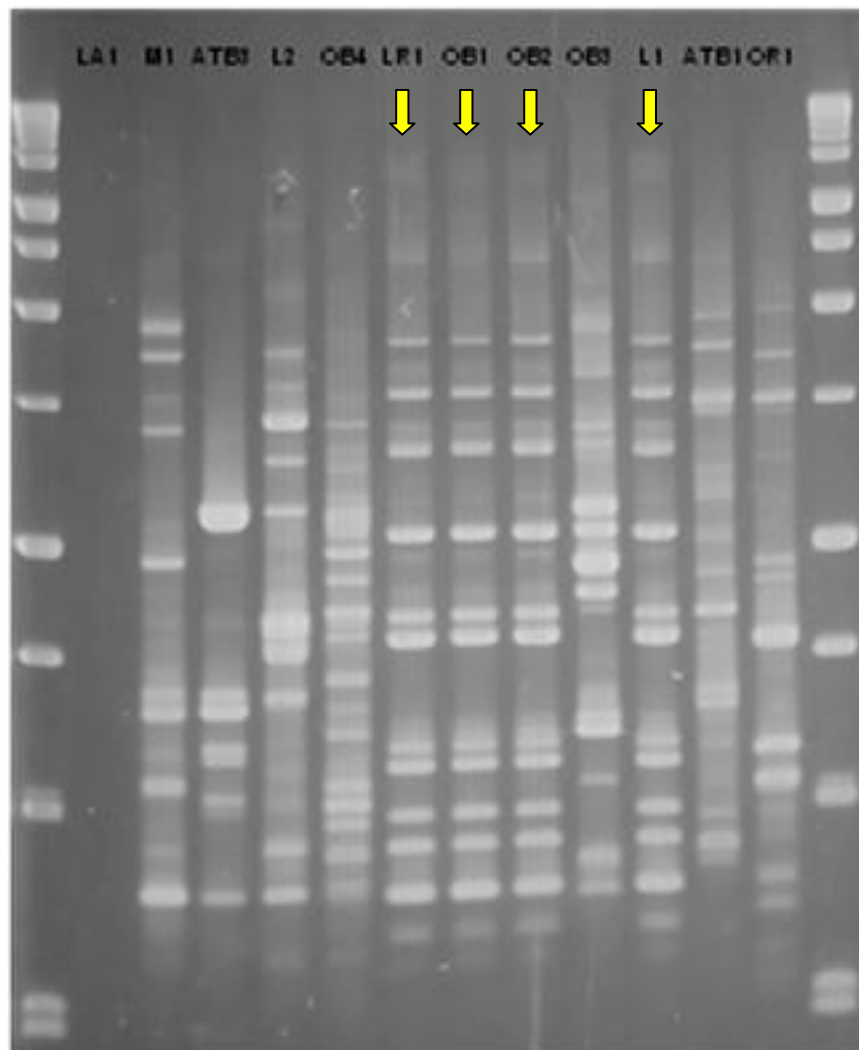
Os dados obtidos pelas análises morfológicas das colônias e células dos isolados, permitiram agrupar as estirpes semelhantes em 5 grupos, como descrito na Tabela 6. Os isolados denominados pelos códigos M1, L2 e LA1, apresentaram pigmentação com tons avermelhados, que podem estar associados a pigmentos carotenóides, responsáveis pela proteção das células leveduriformes contra a incidência da luz solar (FUENTEFRÍA, 2004). Além disso, esses pigmentos apresentam interesse industrial, podendo ser utilizados em alimentos, cosméticos e medicamentos como corantes naturais (SQUINA e MERCADANTE, 2003).

**Tabela 6:** Agrupamento das estirpes isoladas do Afloramento Rochoso do Morro da Pioneira com base nas características morfológicas das colônias e células.

	<b>Código das Leveduras</b>	<b>Pigmentação</b>	<b>Textura</b>	<b>Morfologia celular</b>	<b>Brotamento</b>	<b>Aparência</b>
<b>1</b>	M1	vermelha	rugosa	Ovóide	Multipolar	Opaca
<b>2</b>	LR1, L1, OB1, OB2, OB3, OR1, ATB3	branco a creme	lisa	redonda a ovóide	Multipolar	opaca
<b>3</b>	ATB1	creme	lisa	Alongada	Bipolar	brilhante
<b>4</b>	L2, LA1	vermelha	lisa	Ovóide	Multipolar	brilhante
<b>5</b>	OB4	creme	lisa	redonda a ovóide	Multipolar	brilhante

#### 5.4.2. Agrupamento dos isolados através do Método MSP – PCR

O padrão de bandas obtido após a realização de eletroforese em gel de agarose, demonstrou que as 12 estirpes isoladas do afloramento rochoso do Morro da Pioneira estão distribuídas em, pelo menos, 8 espécies de leveduras. As estirpes LR1, L1, OB1 e OB2, embora tenham sido isoladas de diferentes flores, parecem pertencer à mesma espécie, de acordo com o padrão de bandas do gel, e as demais estirpes, aparentemente, são espécies diferentes (Figura 8.). Não foi obtido sucesso no PCR da levedura LA1 e, portanto, não foi possível verificar seu padrão de bandas. Os testes com esta estirpe serão repetidos posteriormente.



**Figura 8.** MSP - PCR das leveduras isoladas do afloramento rochoso do Morro da Pioneira.

### 5.4.3. Identificação dos isolados pelo Sistema API 20 C AUX

Os resultados obtidos por meio do Sistema de Identificação de Leveduras API 20 C AUX demonstraram que as 12 leveduras isoladas pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, sendo possível identificar cinco espécies: *Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Cryptococcus laurentii*. Para os demais isolados foi possível identificar apenas o gênero: *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.* e *Rhodotorula sp.* (Tabela 7). Os isolados OB3, OB4 e M1 foram denominados de *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.* e *Rhodotorula sp.*, respectivamente, por não ter sido possível realizar uma identificação precisa, optando-se por identificá-los pelos gêneros que tiveram uma maior aproximação na identificação. Diversos trabalhos têm demonstrado o isolamento de leveduras desses gêneros em diversos ecossistemas (FUENTEFRIA, 2004; MAUTONE, 2006; LANDELL, 2006; LOUREIRO, 2007).

**Tabela 7:** Identificação dos isolados pelo Sistema de Identificação de Leveduras API 20 C AUX.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	ID (%)
OB4	<i>Cryptococcus sp.</i>	46,1
OB3	<i>Candida sp.</i>	42,5
ATB1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	62,8
L2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99,9
LA1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	97,2
M1	<i>Rhodotorula sp.</i>	47,6
OR1	<i>Candida guilliermondii</i>	64,2
L1	<i>Candida sp.</i>	54,7
ATB3	<i>Candida lusitaniae</i>	97,2
OB2	<i>Candida lusitaniae</i>	97,2
OB1	<i>Candida lusitaniae</i>	97,2
LR1	<i>Candida lusitaniae</i>	99,7

Sete isolados foram identificados dentro do gênero *Candida*. De acordo com a identificação obtida pelo sistema API 20 C AUX quatro destes foram classificadas como *Candida lusitaniae*. Porém o mesmo não foi confirmado pela técnica de microsatélite (MSP-PCR), onde o isolado ATB3 não apresentou o mesmo padrão de bandas que os isolados OB2, OB1 e LR1 (Figura 8), entretanto esses isolados apresentam as mesmas características morfológicas (Tabela 6), indicando que possivelmente houve contaminação na amostra do isolado ATB3 ao realizar a técnica do MSP - PCR. Assim, estes testes serão repetidos posteriormente.

De acordo com o sistema API, não foi possível identificar a espécie do isolado L1, sendo possível realizar apenas uma excelente identificação ao nível de gênero. Entretanto, a similaridade das características morfológicas e o padrão de bandas observado pelo método MSP – PCR permitiu concluir que este isolado também pertence à espécie *Candida lusitaniae*, assim como os isolados OB2, OB1, LR1 e ATB3. De acordo com a análise da produção de enzimas, esta espécie mostrou-se como excelente produtora da enzima protease, não foi capaz de produzir celulase e apenas o isolado LR1 foi capaz de produzir a enzima amilase, entretanto, apresentou o menor halo de degradação dentre os isolados estudados (0,15 cm). Para a produção de inulinase esta espécie mostrou-se com fraca ou nenhuma produção da enzima. Esta levedura ainda foi capaz de crescer em meio hipertônico, entretanto foi observado um fraco desenvolvimento.

Observou-se que a espécie *Candida lusitaniae* foi isolada de diferentes espécies de plantas (*Alcantarea nahoumii*, *Sobralia liliastrum*, *Epidendrum secundum*, *Fabaceae sp.*), indicando que essa levedura encontra-se bem distribuída entre as espécies vegetais do afloramento rochoso do Morro da Pioneira. *C. lusitaniae* é constantemente encontrada no trato digestivo de animais, sendo também isolada de secreções respiratórias e urina humana (LODDER, 1970). Assim, pode-se inferir que a distribuição dessa levedura pode estar relacionada a hábitos de animais presentes no afloramento rochoso do Morro da Pioneira.

O isolado OR1 foi identificado como *Candida guilliermondii*. Essa espécie de levedura é conhecida na literatura pela sua patogenicidade (CANDIDO et al., 2000; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; MENEZES et al., 2004) e, atualmente, tem se destacado na área industrial na conversão de xilose em xilitol (BRANCO et al., 2005; CORTEZ, 2005; MATOS et al., 2011), o qual possui características industriais importantes com poder adoçante semelhante ao da sacarose, além de possuir propriedades anticariogênicas, sendo utilizado nas indústrias de alimentos, produtos odontológicos e farmacêuticos (CORTEZ, 2005). Confirmando este potencial, esta levedura apresentou crescimento positivo em xilose (Anexo I). Entretanto, foi observado que esta espécie apresentou baixo potencial para produção das enzimas inulinase e amilases, e não foi capaz de produzir as enzimas celulase e protease. Para o teste de crescimento em altas concentrações de NaCl e glicose, foi observada que este isolado não foi capaz de se desenvolver nesses meios.

Sabe-se que o gênero *Candida* representa um grupo altamente heterogêneo, possuindo uma definição bastante abrangente e, normalmente, as leveduras ascomicéticas que não possuem reprodução sexuada e não preenchem os perfis de outros gêneros são definidas como *Candida* (MEYER, et al., 1998). Como o isolado OB3 foi identificado apenas ao nível de



gênero, este pode representar um possível biótipo ou uma nova espécie. Esse isolado não apresentou potencial para a produção das enzimas estudadas, e fraco desenvolvimento em elevadas concentrações de sal e açúcar. Entretanto, outros estudos podem ser realizados para observar a produção de outros compostos de interesse biotecnológico por esse isolado.

Vários estudos têm apontado o isolamento de espécies de leveduras do gênero *Candida* em diversos ambientes. Loureiro (2007), por exemplo, ao estudar o potencial de leveduras isoladas de sedimentos de manguezal em Pernambuco, obteve 32 espécies de leveduras onde 25 pertenciam a esse gênero. Já Mautone (2008), ao observar a diversidade e o potencial biotecnológico de leveduras isoladas do filoplano de figueiras, obteve seis isolados pertencente a esse gênero.

Apesar do gênero *Cryptococcus* ser conhecido na literatura, por abranger a levedura *Cryptococcus neoformans*, conhecida por sua patogenicidade, existem poucas informações a respeito da produção de enzimas por esses organismos, bem como sobre a biologia molecular das demais espécies desse gênero (GALDINO, 2008). Dentre as leveduras isoladas por este trabalho, duas foram classificadas como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, os isolados OB4 e a ATB1, entretanto o isolado OB4 apenas foi identificado ao nível de gênero.

O isolado ATB1 foi identificado como pertencente à espécie *Cryptococcus laurentii*. Este resultado foi similar ao encontrado por Baltazar e Ribeiro (2008) que, ao isolarem espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* em ocos e cascas de arvores no estado de Espírito Santo, obtiveram apenas um isolado identificado como pertencente à espécie *C. laurentii*. Diversos outros trabalhos têm isolado essa espécie em diversos tipos de tecido vegetal, como Landell (2006), em filoplano de bromélias obteve 15 isolados e Mautone (2004), estudando leveduras isoladas de folhas de figueiras, obteve 20 morfotipos pertencentes a essa espécie.

Os isolados pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, obtidos por este trabalho, produziram a enzima inulinase, apresentaram fraca produção da enzima amilase e apenas o isolado ATB1 produziu protease, mostrando-se como bom produtor desta enzima. Com relação ao crescimento em meio hipertônico, os dois isolados foram incapazes de se desenvolver em meio composto por NaCl 10% e glicose 5%; entretanto, em meio contendo 50% de glicose o isolado ATB1 mostrou-se capaz de se desenvolver bem, diferindo do isolado OB4, o qual não apresentou crescimento. Estes resultados e a análise das características morfológicas indicam que, provavelmente, estes isolados não são da mesma espécie.

Neste trabalho foram identificados três isolados como pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, sendo que em dois destes foi possível identificar a espécie e em um isolado, só foi possível identificar o gênero. O isolado LA1 foi identificado como *Rhodotorula glutinis*, o isolado L2 como *Rhodotorula mucilaginosa* e o isolado M1 foi identificado como *Rhodotorula sp.*.

Segundo Bonadio et al. (2011), diversos gêneros de leveduras são capazes de produzir pigmentos carotenóides, em especial as pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, que possuem habilidade em sintetizar vários tipos de carotenóides em variadas proporções. Squina e Mercadante (2003), ao estudar a concentração de diferentes carotenóides em quatro espécies de leveduras pertencentes a esse gênero, observou que a *Rhodotorula glutinis* foi a que apresentou a maior concentração desse pigmento. Essa característica representa uma importante ferramenta para diversos setores industriais pois, segundo Bonadio et al. (2011), recentemente tem-se aumentado o interesse em substituir os corantes artificiais pelos biosintetizados.

O isolado LA1, identificado como pertencente à espécie *Rhodotorula glutinis*, apresentou uma produção intermediária da enzima inulinase, fraca produção de amilase, não foi capaz de produzir celulase e, apesar dessa espécie ser conhecida como produtora de proteases extracelular (PITT e HOCKING, 1997), nesse trabalho ela não foi capaz de produzir essa enzima. Com relação à capacidade em se desenvolver em meio hipertônico, essa levedura foi capaz de crescer em meio contendo 50% de glicose, entretanto não cresceu em meio contendo NaCl 10% e glicose 5%.

O isolado L2, identificado como pertencente à espécie *Rhodotorula mucilaginosa* e o isolado M1, identificado apenas ao nível de gênero, não foram capazes de produzir as enzimas celulase e protease, entretanto apresentaram-se como boas produtoras da enzima inulinase e fraca produtora de amilase. Dentre os isolados capazes de produzir amilase, o isolado L2 representou a estirpe que formou o maior halo de hidrólise do amido (1,15 cm), no entanto, esta levedura foi caracterizada como fraca produtora dessa enzima. Esses dois isolados apresentaram fraco desenvolvimento em meio hipertônico.

## 6. CONCLUSÕES

- As doze leveduras isoladas do Morro da Pioneira, na região da Serra da Jibóia, pertencem aos gêneros: *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*.
- Foram identificadas cinco espécies, sendo que *Candida lusitaniae* foi a que apresentou maior número de isolados. As demais, que foram identificadas somente até nível de gênero, podem indicar possíveis espécies novas, o que será confirmado posteriormente com testes de biologia molecular.
- A análise do potencial na produção de enzimas demonstrou que, embora os isolados tenham apresentado resultados positivos para amilase, estes possuem potencial principalmente para a síntese de inulinase e protease, ao se destacarem pela produção intermediária e forte destas enzimas, respectivamente.
- Embora a maioria dos isolados tenham demonstrado um crescimento fraco nos meios hipertônicos, esses podem ser considerados osmofílicos, visto que estes foram capazes de se desenvolverem nesses meios.

## REFERÊNCIAS

AB'SABER, A.N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. **Geomorfologia**, v. 53, p. 1-52, 1977.

ALMEIDA, J.M.G.C.F. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 295-303, 2005.

ARAÚJO, F.V.; MEDEIROS, R. J.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. . A preliminary note on psevalent species in yeast communities of bromeliad - tank waters in different tropical ecosystems of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 118-121, 1998.

BALTAZAR, L.M.; RIBEIRO, M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 449-453, 2008.

BARBOSA, F.R.; MAIA, L. C.; GUSMÃO, L. F. P. Novos registros de *Hyphomycetes* decompositores para o Estado da Bahia, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 323-329, 2009.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts, characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000, 1139p.

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. Surrey, v. 26, n 9-10, p 678-687, 2000.

BONADIO, M.P.; MUTTON, M.J.R.; FREITA, L.A. **Produção de carotenoides por *Rhodotorula rubra* em meio de maltose e sacarose, com diferentes nutrientes**. Disponível em <[prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_35298769845.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_35298769845.pdf)>. Acessado em 2011.

BRANCO R.F.; SANTOS J.C.; CUNHA M.A.A.; SANTOS D.T.; SILVA S.S. **Produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator de coluna de bolhas.** In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Resumo, UNICAMP, Campinas, SP, 2005.

CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMESU, M.C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 437-442, 2000.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica ilustrada.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 533 p.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CORTEZ, D.V. **Influencia dos produtos de degradação da lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondi*.** 130p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

COSTA NETO, E.M. O caranguejo-de-água-doce, *Trichodactylus fluviatilis* (Latreille, 1828) (*Crustacea, Decapoda, Trichodactylidae*), na concepção dos moradores do povoado de Pedra Branca, Bahia, Brasil. **Biotemas**, v. 20, n. 1, p. 59-68, 2007.

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.** Disponível em <[www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0517-3.pdf](http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0517-3.pdf)> Acessado em 2011.

DELATORRE, A.B.; LADEIRA, S.A.; BARBOSA, J.B.; MARTINS, M.L.L. Microorganismos termófilos e enzimas termoestáveis de importância comercial. **Perspectiva online**, v. 4, n. 16, p. 132-145, 2010.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 24, p. 469-48, 2000.

FERNANDES, A.P.F.V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática.** 201p. Tese (Doutorado). Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 2008.

FOLCH-MALLOL, J.L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDÍAS, F.; ROBLES, A.A.C. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 46, p.24 -46, 2004.

FUENTEFRIA, A.M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.** 131p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GALDINO, A.S. **Clonagem e expressão de uma  $\alpha$ -amilase de *Cryptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido.** 159p. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas: Biologia Celular). Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2008.

GASPARI, J.W.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus*. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1135-1140, 1999.

GUNDLLAPALLI, S.B.M.; CORDERO R.R.O.; LA GRANGE D.C.; VAN RENSBURG P.; PRETORIUS I.S. Different genetic background influence the secretory expression of the LKA1-encoded *Lipomyces kononenkoae* -amylase in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 8, p. 651-656, 2002.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. p. 1-18, 2003.

HARLEY, R.M. Evolution and distribution of Eriopneuste (Labiatae), and its relatives, in Brazil. In: VANZOLINE, P.E.; HEYER, W.R. (ed) **Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 71-120, 1988.

JUNCA, F.A. Diversidade e uso de hábitat por anfíbios anuros em duas localidades de Mata Atlântica, no norte do estado da Bahia. **Biota Neotropical**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2006.

JUNCA, F.A.; BORGES, C.L.S. Fauna associada a bromélias terrícolas da Serra da Jiboia, Bahia. **Sitientibus**, Série Ciências Biológicas, v. 2, n.1-2, p. 73-81, 2002.

KIM, D.H.; CHOI, Y.J.; SONG, S.K.; YUN, J.W. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas sp.* **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 369–371, 1997.

KUMAR, S.; SHARMA, N.S.; SAHARAM, M.R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, n. 40, p 1701- 1705, 2005.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts, a taxonomic study**. 4 Ed. Amestardam: Elseveir. 1998, 1055p.

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN. C. P., FELL, J. W. (Eds). **The yeasts: a taxonomic study**. 4 ed. Elsevier Science Publishers, p 21-30. 1998.

LANDELL, M.F. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associadas ao filoplano de bromélias do Parque de Itapuã, Viamão, RS**. 136p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LEÃO-FERREIRA, S.M.; IZABEL, T.S.S.; GUSMÃO, L.F.P.; MARQUES, M.F.O. Novas ocorrências de fungos conidiais para América do Sul e Neotrópico. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n.4, p.775-780, 2009.

LOCK, L.L. **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81**. 125p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

LODDER, J. **The Yeast: a taxonomic study**. Oxford: North Holland Publishing Company, 1970. 1385p.

LOUREIRO, S.I.A. **Potencial Biotecnológico de leveduras isoladas de sedimentos do manguezal, Barra dos Guararapes, Pernambuco, Brasil.** 80p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

MAGER, W.H.; VARELA, J.C.S. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 253-258, 1993.

MARQUES, M.F.O.; GUSMÃO, L.F.P.; MAIA, L.C. Espécies de *Vermiculariopsiella* (Hyphomycetes) associadas a substratos vegetais em fragmento de Mata Atlântica, Serra da Jibóia, Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 4, p. 659-665, 2008.

MARQUES, M.F.O.; MORAES JÚNIOR, V.O.; SANTOS, S.M.L.; GUSMÃO, L.F.P.; MAIA, L.C. Fungos conidiais lignícolas em um fragmento de Mata Atlântica, Serra da Jibóia, BA. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1186-1188, 2007.

MATOS, G.S.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. **Formação de Xilitol, Etanol e Glicerol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 Durante a Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar.** Disponível em <[www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos\\_completos/t003.doc](http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t003.doc)> Acessado em 2011.

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

MELO, H.F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial.** 118p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MENEZES, E.A.; GUERRA, A.C.P.; RODRIGUES, R.C.B.; PEIXOTO, M.M.L.V.; LIMA, L.S.; CUNHA, F.A. Isolamento de *Candida spp.* no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 299-305, 2004.

MEYER, S.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Candida* Berkhout. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. **The Yeasts**, a Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, p. 454-573, 1998.



MEYER, W.; MITCHELL, T.G.; FREEDMAN, E.Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the Polymerase Chain Reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2274-2280, 1993.

MONACO, M.A.S.L. **Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

MORAIS, P.B.; ROSA, C.A. Interações entre *Drosophila* e leveduras em ambiente tropicais. p. 321-336. In Martins, R. P., LEWINSOHN, T.M. E BARBEITOS, M.S (Eds) **Ecologia e comportamento de Insetos**. Série Oecologia Brasiliensis, v. 8, PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4 ed. São Paulo, Sarvier, 2006.

NEVES, M.L.C.. **Caracterização da vegetação de um trecho de Mata Atlântica de Encosta na Serra da Jiboia, Bahia**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2005.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; GARBOGGINI, F.F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **MultiCiência**, v. 7, 2006.

PAULA, F.C. **Imobilização de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045: Caracterização e produção de açúcar invertido em biorreator**. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2007.

PESSONI, R.A.B.; OLMEDO, P.M.O.; CLEMENTE FILHA, A.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Produção de concentrados de frutose por inulinases de *Penicillium janczewskii* e atividade sobre o nível de glicose plasmática em ratos diabéticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 373-377, 2004.

PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE A.H., HARRISON, J. (Ed) **The Yeasts**, Academic Press, v. 1, p 123- 180, 1987.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2.ed. Maryland: Aspen Publishers. 1997.

QUEIROZ, L.P.; SENA, T.S.N.; COSTA, M.J.S.L. Flora vascular da Serra da Jibóia, Santa Terezinha-BA. I: O CAMPO RUPESTRE. **Sitientibus**, n.15, p 27-40, 1996.

RAMOS, G.J.P.; OLIVEIRA, I.B.; MOURA, C.W.N. Desmídias de ambiente fitotelmata bromelícola da Serra da Jiboia, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, p 103-113, 2011.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHLORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007, 830 p.

ROBSON, L.M.; CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 626-644, 1989.

RODRIGUES, A.N.; SANT'ANNA, E.S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p 63-66, 2001.

RUIVO, C.C.C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais da Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar-núcleo Picinguaba**. 91p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Rio Claro, 2005.

SALMON, J.M.; MAURICIO, J.C. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 16, n. 1, p 89-94, 1994.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F.L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J.W. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodospordium*:

*Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.687-697, 2001.

SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M. Extremófilos: Micro-organismos à prova de Agressões Ambientais Extremas. **Biocologia Microbiana: Boletim de Biotecnologia**. n. 2, 2001.

SANTOS, M.G.G.R.; SCHENBERG, A.C.G.; ASTOLFI FILHO, S.; VICENTE, E.J.; FARIA, J.B.; CAMARGO, S.S.; MORAES, L.P.; GUEDES, L.S. L.S.; SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Yeast In Biotechnology. In: MARTINS, M.T.; SATO, M.I.Z.; TIEDJE, J.M.; HAGLER, L.C.N.; DÖBEREINER, J.; SANCHEZ, P.S.. (Org.). **Progress in Microbial Ecology**. 1 ed. SAO PAULO: Sociedade Brasileira de Microbiologia, p. 571-576, 1997.

SHIOTA, V.M.; ZANELATO, A.I.; THOMÉO, J.C. **Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido.** Disponível em <[http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_32345214848.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_32345214848.pdf)>. Acessado em 2010.

SILVA NEVES, K.C.; PORTO, A.L.F; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da região Amazônica para produção de protease extracelular. **ACTA Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 299 – 306, 2006.

SILVA, L.A.D. **Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*.** 119p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SOARES, V.F.; FERREIRA, V.S.; BON, E.P.S. **Produção de Proteases de *Bacillus subtilis* usando óleo de soja como fonte de carbono.** In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1999.

SQUINA, F.M., MERCADANTE, A.Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 3, 2003.

STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M.; STAMFORD, N.P. Atividade enzimática de microorganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n. 4, 1998.

STEWART, G.G.; D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; RUSSEL, I. Factors that influence the ethanol tolerance of brewer's yeast strains during high gravity wort fermentations. **Master Brewers Association of the Americas**. v. 25, p. 47-53, 1988.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on Very-High-Gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, 1994.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005, 894 p.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 4ª Ed., São Paulo, SP, Editora Atheneu, 2004.

TREICHEL, H.; RODRIGUES M.I.; DURRANT, L. R.; ANDRETTA, M.G.S.; CONTIERO, J.; BURKET, J.F.M.; MAUGERI FILHO, F.; CURRALER, I. C. B. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pre-tratados.** Disponível em <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=51&pid=3&p=15&order=titulo](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=51&pid=3&p=15&order=titulo)> Acessado em 2011.

VALENTE, E.B.; PÔRTO, K.C.; BÔAS-BASTOS, S.B.V.; BASTOS, C.J.P. Musgos (Bryophyta) de um fragmento de Mata Atlântica na Serra da Jibóia, município de Santa Terezinha, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. v. 23, n. 2, p 369-375, 2009.

VALENTE, E.B.; PORTO, K.C. Hepáticas (Marchantiophyta) de um fragmento de Mata Atlântica na Serra da Jibóia, Município de Santa Teresinha, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. v. 20, n. 2, p. 433-441, 2006.

VERACHTERT, H.; DE MOT, R. **Yeast: biotechnology and biocatalysis**. New York: Marcel Decker, p. 257-296, 1990.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley e Sons, 1998, 362 p.

YARROW, D. **Methods for the isolation and identification of yeasts**. In: The Yeasts, a taxonomic study. 4<sup>a</sup>. Ed. Amsterdam: Kurtzman e Fell. p. 77-100, 1998.

ZILLI, J.E.; NECHET, K.L.; VIEIRA, B.A.H.; VITAL, M.S. **Diversidade de micro-organismos do solo com potencial biotecnológico**. Disponível em <[http://www.iamazonica.org.br/conteudo/eventos/biodiversidadeSolo/pdf/resumos/Painel1\\_JerriZ.pdf](http://www.iamazonica.org.br/conteudo/eventos/biodiversidadeSolo/pdf/resumos/Painel1_JerriZ.pdf)> Acessado em 2010.

## ANEXO I

**Tabela 8:** Assimilação de compostos de carbono e nitrogênio pelas estirpes.

	OB4	ATB3	M1	LA1	L2	L1	LR1	OR1	OB1	OB2	OB3	ATB1
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	C	w	+	+	+	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	C	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	-	-	+	C	-	-	-	-	-	+
D-arabinose	+	+	+	-	+	C	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	-	+	C	-	-	-	-	-	+
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Salicina	W	w	w	w	w	w	W	C	w	w	w	W
DL-Lactato	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarato	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	+	+	-	-	+	+	+		+	+	+	+
Nitrato	+	+	c	C	+	C	-	C	C	C	C	+
Urease	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
Galacturonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*C: contaminação