

UFRGS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UERGS – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL

DANIELLE MACHADO PAGANI

**VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E
FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE MACRÓFITAS DA
ILHA DA PÓLVORA, RIO GRANDE, RS, BRASIL.**

IMBÉ
2013

DANIELLE MACHADO PAGANI

**VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E
FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE MACRÓFITAS DA
ILHA DA PÓLVORA, RIO GRANDE, RS, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia Marinha e Costeira pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Valente

IMBÉ

2013

P129v Pagani, Danielle Machado

Verificação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de macrófitas da Ilha da Pólvora, Rio Grande, RS. / Danielle Machado Pagani. -- 2013.

58 f.

Orientadora: Patrícia Valente.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Imbé/Osório, BR-RS, 2013.

1. Leveduras. 2. Macrófitas. 3. Pólvora, Ilha da (RS). I. Valente, Patrícia, orient. II. Título.

DANIELLE MACHADO PAGANI

**VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS E
FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS ISOLADOS DE MACRÓFITAS DA
ILHA DA PÓLVORA, RIO GRANDE, RS, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia Marinha e Costeira pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Valente

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Melissa Landell (UFAL)

Prof. Dr. Alexandre Macedo (UFRGS)

Dr^a. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia (UFRGS)

Prof. Dr. Paulo H. Ott (UFRGS) Coordenador da atividade Trabalho de Conclusão II - CBM

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge Pagani e Marione Machado Pagani.

AGRADECIMENTOS

A Professora Patricia Valente por ter me aceitado como orientada e ter permitido que estagiasse no laboratório. A Belize Leite por ter dividido comigo o projeto, por todo o apoio que me deu sempre com a sua amizade.

A Andrea Formoso pelo apoio e amizade, a Sandra Mendes por todas as dúvidas tiradas e conselhos dados, por toda ajuda que eu recebi durante o trabalho. A todos os colegas de laboratório, a turma do café, que me ajudaram de diversas formas diferentes, inclusive a Professora Maria Lúcia que sempre se mostrou interessada no andamento do trabalho.

Aos meus pais Jorge Pagani e Marione Pagani por todo apoio e amor incondicional que eu recebi ao longo da vida e especialmente nessa caminhada dos últimos 5 anos. Ao meu irmão, Maikon Pagani pelo carinho e apoio constante.

Aos meus avós maternos Cenira Z. Machado e Mário S. Machado pelo carinho, interesse e apoio; Aos meus avós paternos Josefa B. Pagani e Pascoal Pagani pelo carinho.

Ao Samuel C. Stepien pelo companheirismo dos últimos 6 anos, por toda ajuda que me prestou e pelo amor que recebi. A família Stepien, Carlos e Ignez, pelo amor, carinho e apoio.

A Stella M. Pivetta e ao Ângelo Pivetta por todo amor, apoio, palavras de conforto e acolhida que me deram força nos últimos anos longe de casa.

A Marcinha, a Bete, a Angela, Margot, Pinheiro, Cariane, Maurício e todos os funcionários do CECLIMAR que sempre me receberam com um sorriso, uma palavra de conforto ou uma demonstração de carinho.

Aos meus colegas da turma 3 e aos colegas da turma 4, conheci muita gente interessante e divertida, vou sentir muita falta de estudar com vocês.

E por fim, agradeço aos meus queridos companheiros: Troll, Lia, Udi, Ozzy, Piuí, Glória, Madruguinha, Cristóvão, Brás, Negão e Tigresa pelo amor incondicional, pelas alegrias que me proporcionaram e me proporcionam, fiéis amigos, cada um do seu jeito contribuiu para tornar cada dia meu mais feliz.

Agradeço também, a FAPERGS pela bolsa de iniciação científica.

Obrigada a todos, amo vocês.

“A vingança nunca é plena mata a alma e envenena.”

Madruga

RESUMO

As leveduras são fungos pertencentes aos filos Basidiomycota ou Ascomycota que possuem um grande potencial biotecnológico. No presente estudo, objetivou-se verificar a produção de enzimas extracelulares de isolados provenientes das macrófitas *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus* colhidas *in natura* e em decomposição, provenientes de uma área de marisma na ilha da Pólvora, litoral sul do Rio Grande do Sul. A hipótese testada foi a de que os isolados das macrófitas em decomposição produziram maior variedade de enzimas e teriam maior atividade enzimática do que os isolados das macrófitas *in natura*. As leveduras previamente isoladas foram cultivadas em meio agar GYP por 48h, sendo, após, inoculadas em placas contendo meio de cultura específico para a verificação de cada enzima. As leveduras foram então incubadas durante 7 dias a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). A leitura dos isolados positivos foi feita pela mensuração do diâmetro dos halos de atividade enzimática ao redor das colônias, com posterior cálculo da atividade enzimática (Pz). Os testes de fermentação de glicose e xilose foram realizados em tubos de ensaio contendo tubinhos de Durham invertidos para verificar a existência de produção de CO_2 quando os isolados foram fermentadores positivos. Utilizou-se o *Diazonium Blue B Test* (DBB) para agrupar os isolados conforme sua afinidade basidiomicética ou ascomicética, separou-se ainda em um terceiro grupo, o dos fungos leveduriformes. Os resultados apontam que as leveduras isoladas de macrófitas em decomposição estão atuando no processo, apresentaram um número maior de isolados produtores de enzima e não tiveram diferença estatística entre as médias de atividade enzimática para amilase e caseinase, mas houve para esterase e lipase. Esse resultado aponta para a necessidade de degradação, pelos isolados, da cutina presente na superfície foliar. Alguns dos isolados obtidos apresentaram um forte potencial para utilização em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chaves: Leveduras; Enzimas; Potencial biotecnológico.

ABSTRACT

Yeasts are fungi that belong to the phyla Basidiomycota or Ascomycota, with great biotechnological potential. In this study we aimed at verifying the extracellular enzyme production by yeasts isolated from the macrophytes *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* and *Scirpus maritimus* collected from a salt marsh, Ilha da Pólvora, south coast of Rio Grande do Sul, Brazil. The tested hypothesis was that yeast isolates from macrophytes in decomposition would produce more enzymes and have stronger enzymatic activities than isolates from the macrophytes *in natura*. The previously isolated yeasts were cultivated in GYP agar for 48h, then inoculated in appropriate culture media to verify each enzyme production. Yeasts were incubated for seven days at room temperature ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). The reading of the positive isolates was done by measuring the diameter of halos of enzymatic activities around the colonies, with subsequent calculation of the enzyme activity (Pz). The tests fermentation of glucose and xylose were conducted in test tubes containing inverted Durham little tubes to check for CO₂ production when fermenting isolates were positive. We used the diazonium Blue B Test (DBB) to cluster the isolates according to their basidiomycetous or ascomycetous affinity, and separated still a third group, the yeast-like fungi. The results indicate that the yeasts isolated from decaying macrophytes are acting in the process, showed a higher number of isolates producing enzyme and there was no statistical difference between the mean enzymatic activity for amylase and caseinase, but there was for esterase and lipase. This result points to the need for degradation by the isolates, the cutin present on the leaf surface. Some isolates obtained have strong potential for use in biotechnological applications.

Key Words: Yeasts, Enzymes, Biotechnological potential

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FIG. 1. ATIVIDADE AMIOLÍTICA. FONTE: BELIZE LEITE	25
FIGURA 2 – FIG. 2. ATIVIDADE CASEINOLÍTICA. FONTE: BELIZE LEITE	25
FIGURA 3 – FIG. 3. ATIVIDADE ESTERASE. FONTE: BELIZE LEITE.....	26
FIGURA 4 – FIG. 4. PERCENTAGEM DE PRODUTORES DOS FILOS ASCOMYCOTA E BASIDIOMYCOTA E DO GRUPO DOS FUNGOS LEVEDURIFORMES	30
FIGURA 5 – FIG. 5. MÉDIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ENZIMAS PROVENIENTES DE MACRÓFITAS EM DECOMPOSIÇÃO EM NÍVEL DE FILO E FUNGOS LEVEDURIFORMES. LETRAS IGUAIS SIGNIFICAM QUE NÃO HOUE DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE ENTRE AS MÉDIAS. LIPASE: P=0,7420; ESTERASE: P=0,3258; AMILASE: P=0,1175; CASEINASE: P=0,1508.....	31
FIGURA 6 – FIG. 6. MÉDIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ENZIMAS MACRÓFITAS EM DECOMPOSIÇÃO EM NÍVEL DE FILO. LETRAS IGUAIS SIGNIFICAM QUE NÃO HOUE DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE ENTRE AS MÉDIAS. LIPASE> P>0,5211; ESTERASE: P<0,5621; AMILASE: P=0,1517; CASEINASE: P=0,19.....	32
FIGURA 7 – FIG. 7. PERCENTAGEM DE ISOLADOS DE MACRÓFITAS <i>IN NATURA</i> PRODUTORES DE ENZIMAS.....	34
FIGURA 8 – FIG. 8. MÉDIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ENZIMAS PROVENIENTES DE MACRÓFITAS <i>IN NATURA</i> EM NÍVEL DE FILO E FUNGOS LEVEDURIFORMES. LETRAS IGUAIS SIGNIFICAM QUE NÃO HOUE DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE ENTRE AS MÉDIAS. LIPASE: P=0,6684; ESTERASE: P=0,2949; AMILASE: P=0,1718; CASEINASE: P=0,05	35
FIGURA 9 – FIG. 9. MÉDIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ENZIMAS DE MACRÓFITAS <i>IN NATURA</i> EM NÍVEL DE FILO. LETRAS IGUAIS SIGNIFICAM QUE NÃO HOUE DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE ENTRE AS MÉDIAS. LIPASE: S. ALTERNIFLORA X S. MARITIMUS P=0,0469; ESTERASE: P=0,8453; AMILASE: P=0,2776; CASEINASE: S. DENSIFLORA X S. MARITIMUS P=0,0455.....	35
FIGURA 10 – FIG. 10. MÉDIA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ENZIMAS EXTRACELULARES PROVENIENTES DE MACRÓFITAS <i>IN NATURA</i> E EM DECOMPOSIÇÃO. LETRAS IGUAIS SIGNIFICAM QUE NÃO HOUE DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE ENTRE AS MÉDIAS. LIPASE: P=0,0082; ESTERASE: P=0,0104; AMILASE: P=0,1138; CASEINASE: P=0,7353	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – NÚMERO DE ISOLADOS TESTADOS QUANTO A PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES	27
TABELA 2 – MÉDIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS LEVEDURIFORMES ISOLADOS DE MACRÓFITAS EM DECOMPOSIÇÃO.....	28
TABELA 3 – MÉDIA ENZIMÁTICA DAS LEVEDURAS ISOLADAS DE MACRÓFITAS EM DECOMPOSIÇÃO PARA CADA ENZIMA TESTADA.....	29
TABELA 4 – MÉDIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS LEVEDURIFORMES DE MACRÓFITAS <i>IN NATURA</i>	32
TABELA 5 – MÉDIA ENZIMÁTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE MACRÓFITAS <i>IN NATURA</i> PARA CADA ENZIMA TESTADA	33
TABELA 6 – ISOLADOS QUE APRESENTARAM MELHOR MÉDIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR GRUPO. FONTE: O AUTOR	37
TABELA 7 – VALORES DE SIGNIFICÂNCIA DE P, ENTRE MACRÓFITAS <i>IN NATURA</i> E EM DECOMPOSIÇÃO, NA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO GERAL	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	18
2.2	LIPASE	18
2.3	ESTERASE	19
2.4	AMILASE	20
2.5	CASEINASE	21
2.6	FERMENTAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	TESTE DBB	22
3.2	TESTES BIOQUÍMICOS	23
3.2.1	Fermentação	23
3.2.1.1	Glicose	23
3.2.1.2	Xilose	24
3.2.2	Produção de Enzimas	24
3.2.2.1	Amilase	24
3.2.2.2	Caseinase	25
3.2.2.3	Esterase	26
3.2.2.4	Lipase	26
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS	28
4.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4.1.1	Teste DBB	29
4.1.2	Análise da produção enzimática das leveduras isoladas das macrófitas em decomposição	29
4.1.2.2	Capacidade Fermentativa	32
4.1.3	Análise da produção enzimática das leveduras isoladas das macrófitas <i>in natura</i>	32
4.1.3.1	Capacidade Fermentativa	36

4.2	ANÁLISE DE HIPÓTESE	36
4.2.1	Análise entre planta decomposta e <i>in natura</i>	37
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

As leveduras fazem parte do reino Fungi, esse reino é filogeneticamente distinto de outros organismos. São amplamente distribuídas, principalmente em ambientes terrestres, mas são conhecidas espécies marinhas e de águas continentais (MADIGAN et al., 2010). Podem pertencer aos filos Basidiomycota ou Ascomycota, podem também ser encontradas entre os fungos mitospóricos (sem reprodução sexuada conhecida). Os fungos leveduriformes ou *yeast-like* são dimórficos, apresentam-se em forma filamentosa na maior parte do tempo, mas em meio rico em açúcares, como meio de cultura para leveduras, acabam crescendo em forma de levedura (unicelular). As leveduras reproduzem-se assexuadamente por brotamento ou fissão binária. São eucariotas, heterotróficas, podem produzir esporos e não formam corpo de frutificação (KURTZMAN; FELL, 1998). Estão presentes em quase todos os habitats da terra, interagindo de forma saprofítica com as plantas. Estão associadas tanto à parte externa como interna de frutos, exudatos, etc. Apresentam exigências nutricionais simples e para alimentarem-se, secretam enzimas extracelulares que digerem compostos orgânicos complexos, como polissacarídeos ou proteínas, em monômeros, açúcares, peptídeos, aminoácidos, etc. Os fungos são organismos decompositores importantes na reciclagem de matéria orgânica morta, como folhas, troncos, frutos e animais mortos (MADIGAN et al., 2010).

Há milhares de anos as leveduras têm sido utilizadas pelo homem, mesmo sem o seu conhecimento, nos processos de fermentação e, atualmente, novos potenciais biotecnológicos têm sido explorados na indústria. Especula-se que menos de 1% dos microrganismos são conhecidos, portanto, uma das justificativas para a investigação reside no fato de que uma ampla variedade de microrganismos potencialmente úteis ainda está por ser descoberta (STEELE; STOWERS, 1991). Uma das áreas onde esse potencial pode ser verificado é na produção de enzimas, devido a sua diversidade metabólica e facilidade de manipulação genética. Os microrganismos que apresentam naturalmente essa característica produtora de enzimas extracelulares têm a vantagem de serem aceitos e aprovados para a comercialização com mais facilidade do que os manipulados geneticamente (LANDELL, 2006; MAUTONE, 2008). A maior parte das lipases utilizadas

industrialmente são originadas de fungos ou bactérias (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

A triagem de microrganismos com potencial biotecnológico inicia-se com a seleção do microrganismo que possui a característica desejada. No presente estudo, pretende-se avaliar leveduras e fungos leveduriformes isolados a partir de macrófitas coletadas *in natura* e macrófitas em decomposição, condicionadas em *litter bags*, e verificar o potencial de produção de enzimas extracelulares, como a caseinase, gelatinase, esterase, lipase e amilase, além de avaliar sua capacidade de fermentação de xilose e glicose. As indústrias estão cada vez mais aumentando a utilização de enzimas livres isoladas de microrganismos para fabricar vários produtos, como xaropes, papel e têxteis. A demanda para essas enzimas é alta porque são específicas e não geram resíduos ou produtos tóxicos, já que as enzimas são biodegradáveis (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A importância deste trabalho reside no fato de contribuir com o conhecimento e verificação do potencial biotecnológico dos microrganismos (leveduras e fungos leveduriformes) presentes na área de marisma da Ilha da Pólvora e instigar a investigação do potencial bioquímico/biotecnológico dos microrganismos do nosso litoral. A hipótese do presente trabalho é a de que leveduras e fungos leveduriformes isolados a partir de plantas em decomposição produzam maior quantidade e variedade de enzimas extracelulares do que aquelas isoladas de macrófitas *in natura*.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi de analisar o potencial biotecnológico de levedurase e fungos leveduriformes isolados de macrófitas *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Scirpus maritimus* em decomposição e das mesmas espécies *in natura*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Agrupar os isolados de leveduras das espécies de macrófitas em decomposição e *in natura* com afinidade ascomicética, basidiomicética ou fungos leveduriformes.

- Testar o potencial biotecnológico e selecionar leveduras e fungos leveduriformes capazes de fermentar de glicose, xilose, e que produzam as enzimas esterase, amilase, caseinase e lipase, que potencialmente podem ser utilizadas na indústria.
- Calcular a atividade enzimática (Pz) das leveduras produtoras de enzimas e selecionar as que apresentarem maior atividade.
- Testar a hipótese de que as leveduras isoladas das macrófitas em decomposição produzam maior quantidade de enzimas extracelulares do que as leveduras que vivem associadas às macrófitas *in natura*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, os ambientes de marismas dominam o estado do Rio Grande do Sul e parte de Santa Catarina, ocupando 70 km² de área apenas nas margens e ilhas no estuário da lagoa dos Patos (MARANGONI, 2009; SILVA, 2008). As principais plantas colonizadoras das marismas baixas são as gramas rizomatosas e as macrófitas *Spartina densiflora*, *Spartina alterniflora*, além das Cyperaceae *Scirpus maritimus* e *Scirpus olneyi* (COSTA; MARANGONI, 2010). Os marismas são um dos ecossistemas naturais mais produtivos na terra, suportam uma rica diversidade biológica adaptada a áreas úmidas que mudam constantemente em função da maré, seja pelo maior aporte de água seja pela salinidade. As macrófitas são um importante componente da teia trófica devido a sua produtividade primária (ABREU *et al.*, 2006; COSTA, 1998). As espécies *S. alterniflora* e *S. densiflora* podem ser usadas como indicadoras de condições ambientais. Frequentemente, *S. alterniflora* ocorre em zona alagada por águas salobras ou salinas e fixa-se na margem deposicional do marisma. Já *S. densiflora*, fixa-se em margens erosivas e também em locais ocasionalmente alagados por águas salobras ou salinas (COSTA *et al.*, 1997).

Apesar da grande produção primária por parte das macrófitas, elas não são consumíveis diretamente pelos organismos estuarinos de níveis tróficos superiores. Por isso, a maior parte da produção primária não é consumida diretamente, mas como detrito gerado pelo processo de decomposição microbiana (DAY *et al.*, 1989).

Segundo Marangoni e Costa (2009), as marismas no estuário da Lagoa dos Patos vêm sendo suprimidas desde o século XIX pela expansão urbana, portuária e industrial, entretanto, nas últimas décadas, perdas de área foram causadas principalmente por processo natural (erosão). As atividades antrópicas no entorno das marismas vêm causando modificações na cobertura vegetal, afetando processos biológicos e ecológicos. A área de estudo, Ilha da Pólvora, é um dos poucos marismas consideravelmente bem preservados. Está localizada na porção mediana do estuário da lagoa dos Patos (32° S, 52° W; RS, Brasil), possui aproximadamente 45 hectares e sua extensão está quase toda coberta por vegetação típica de marismas (GANTES, 2011).

2.1 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

As enzimas possuem uma enorme aplicabilidade industrial e envolvem muito investimento e retorno financeiro com sua utilidade em indústrias, principalmente devido ao seu potencial em substituição aos processos que utilizam catalisadores químicos convencionais, assim tornam-se uma alternativa imprescindível ao desenvolvimento industrial sustentável (DAS, 2011). São extremamente importantes para as reações, pois têm a capacidade de acelerá-las através da diminuição da energia necessária para que se iniciem, e favorecem um aumento considerável da velocidade na qual ocorrem, pois sem a atuação destas, muitos dos processos necessários à vida em que as enzimas atuam seriam muito lentos ou mesmo não aconteceriam, como a respiração e a digestão animal (SILVA, 2011).

As enzimas como a lipase, protease, amilase e esterase são empregadas na indústria têxtil, de papel, de detergentes e alimentícia (KIRK; BROCHERT; FUGLSANG, 2002; VAN BEILEN; LI, 2002), na qual há a necessidade de que o microrganismo não secrete micotoxinas ou outras substâncias tóxicas e nem seja patogênico (FUNGARO et al., 1994). O interesse em utilizar enzimas naturais na indústria alimentícia vem crescendo (TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2003) desde que a utilização de aditivos e tratamentos químicos tornou-se uma preocupação para a saúde pública, o que faz da biocatálise e da tecnologia enzimática ferramentas promissoras para a síntese de compostos de alto valor agregado (FERNANDES, 2007).

2.2 LIPASES

Os lipídeos são constituídos por ácidos graxos e glicerol, são moléculas de armazenamento de energia e importantes componentes estruturais de todas as membranas celulares (BLAGOVIC et al., 2001). As enzimas responsáveis pela sua degradação são chamadas de lipases (glicerol éster hidrolases), que hidrolisam triacilgliceróis em ácido graxo e glicerol (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Após a liberação de ácido graxo e glicerol, cada um desses compostos é metabolizado separadamente. As lipases são capazes de catalisar uma ampla gama de reações como a hidrólise, interesterificação, transesterificação, alcoólise, acidólises, esterificação e aminólise. Estruturalmente, as lipases são definidas como

carboxil esterases, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeias alifáticas longas (BRANCO, 2008). Em meios não aquosos, também catalisam esterificação, interesterificação e transesterificação (KADEMI; LEE; HOUDE, 2003). Essa enzima é amplamente usada no processamento de gorduras e óleos, detergentes, formulação desengordurante, processamento de alimentos, síntese de produtos químicos e farmacêuticos, manufatura do papel e produção de cosméticos (KEBABCİ; CIHANGIR, 2011; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Também pode ser usada para acelerar a degradação de poliuretano (TAKAMOTO *et al.*, 2001). Sabe-se, também, que muitos microrganismos que degradam os ácidos graxos são capazes de utilizar as mesmas enzimas para degradar produtos do petróleo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Lipases produzidas por microrganismos, como leveduras, são mais estáveis quando comparadas com as produzidas por plantas e animais e podem ser obtidas a baixo custo. Também é considerada uma enzima mais pura do que a lipase pancreática de origem suína, que pode conter resíduos de hormônios e até vírus (VAKHLU; KOUR, 2006). Atualmente a espécie mais utilizada comercialmente para a obtenção de lipase é a *Candida rugosa*, porque além de produzir grande quantidade de lipase, ainda é considerada segura para a indústria alimentícia. As lipases também são usadas na indústria de couro para processamento de couros e peles e para o tratamento de lodos ativados e outros produtos residuais aeróbicos, onde eles removem a camada fina de gorduras. As lipases são esterases cuja ação sobre triglicerídeos é fortemente aumentada na interface lipídio-água, ao contrário das esterases verdadeiras. Este é um fenômeno conhecido como ativação interfacial (COLEN, 2006).

2.3 ESTERASE

A diferenciação entre esterases e lipases não é muito simples, tendo em vista que estas duas classes de enzimas participam de uma variedade de reações envolvendo inúmeros substratos e possuem alta diversidade. As esterases desempenham papel importante na degradação de materiais hemicelulósicos e na produção de compostos enantiomericamente puros, perfumes e antioxidantes, além da degradação de compostos químicos tóxicos gerados pela indústria do papel (FARIAS, 2008). Elas catalisam a hidrólise de ésteres alifáticos e aromáticos, têm

utilidade no desenvolvimento de aromas e sabores e na reação de quebra de inseticidas (DEGRASSI *et al.*, 1999). Sendo assim, é necessário testar a esterase e lipase com diferentes fontes, com a finalidade de evitar falsos positivos. Tsuboi, Komatsuzaki e Ogawa (1996) induziram a produção de esterase em *Candida spp.* a partir de éster de sorbitano etoxilado 80 (tween 80). A esterase é uma das principais enzimas utilizadas na produção de vinho (LLOYD; MORRIS; SMITH, 1971; SIBIRNY; VORONOVSKY, 2009). Atuam em ligações ésteres, das mais comuns à ligações específicas. Essa é uma enzima de interesse em diversos campos da indústria porque tem um papel muito importante na degradação de materiais naturais e poluentes industriais, como plásticos, sobras de grãos e tóxicos químicos. É útil para a síntese de compostos opticamente puros, perfumes e antioxidantes (PANDA; GOWRISHANKAR, 2005).

2.4 AMILASES

O amido é um polissacarídeo heterogêneo composto por amilose e amilopectina. É degradado pelas enzimas amilolíticas, presentes em plantas, animais e microrganismos. Dentre os microrganismos capazes de produzir a amilase estão fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A capacidade de assimilar o amido é conhecida em aproximadamente 150 espécies, mas poucas secretam uma enzima capaz de clivar ligações de alfa-(1,4) e alfa(1,6) de moléculas complexas de amido (FARIAS, 2008).

As amilases estão entre as mais importantes enzimas utilizadas nos processos biotecnológicos atuais, devido à crescente importância do amido e de açúcares na área da biotecnologia atual. Por exemplo, cervejas *light* utilizam amilases ou linhagens selecionadas de leveduras para converter uma maior quantidade do amido em glicose e maltose fermentável, resultando em menos carboidratos e mais álcool. A amilase tem diversas aplicações na indústria, podendo ser usada em segmentos como de alimentação, têxtil, papelaria, usadas em detergentes, produção de etanol a partir do amido, bebidas, e diversas outras aplicações, como na utilização de tratamento de resíduos de batatas, e frutas, por exemplo (DAS ET AL., 2011; STEELE; STOWERS, 1991). São utilizadas ainda na produção de xaropes a partir do amido de milho, na produção de papéis especiais,

na produção de glicose, adoçantes, bebidas fermentáveis e etanol (FARIAS, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.5 CASEINASE

A caseinase é uma protease, enzima que degrada uma proteína do leite, no caso, a caseína. A hidrólise da proteína libera aminoácidos e pequenos fragmentos de peptídeos. A caseína é uma mistura de fosfoproteínas encontrada no leite de mamíferos. Ela catalisa a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. É utilizada para detectar se o microrganismo tem atividade proteolítica e também se é possível utilizar comercialmente o microrganismo, como por exemplo na fabricação de queijo, produção de hidrolisados para sopas e pães (SILVA, 2011).

2.6 FERMENTAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE

As leveduras são responsáveis pela conversão de açúcares a etanol e também gás carbônico nos processos fermentativos, tanto a partir de cana-de-açúcar como de sorgo sacarino. Leveduras do gênero *Saccharomyces* são utilizadas na indústria brasileira de etanol e podem ser consideradas as principais responsáveis pela produção desse combustível no Brasil (ALMEIDA; FÁVARO, 2011).

As leveduras que fermentam a xilose são potenciais produtoras de etanol a partir de matéria estrutural vegetal (etanol de segunda geração). Assim como a glicose, a xilose faz parte da constituição de celuloses e hemiceluloses. A xilose é uma pentose e atualmente os organismos que têm sido modificados geneticamente para este fim ainda não possuem rendimento satisfatório, tornando o uso dessas leveduras pouco atrativo economicamente (FUGITA, 2010). Como as linhagens de *Saccharomyces* não são capazes de converter todos os açúcares provenientes da hemicelulose, incluindo a abundante xilose, outras espécies de leveduras têm sido analisadas para a produção de etanol. Podem apresentar duas vias na utilização da D-xilose, produzindo xilitol (produto intermediário ou final da reação) ou etanol (FUGITA, 2010; LOURENÇO, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODO

Os fungos leveduriformes e leveduras previamente isolados de *Spartina alterniflora*, *Spartina densiflora* e *Spartina maritimus*, escolhidas em virtude da abundância no local de estudo, foram cultivados em meio GYP (Glicose 2%, Ágar 2%, Peptona 1%, Extrato de levedura 0,5%), mantidos em estufa à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), por 72 horas. Após esse período, foram inoculados em tubos contendo 1,5ml de água destilada estéril, para que fosse feita a padronização do inóculo celular que é verificado utilizando o cartão de Wickerham (escala 0,5). Após, o método de replica-plate foi utilizado para os testes enzimáticos, sendo as leveduras inoculadas na superfície das placas de Petri contendo os meios específicos para cada enzima. O meio inoculado com as amostras foi incubado a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) por 7 dias, após, a leitura foi realizada. Os testes de fermentação em tubo foram inoculados com a ajuda de alça microbiológica e acompanhados nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 21 a seguir à realização do experimento.

As macrófitas em decomposição foram armazenadas em *litter bags* e colocadas de volta no marisma, sendo retiradas após 7, 14, 40 e 100 dias de decomposição para isolamento das leveduras. As coletas, tanto dos *litter bags* quando das macrófitas *in natura*, ocorreram nos dias 25 de junho, 2 de julho, 30 de julho e 29 de setembro do ano de 2012. Os isolados das leveduras e fungos leveduriformes foram previamente obtidos em outra etapa do projeto.

3.1 TESTE DBB

O diazonium Blue B test (DBB) é um teste químico que distingue as leveduras e fungos leveduriformes (*yeas-tlike*) em dois grandes grupos: ascomicetos e basidiomicetos (HAGLER; AHEARN, 1981; RIBEIRO, 2009). A parede celular das colônias basidiomicéticas reagem tingindo-se de rosa/vermelho escuro, ao contrário das ascomicéticas que não reagem com o DBB (DEÁK, 2008).

Segundo Madigan *et al.* (2010), leveduras basidiomicéticas possuem a característica unificadora dos basidiomicetos, que consiste na estrutura geralmente unicelular, chamada de basídio, na qual os basidiósporos são formados por meiose. E leveduras ascomicéticas produzem ascas, célula onde dois núcleos haploides,

provenientes de tipos de acasalamentos diferentes, unem-se e fundem-se, formando um núcleo diplóide, o qual sofre meiose, originando ascósporos haploides. O papel ecológico dos ascomicetos consiste principalmente na decomposição de matéria vegetal morta, porém um grande número de ascomicetos participa da simbiose com líquens.

O DBB foi realizado após o cultivo dos isolados em meio YCB-uréia, acrescido de fucsina ácida em quantidade até obter a cor rosa escuro, incubados junto com o controle positivo (isolado DBB positivo), a 25°C por 72 horas. Quando o isolado possuía a capacidade de produzir urease, o meio foi alterado para a cor branca. Após, os tubos foram incubados a 60°C por até 16 horas. O reagente DBB foi solubilizado em uma solução de 0,25 M de tris-HCl, e ao colocarmos o reagente em contato com os isolados que possuem afinidade basidiomicética, as colônias tornam-se rosa-pink. Aqueles que não reagiram ao reagente foram agrupados como tendo afinidade ascomicética. Esse teste foi validado em 1981 por Hagler e Ahearn e ainda hoje é utilizado (GHOSH; SANTRA; CHAKRAVARTY, 2013; SUH *et al.*, 2006; MAUTONE, 2008).

3.2 TESTES BIOQUÍMICOS

Os testes bioquímicos foram executados conforme Landell (2006) e Mautone (2008).

3.2.1 Fermentação

A fermentação de açúcares é um processo metabólico de oxidação-redução que ocorre em anaerobiose onde um substrato orgânico serve como acceptor final de hidrogênio (FRANZOLIN, 2008). Os isolados foram testados em meio de fermentação para glicose e xilose.

3.2.1.1 Glicose

O meio de fermentação de glicose é composto por 0,75% de peptona, 0,45% extrato de levedura, 2% glicose. O meio é homogeneizado e distribuído, 3ml por tubo, com tubos de Durham já em seu interior, o ar de dentro dos tubos é totalmente

expulso e os tubos são esterilizados em autoclave. O resultado positivo e quantificação da fermentação da glicose foi avaliado pela presença de bolha de gás dentro do tubo de Durham, com quantificação da área do tubo ocupada pela bolha.

3.2.1.2 Xilose

O teste de fermentação de xilose foi realizado apenas com as leveduras fermentadoras de glicose em função de seu potencial fermentativo, uma vez que para a indústria do etanol, o mais interessante para a produção seriam leveduras capazes de fermentar hexoses e pentoses.

O protocolo seguido é idêntico ao da fermentação de glicose, exceto que adicionamos 2% de xilose, no lugar da glicose. O resultado é também conferido da mesma maneira.

3.2.2 Produção de enzimas

Os testes foram todos realizados em meio sólido e em placas de Petri. Esses meios foram inoculados através da técnica de replica-plate, incubados durante 7 dias a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Todos os resultados são lidos como positivos através da observação da formação de um halo em volta das colônias. O cálculo de atividade enzimática (Pz) das colônias positivas é feito através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais o halo, conforme Price *et al.* (1982). Quanto menor o valor do Pz, maior é a capacidade de produção dos isolados. Um bom desempenho na avaliação de atividade enzimática é um indicador importante no potencial econômico de uma cepa (FARIAS, 2008). Os meios foram esterilizados em autoclave, exceto o teste de caseinase cujo meio foi pasteurizado, pois as proteínas leite não suportam calor excessivo e sofrem desnaturação.

3.2.2.1 Amilase

Os isolados foram cultivados em placas contendo o meio composto por: 0,67% de YNB (Yeast Nitrogen Base), 0,2% de amido solúvel e 2 % de ágar. Os isolados capazes de degradar o meio formam ao redor da colônia um halo

translúcido, após a adição de lugol. As medidas de halo e colônia foram realizadas através de um paquímetro digital.

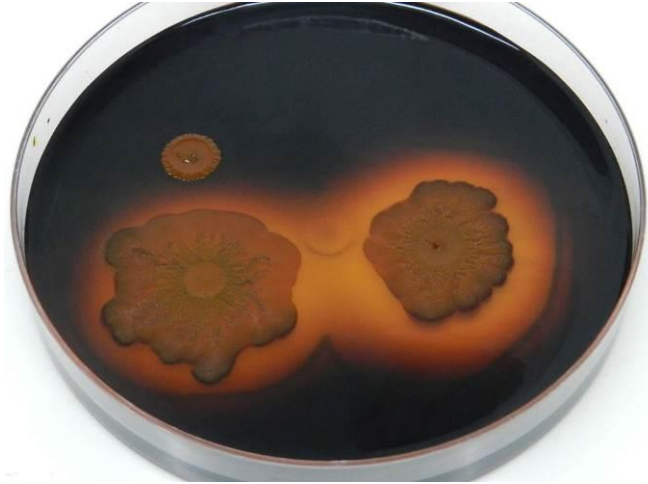


Figura 1. Atividade amilolítica. Fonte: Belize Leite

3.2.2.2 Caseinase

A caseinase é uma protease. Os microrganismos capazes de produzir proteases são utilizados na indústria de alimentos nos processos de fermentação e produção de alimentos. O meio é composto por 0,67% de YNB, 0,5% glicose, 5% de leite desnatado em pó e 2% ágar. As colônias que degradaram a caseína formaram um halo translúcido ao seu redor.



Figura 2. Atividade caseinolítica. Fonte: Belize Leite

3.2.2.3 Esterase

Para a produção do meio, são adicionados 0,1% glicose, 1% peptona, 0,5% cloreto de sódio, 0,01% cloreto de cálcio, 2,5% tween 80 e 2 % ágar. As leveduras que produziram a enzima esterase formaram um halo esbranquiçado ao redor da colônia.

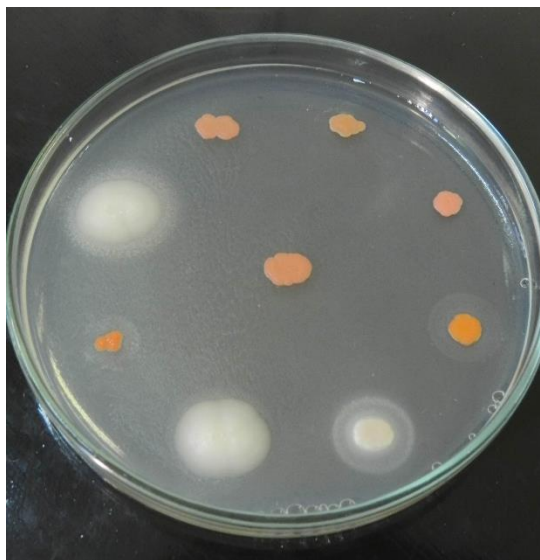


Figura 3. Atividade esterase. Fonte: Belize Leite

3.2.2.4 Lipase

A detecção de lipase apresenta um problema particular na sua detecção, devido à falta de especificidade aparente nas lipases conhecidas e os problemas na distinção entre lipases verdadeiras e esterases. Utilizamos então o teste em Ágar Tributirina para separar os microrganismos produtores de lipase. Mesmo não sendo um meio verdadeiramente específico para esse objetivo, é um meio de fácil diluição em água e amplamente utilizado para avaliação de produção de lipase (STEELE; STOWERS, 1991).

O teste de produção de lipase foi feito em placa de Petri contendo o meio composto por 2% peptona, 0,1% extrato de levedura, 0,5% cloreto de sódio, 2% ágar, 1 % de tributirina líquida. A leitura dos resultados positivos ocorreu por meio da verificação de um halo translúcido, perceptível quando a placa é colocada contra a luz.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Verificou-se a normalidade dos resultados por meio do teste de Shapiro-Wilk, onde $\alpha = 0,05$. Para verificar a diferença entre as médias em uma distribuição normal, utilizou-se o teste ANOVA. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se teste não paramétrico para calcular diferença estatística entre os grupos de macrófitas, filo e fungos leveduriformes. A verificação da existência de diferença estatística entre as médias em teste não paramétrico deu-se pela comparação múltipla da média do ranking dos grupos, pois não possuíam um número amostral idêntico. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

O número de isolados pode ser observado na Tabela 1, separado por tipo de teste enzimático realizado. Os isolados foram testados numa primeira etapa denominada *screening*. Posteriormente, isolados com atividade enzimática positiva tiveram os testes repetidos mais duas vezes. A coluna “Teste em triplicata” representa os isolados testados em três momentos diferentes quanto a sua atividade enzimática (Pz), a fim de utilizar os dados nos testes estatísticos. Os isolados não puderam ser todos testados em triplicata em função de contaminação enfrentada durante o processo de *screening*. Utilizou-se sempre como controle um isolado positivo no teste de *screening*.

Isolados com $Pz = 1$ foram considerados negativos, $Pz \geq 0,64 < 1$ foram considerados fracamente positivos e $Pz < 0,64$ fortemente positivos (COSTA, 2006; PRICE *et al.*, 1982; RIBAS; MARCHESAN; ONOFRE, 2009).

Tabela 1. Número de isolados testados quanto à produção de enzimas extracelulares.

Número de isolados testados								
Enzimas	<i>In natura</i>	Positivos	Negativos	Teste em triplicata	Decomposição	Positivos	Negativos	Teste em triplicata
Lipase	75	61	14	46	88	75	14	44
Esterase	66	36	30	19	86	48	38	29
Amilase	56	20	36	16	85	24	61	10
Caseinase	52	10	42	8	73	21	52	15

4.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram empregadas para elucidar questões sobre as diferenças de produção de enzimática entre os grupos Ascomycota, Basidiomycota e fungos leveduriformes. E também entre as três espécies de macrófitas utilizadas para obter os isolados.

4.1.1 Teste DBB

Foram obtidos 88 isolados de macrófita em decomposição e 63 de macrófitas *in natura*. Das macrófitas em decomposição 27,36% apresentaram

afinidade ascomicética, 46,31% basidiomicética, representada pela reação positiva ao corante DBB, e 26,31% são fungos leveduriformes, Das macrófitas *in natura* 72,6% apresentaram afinidade ascomicética 16,06% basidiomicética e 12,32% fungos leveduriformes.

4.1.2 Análise da produção enzimática das leveduras isoladas das macrófitas em decomposição

Os resultados da atividade enzimática (valores médios) dos fungos leveduriformes e das leveduras encontram-se nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Para os fungos leveduriformes, verificou-se atividade fortemente positiva para a produção de lipase (13 isolados), esterase (6 isolados), amilase (7 isolados) e caseinase (1 isolado). Para as leveduras, valores de atividade fortemente positivos foram constatados na produção de todas as enzimas testadas. Os melhores resultados de atividade enzimática foram para lipase (17 isolados, 10 ascomicetos e 7 basidiomicetos); em segundo lugar para esterase (12 isolados, 7 ascomicetos e 5 basidiomicetos); em terceiro lugar para amilase (2 isolados, 1 ascomiceto e 1 basidiomiceto); e em último lugar para caseinase (4 isolados, todos ascomicetos).

Tabela 2. Média da atividade enzimática (Pz) dos fungos leveduriformes isolados de macrófitas em decomposição. "0" = isolado não possui atividade enzimática. "-" = isolado não testado.

Atividade enzimática (Pz): Fungos leveduriformes									
Isolados	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase	
DEC 02	-	0,40184	-	-	DEC 52	0,4167	0,5683		0,7714
DEC 13	0,4471	0,5987	0,4846	0	DEC 63	0,5768	0	0	0
DEC 14	0,3784	0,6893	0,6160	0,8172	DEC 62	-	-	0	0
DEC 15	-	-	0	-	DEC 68	0,4893	0,6651	0	0
DEC 18	-	-	-	0,2644	DEC 82	-	-	-	0
DEC 20	0,5088	0	0,5225	0	DEC 83	-	0	0,2857	0
DEC 21	0,4470	0,6237	0	0	DEC 86	0,4274	0,6914	0,4588	0,8245
DEC 22	0,5282	0,7463	0,5377	1	DEC 91	0,6769	0,5973	0	0,7526
DEC 23	0,5114	0,5963	0,8138	-	DEC 80	0,8423	0,8097	-	0
DEC 25	-	-	0,5473	-	DEC 81	-	0	0	0
DEC 29	0	0	-	-	DEC 84	0,4235	0	0	0
DEC 31	0		-	-	DEC 17	0,5651	0,6878	0	0,7863
DEC 32	0,6384	0	0	1					

Tabela 3. Média enzimática das leveduras isoladas testadas, separadas por filo, para cada enzima

Isolados	Atividade enzimática (Pz): Ascomycota					Atividade enzimática (Pz): Basidiomycota				
	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase		Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase	
DEC 01	-	-	-	0		DEC 03	-	-	0	-
DEC 06	0,6775	0	0	0		DEC 05	0,3739	0	0	0,4326
DEC 08	0,1309	0,1985	-	0		DEC 07	0,3142	0,3139	-	0
DEC 12	-	0	0	0		DEC 10	-	0	-	-
DEC 19	0,2902	0,5039	-	0		DEC 11	0	0	0	-
DEC 26	0,5478	0,7179	0	-		DEC 34	0,2959	0,3444	0	-
DEC 27	0,3674	-	0	-		DEC 35	0,6423	0	0	0
DEC 36	-	0	0	0		DEC 38	0	0,4225	0	0,7807
DEC 37	0,5281	0,6381	0	-		DEC 39	0,2671	0	0	0
DEC 41	0,5253	0,6285	0	0		DEC 42	0,7118	-	0	0
DEC 44	0,5540	0,6198	0	0		DEC 43	0	-	0	0,7494
DEC 46	-	0,8010	0,2073	0,1270		DEC 45	0	0	-	0
DEC 47	-	0,3607	0	0		DEC 48	-	-	-	0
DEC 51	0,6773	0	0	-		DEC 49	0,4419	-	0	0
DEC 59	-	0	0	0		DEC 50	0	0	-	0
DEC 61	-	0	-	0		DEC 53	0,6301	0	0	-
DEC 65	0,5448	0,5916	-	0		DEC 55	0,6579	0	0	-
DEC 66	0,7278	0,7682	0	0,5635		DEC 56	0,4444	0,6308	0	0
DEC 70	-	-	0	0		DEC 57	-	0	0	-
DEC 71	0,5256	-	0	0		DEC 58	-	0	0,2963	0
DEC 72	0,8127	-	0	1		DEC 60	0	0	0	-
DEC 75	-	0	0	0,2110		DEC 64	-	-	0	-
DEC 77	0,5766	0,6420	0	0		DEC 67	-	-	-	0
DEC 78	0,6437	0,7471	0	0						

O grupo dos fungos leveduriformes apresentou maior número de produtores enzimáticos, exceto para a lipase que teve um maior número de produtores por parte do filo Ascomycota (Figura 4). As análises estatísticas das médias dos produtores de enzima extracelulares dos isolados das macrófitas em decomposição não apresentaram diferença significativa, independentemente se analisadas entre os filios (Figura 5) ou entre as diferentes macrófitas (Figura 6).

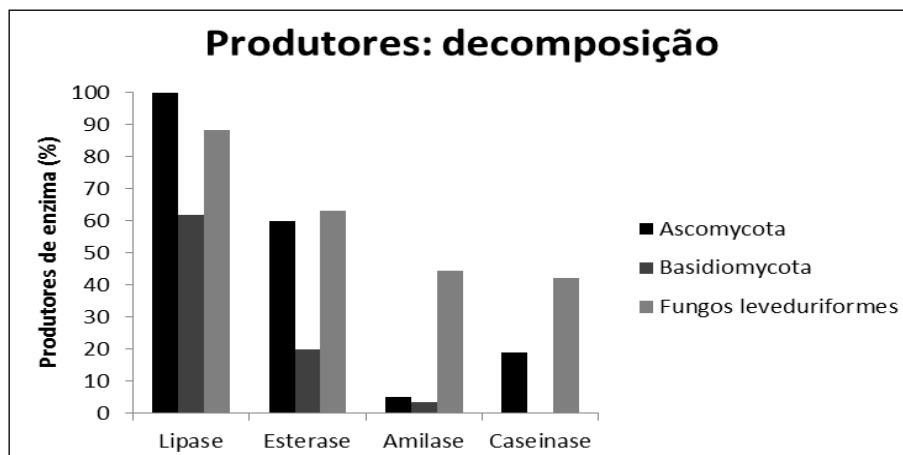


Figura 4. Porcentagem de produtores de enzimas dos filios Ascomycota e Basidiomycota e do grupo dos fungos leveduriformes. Fonte: o autor.

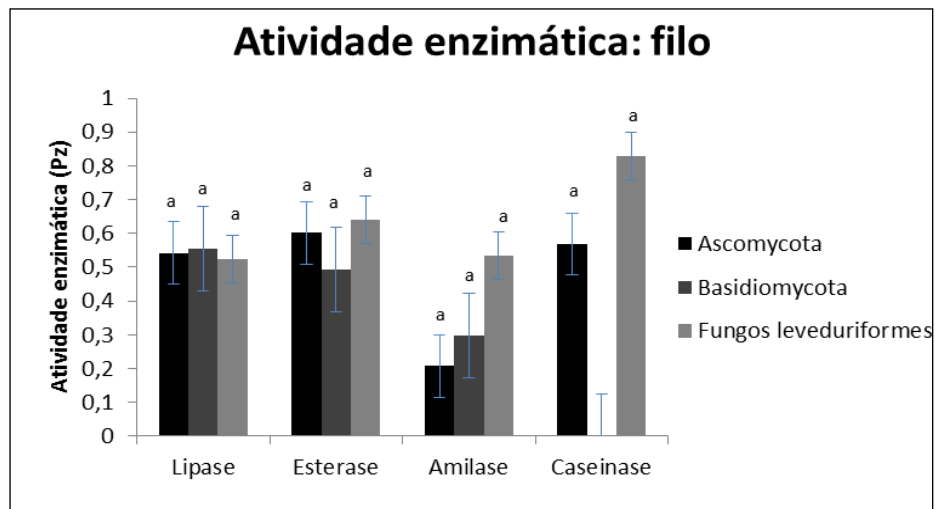


Figura 5. Média de atividade enzimática dos isolados produtores de enzimas provenientes de macrófitas em decomposição em nível de filo e fungos leveduriformes. Letras iguais significam que não houve diferença estatística significativa entre as médias. Lipase: $p=0,7420$; Esterase: $p=0,3258$; Amilase: $p=0,1175$; Caseinase: $p=0,1508$. Fonte: o autor.

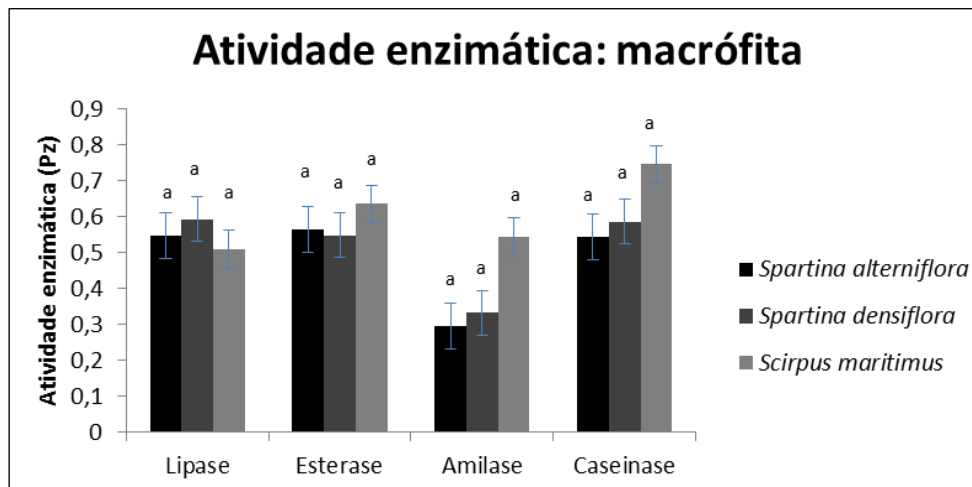


Figura 6. Média de atividade enzimática dos isolados produtores de enzimas de macrófitas em decomposição em nível de filo. Letras iguais significam que não houve diferença estatística significativa entre as médias. Lipase: $p > 0,5211$; Esterase: $p < 0,5621$; Amilase: $p = 0,1517$; Caseinase: $p = 0,19$. Fonte: o autor.

4.1.2.2 Capacidade fermentativa

Foram testados 48 isolados quanto a sua capacidade fermentativa. O acompanhamento deu-se nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 14 e 21 após a inoculação dos tubos. Sete isolados apresentaram capacidade fermentativa e apenas dois apresentaram capacidade máxima de saturação por gás dos tubos de Durham (leitura 3) no quarto dia de leitura. Nenhum isolado foi capaz de fermentar xilose.

4.1.3. Análise da produção enzimática das leveduras isoladas das macrófitas *in natura*

Os resultados da atividade enzimática (valores médios) dos fungos leveduriformes e das leveduras encontram-se nas tabelas 4 e 5, respectivamente. Para os fungos leveduriformes, verificou-se atividade fortemente positiva para a produção de lipase (8 isolados), esterase (1 isolado) e amilase (6 isolados). Para as leveduras, valores de atividade fortemente positivos foram constatados na produção de todas as enzimas testadas. Os melhores resultados de atividade enzimática foram para lipase (36 isolados, 32 ascomicetos e 4 basidiomicetos); em segundo lugar para esterase (15 isolados, 12 ascomicetos e 3 basidiomicetos); em terceiro

lugar para amilase (10 isolados, 8 ascomicetos e 2 basidiomicetos); e em último lugar para caseinase (2 isolados, todos ascomicetos).

Tabela 4. Média de atividade enzimática dos fungos leveduriformes de macrófitas *in natura*. “0” = isolado não possui atividade enzimática. “-” = isolado não testado.

Atividade enzimática (Pz): Fungos leveduriformes									
Isolados	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase	
B01	0,5117	0	0	0	B36	0	-	0,4663	0,8406
B03	0,2932	0,6109	0,5137	0,8719	B37	0,4431	0	0,5128	-
B11	0,5166	0	0,3383	0	B52	0,5704	0	0,3969	-
B12	0,4822	0	0,5134	-	B81	0,6798	0,6733	0	0,8466
B32	0,6262	0	0	0,8758	B85	0,4087	-	0	-

Tabela 5. Média de atividade enzimática das leveduras isoladas de macrofitas *in natura* para cada enzima testada.

Isolados	Atividade enzimática [Pz]: Ascomycota										Atividade enzimática [Pz]: Basidiomycota					
	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase	Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase
B04	0,2190	-	0,2429	0	B45	0,3205	0	-	B83	0	-	-	B39	0,6240	-	0
B06	-	0,4782	0,2679	0	B46	0,3569	0	-	B87	0,1576	0,4015	0,2002	B43	0	-	0
B08	0,1603	0,2459	0,1363	0	B54	0,5577	0,125	-	B88	0,2573	0,3162	0	B50	-	-	0
B09	0,2511	0,6960	0,4839	0	B57	0	-	-	B89	0,3655	0,3823	0	B67	0	-	-
B10	-	0	0	0	B59	0,5885	-	-	B92	0	0,2868	0	B73	0,4248	-	0
B13	0,3972	0,7492	0,6067	0,6599	B62	0	-	-	B93	0,4472	0,4808	0,2975	B74	0,5038	0,5576	0,4751
B14	0,4161	0	0	0	B63	0,5856	0	-	B94	0,3281	0	0	B84	0,1423	0,2476	0,2816
B16	0	0,4360	-	0,5322	B64	0	0	-	B95	0,4445	0,4063	0	B86	0	0,4491	-
B17	0,4086	-	0	0	B65	0,3909	0,6863	0	0	-	-	-	B90	-	-	0
B18	0,5810	0,1389	0	0	B66	0,5990	0	0	0,2976	-	-	-	-	-	-	-
B20	0,4119	0	0	0	B68	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B22	-	0	0	0	B69	0,6149	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
B23	0,8261	0	0	0	B70	0,4565	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
B24	0,5562	0	0	0	B71	0,4900	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
B25	0	0	0	0	B72	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
B26	-	-	0	0	B75	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
B38	0,5908	0	0	0	B78	0,4286	0,5447	0	0	-	-	-	-	-	-	-
B40	0,5983	0	-	0	B80	0,2782	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
B44	0,5228	0	-	0	B82	0,387258527	0	0,3091	0	-	-	-	-	-	-	-

Os grupos, Ascomycota, Basidiomycota e fungos leveduriformes variaram quanto a produção das diferentes enzimas, os fungos leveduriformes apresentaram mais produtores de lipase e esterase, enquanto que as leveduras pertencentes ao filo Basidiomycota produziu mais esterase e amilase (Figura 7). As análises estatísticas das médias dos produtores de enzima extracelulares dos isolados das macrófitas *in natura* também não apresentaram diferença significativa em nenhuma das análises estatísticas, entre os filios (Figura 8) ou entre as diferentes macrófitas (Figura 9).

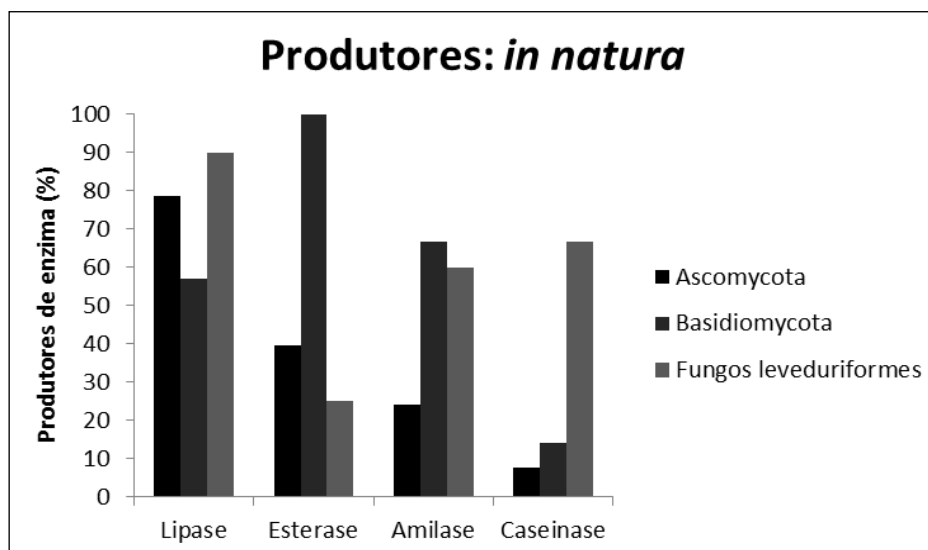


Figura 7. Porcentagem de isolados de macrófitas *in natura* produtores de enzimas. Fonte: o autor.

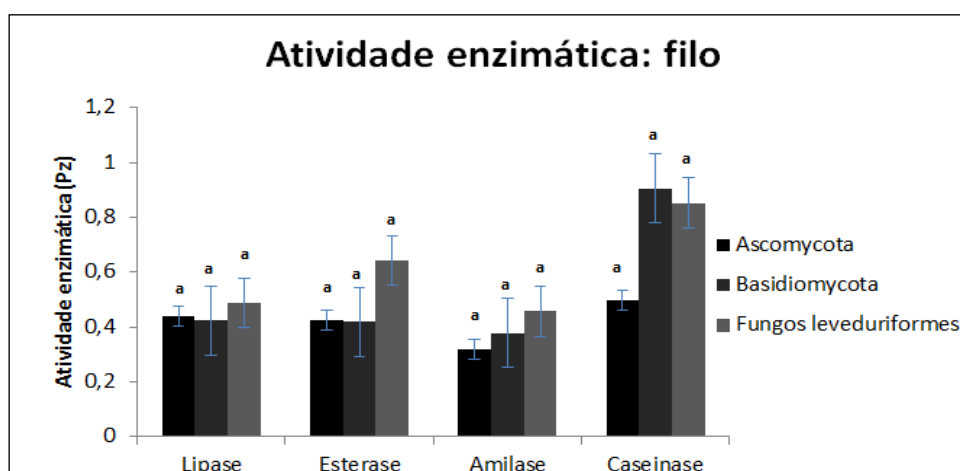


Figura 8. Média de atividade enzimática dos isolados produtores de enzimas provenientes de macrófitas *in natura* em nível de filo e fungos leveduriformes. Letras iguais significam que não houve diferença estatística significativa entre as médias. Lipase: $p=0,6684$; Esterase: $p=0,2949$ Amilase: $p= 0,1718$; Caseinase: $p = 0,05$. Fonte: o autor.

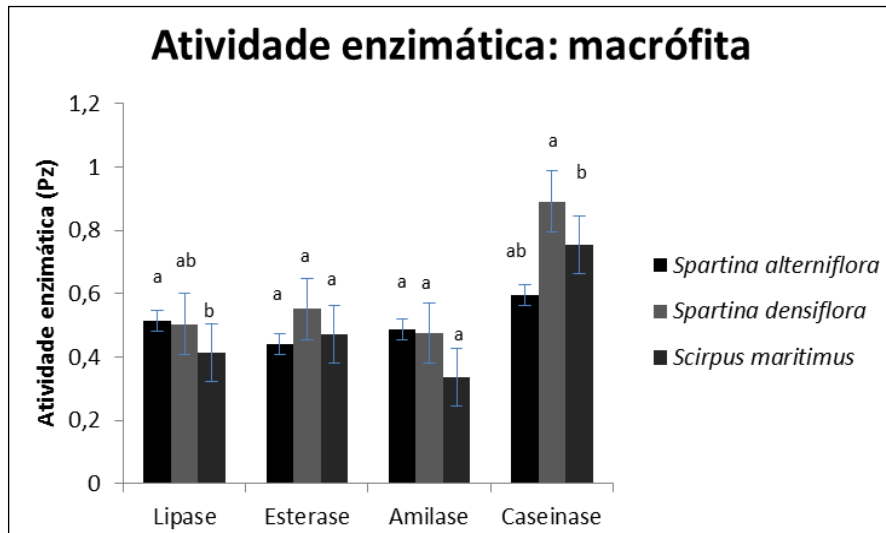


Figura 9. Média de atividade enzimática dos isolados produtores de enzimas de macrófitas *in natura* em nível de filo. Letras iguais significam que não houve diferença estatística significante entre as médias. Lipase: *S. alterniflora* x *S. maritimus* $p= 0,0469$; Esterase: $p= 0,8453$ Amilase: $p= 0,2776$; Caseinase: *S. densiflora* x *S. maritimus* $p = 0,0455$. Fonte: o autor.

4.1.3.1. Capacidade fermentativa dos isolados de macrófitas *in natura*

Dos 42 isolados testados quanto a sua capacidade fermentativa de glicose, 14 isolados foram positivos. Dois isolados fermentaram no segundo dia de experimento, dois isolados no terceiro dia e o restante a partir do quarto dia. Nenhum apresentou capacidade máxima de fermentação. Nenhum isolado foi capaz de fermentar a xilose.

4.2 ANÁLISE DE HIPÓTESE

A hipótese de que as leveduras e os fungos leveduriformes isolados de macrófitas em decomposição produziram maior quantidade de enzimas e maior atividade enzimática foi refutada. Ao interpretar o gráfico (Figura 10) percebe-se que os isolados das macrófitas *in natura* apresentaram maior atividade enzimática e tiveram diferença significativa quanto à média de produção de lipase e esterase. A maior parte dos isolados apresentaram uma atividade enzimática interessante para aplicação biotecnológica. Na tabela abaixo (Tabela 6) estão apresentadas as melhores médias de atividades para cada grupo.

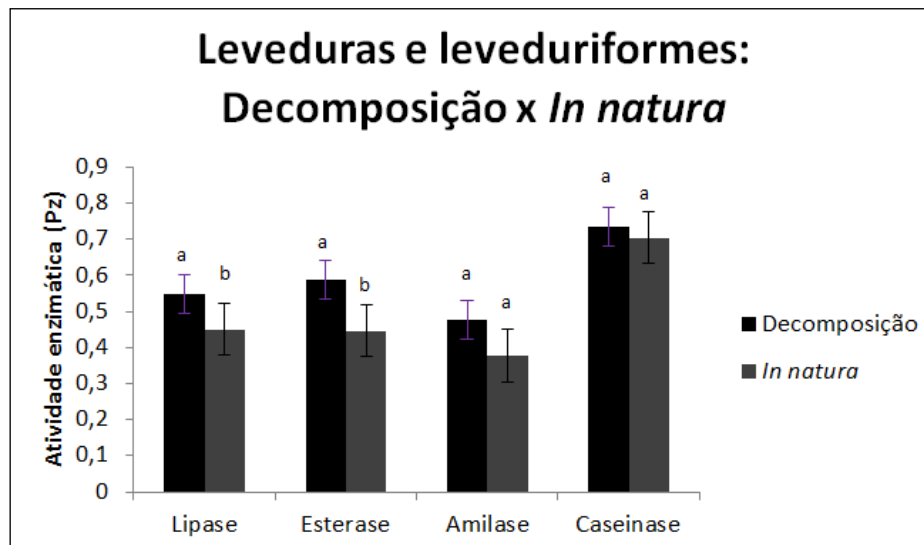


Figura 10. Média das atividades enzimáticas dos isolados produtores de enzimas extracelulares provenientes das macrófitas *in natura* e em decomposição. Letras iguais significam que não houve diferença estatística significativa entre as médias. Lipase: $p = 0,0082$; Esterase: $p = 0,0104$; Amilase: $p = 0,1138$; Caseinase: $p = 0,7353$. Fonte: o autor.

Tabela 6. Isolados que apresentaram melhor média de atividade enzimática por grupo. Fonte: o autor.

Macrófita em decomposição (Pz)					
		Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase
Ascomycota	Dec 08	0,13	0,19		
	Dec46			0,2	0,12
Basidiomycota	Dec 17				0,78
	Dec 39	0,26			
	Dec 58			0,29	
	Dec 74		0,43		
Fungos leveduriformes	Dec 02		0,401		
	Dec 14	0,378			
	Dec 18				0,264
	Dec 83			0,285	
Macrófita <i>in natura</i> (Pz)					
		Lipase	Esterase	Amilase	Caseinase
Ascomycota	Bel 54		0,125		
	Bel 08			0,136	
	Bel 66				0,297
	Bel 87	0,157			
Basidiomycota	Bel 74				0,905
	Bel 84	0,142	0,247	0,281	
Fungos leveduriformes	Bel 03	0,293	0,610		
	Bel 11			0,338	
	Bel 36				0,840

4.2.1 Análise entre macrófita em decomposição e *in natura*

A análise estatística das médias de atividade enzimática entre cada espécie de macrófita em decomposição e *in natura* apontou diferença significativa apenas para *Scirpus maritimus* nas enzimas amilase e esterase, que apresentou maior atividade para as leveduras isoladas das macrófitas *in natura* (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de significância de p , entre macrófitas *in natura* e em decomposição, na diferença entre as médias. Valores estatisticamente significativos estão em negrito.

Macrófita em decomposição X <i>in natura</i> : valor de p			
Enzimas	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Spartina densiflora</i>	<i>Scirpus maritimus</i>
Lipase	0,4062	0,4845	0,0871
Esterase	0,406	0,4835	0,0423
Amilase	0,3508	0,2207	0,0085
Caseinase	0,1213	0,4028	0,2733

5 DISCUSSÃO

As macrófitas são os principais produtores primários de ambientes aquáticos como os marismas. Sabe-se que a disponibilização de matéria orgânica de plantas senescentes ocorre a partir da degradação de microrganismos, como fungos e bactérias heterotróficas capazes de produzir um conjunto de enzimas hidrolíticas. Este complexo enzimático vai depender, em termos qualitativos e quantitativos, da disponibilidade de nutrientes e das populações capazes de crescer sob determinadas condições (CHRÓST *et al.*, 1986). Segundo Chróst (1990), as enzimas associadas a microrganismos são as principais responsáveis por um grande número de transformações de matéria orgânica e inorgânica nos ambientes aquáticos. Em função disso, trabalhamos com a hipótese de que os microrganismos isolados das macrófitas em decomposição seriam melhores produtores de enzimas.

O resultado interessante dos testes é que os basidiomicetos predominaram nas macrófitas em decomposição, e segundo a literatura, eles conseguem utilizar uma ampla gama de compostos de carbono, em baixas concentrações, de forma mais eficiente em superfície e substratos que possuem componentes mais complexos como folhas e solos. Já os ascomicetos, predominantes nas macrófitas *in natura*, são especializados em nichos que tendem a ser ricos em carbono orgânico e em açúcar (KUTZMAN; FELL, 1998; SANTOS *et al.*, 1997; SUH *et al.*, 2006). Todas as leveduras isoladas do material em decomposição foram capazes de produzir algum tipo de enzima com interesse biotecnológico. Algumas apresentaram uma alta atividade enzimática, mostrando o grande potencial presente no ambiente natural estudado. A predominância de isolados com afinidade ascomicética ou basidiomicética tem demonstrado variar de acordo com o tipo de substrato foliar estudado. Fuentesfria (2004) isolou uma quantidade maior de leveduras ascomicéticas ao analisar o filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis* (*in natura*), enquanto Landell (2006) isolou mais leveduras basidiomicéticas do filoplanos de bromélias. Segundo Carmo-Souza (1969), as espécies de leveduras capazes de utilizar grande variedade de compostos são mais frequentemente encontradas no filoplano, já que as fontes de carbono simples estão presentes em concentrações muito baixas nesse habitat.

Assim como no trabalho de Landell (2006), os fungos leveduriformes, isolados do filoplano de bromélias, da Mata Atlântica, apresentaram maior número de produtores de lipase, mas diferiu do trabalho de Fuentefria (2004) que encontrou como predominante de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis* leveduras basidiomicéticas. Segundo o trabalho de Buzzini e Martini (2002), em leveduras isoladas de ambiente tropical, a maior ocorrência de isolados produtores de lipase foi em ascomicetos e a produção de esterase associada a basidiomicetos. Como no trabalho de Landell (2006), a maioria dos isolados do filoplano eram basidiomicetos, mas ao contrário do trabalho da autora, nenhum isolado basidiomicético foi capaz de degradar a caseína no presente estudo. Mautone (2008) verificou que os fungos leveduriformes do filoplano de figueiras foram os maiores produtores de amilase, cerca de 50%, assim como no presente trabalho, cerca de 60% dos nossos isolados apresentaram atividade amilolítica. Buzzini e Martini (2002) também encontraram atividade amilolítica maior em fungos leveduriformes. Os fungos leveduriformes também foram isolados em maior número nas macrófitas em decomposição e apresentaram um número maior de isolados produtores de enzimas, exceto para lipase, produzida por um maior número de isolados ascomicota. A variação da abundância e do poder de produção das enzimas extracelulares entre os filoplano e os trabalhos discutidos anteriormente certamente está relacionado, além do tipo de substrato foliar, ao tipo de ambiente.

No presente trabalho, o maior número de produtores lipolíticos para macrófitas em decomposição foi de ascomicetos, já para macrófitas *in natura*, foi de fungos leveduriformes, seguidos pelos ascomicetos. Estatisticamente não é possível afirmar qual dos grupos apresenta maior atividade enzimática, pois não foi encontrada diferença significativa. Menos de 40% dos fungos leveduriformes apresentaram atividade proteolítica, ainda assim, foi o grupo com a maior porcentagem de isolados com essa capacidade. Segundo Kurtzman e Fell (1998), geralmente ascomicetos são mais fermentativos e especializados nutricionalmente do que os basidiomicetos. O resultado encontrado com o teste fermentativo para a glicose corrobora com o encontrado por esses autores.

Os resultados obtidos ao compararmos isolados de macrófitas em decomposição com isolados de macrófitas *in natura* corroboram com a hipótese testada. Quantitativamente, com uma porcentagem maior de isolados produtores de enzimas provenientes de macrófitas em decomposição. E qualitativamente, por

apresentarem diferença estatística para a produção de lipase e esterase e não apresentarem diferença para a produção de amilase e caseinase. A alta produção de lipase e esterase nas macrófitas *in natura* pode ser devido ao fato das leveduras terem que quebrar a parede cuticular, estrutura presente na superfície foliar das plantas, sendo mais desenvolvida em plantas terrestres e mais finas em plantas aquáticas. A cutina possui um papel importante contra a dessecação das partes aéreas de uma planta e apesar de reduzida, está presente nas macrófitas (STEIN, 2011; TRINDADE *et al.* 2010). Segundo Landell (2006), a cutina é lipídica e pode estar sendo utilizada como nutriente pelas leveduras saprófitas associadas às folhas. Com relação aos isolados provenientes de macrófitas *in natura* ainda, houve diferença estatística quando as atividades enzimáticas (lipolítica e proteolítica) foram analisadas entre as diferentes macrófitas. Também houve diferença estatística entre a produção de amilase (fonte de carbono) e esterase em *Scirpus maritimus* onde a maior atividade enzimática pertenceu a macrófita *in natura*.

Estatisticamente, os grupos Ascomycota, Basidiomycota e fungos leveduriformes de macrófitas *in natura* e em decomposição não apresentaram diferença significativa entre as atividades enzimáticas. O fato de haver diferença significativa entre as médias de esterase e caseinase de *S. alterniflora* e *Scirpus maritimus* pode indicar diferença nas necessidades nutricionais das leveduras ou ainda na diferença da composição foliar da macrófita *in natura*.

6 CONCLUSÃO

- Foram obtidos 88 isolados de macrófita em decomposição e 63 de macrófitas *in natura*. Das macrófitas em decomposição 27,36% apresentaram afinidade ascomicética, 46,31% basidiomicética, representada pela reação positiva ao corante DBB, e 26,31% são fungos leveduriformes. As macrófitas *in natura* apresentaram 72,6% isolados com afinidade ascomicética 16,06% basidiomicética e 12,32% fungos leveduriformes..

- Vários isolados apresentaram forte atividade enzimática. Para os isolados de macrófitas *in natura*, os Ascomycota testados em triplicata, 32 apresentaram $Pz < 0,64$ para lipase, 12 para esterase, 8 para amilase e 2 para atividade proteolítica. Já os Basidiomycota apresentaram quatro isolados com $Pz < 0,64$ para lipase, três para esterase, dois para amilase e nenhum para atividade proteolítica. Os isolados classificados como fungos leveduriformes apresentaram 7 isolados com $Pz < 0,64$ para lipase, um para esterase, 6 para amilase e nenhum para atividade proteolítica.

- Para os isolados de macrófitas em decomposição testados em triplicata, 10 isolados de Ascomycota apresentaram $Pz < 0,64$ para a lipase, 7 para esterase, 1 para amilase e quatro para atividade proteolítica. Os Basidiomycota tiveram 9 isolados com $Pz < 0,64$ para lipase, cinco para esterase, 8 para amilase e nenhum para atividade proteolítica. Os isolados classificados como fungos leveduriformes apresentaram 12 com $Pz < 0,64$ para lipase, 6 para esterase, três para amilase e um para atividade proteolítica.

- Os basidiomicetos são mais capazes de degradar substratos complexos e estão presentes em maior número no material em decomposição isso pode significar que estes isolados estão atuando na decomposição das macrófitas. Não houve diferença significativa entre a atividade enzimática dos grupos de decomposição e *in natura*, exceto para esterase e amilase. Esta alta produção de lipase e esterase dos isolados de macrófitas *in natura* deve ser devido ao fato da superfície foliar apresentar uma parede composta por cutina, um substrato lipídico.

- Para investigar melhor a ecologia das leveduras e fungos leveduriformes na decomposição de matéria vegetal, sugere-se testar a produção de celulase, pois são os microrganismos capazes de degradar compostos

lignocelulósicos que estão diretamente envolvidos na degradação do material vegetal. E ainda analisar a variação temporal e ambiental na composição das leveduras isoladas de macrófitas em decomposição.

- Como perspectiva, é possível utilizar o trabalho ainda para fazer uma relação das leveduras com a qualidade do ambiente, onde já foi reportado que leveduras basidiomicéticas são encontradas em águas de estuário não poluído (Fell *et al.*, 1960; Hagler; Ahearn, 1987; Pagnocca *et al.*, 1989). Mas esse diagnóstico será preciso após a identificação dos isolados, pois algumas leveduras são sensíveis às variações ambientais, como a presença de poluentes, outros são mais resistentes, assim como os fungos terrestres (SCHOENLEIN-CRUSIUS; MILANEZ, 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P.C. *et al.* Eutrophication processes and trophic interactions in a shallow estuary: preliminary results based on stable isotope analysis ($_{13}\text{C}$ and $_{15}\text{N}$). **Estuaries and Coasts**, Berlin, v. 29, n. 22, p. 277-285. 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F02781996.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2013.
- ALMEIDA, J. R. M. de; FÁVARO, C de L. Leveduras para produção de etanol de sorgo sacarino. **Agroenergia em Revista**, n. 3, ago. 2011.
- BLAGOVIC, B. *et al.* Lipid composition of brewer's yeast. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 39, n. 3, p. 175–181, 2001.
- BRANCO, R. V. **Imobilização e caracterização de uma esterase termoestável recombinante de *Pyrococcus furiosus***. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <http://teses.ufrrj.br/IQ_M/RobertaVieiraBranco.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2013.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, England, v. 93, n. 6, p.1020-1025, 2002.
- CHRÓST, R. J. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: CHRÓST, R. J. (Ed.) **Microbial Enzymes in Aquatic Environments**. Berlin : Springer-Verlag, 1991. p. 29–59.
- CHRÓST, R. J. *et al.* A method for determining enzymatically hydrolyzable phosphate (ehp) in natural waters. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 31, n. 3, p. 662-667, 1986.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências do Alimento) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MAFB-72BGXL/tese_g._colen.pdf?sequence=1>. Acesso em: 23 jun. 2013.
- COSTA, C. S. B. *et al.* **Distribuição, funções e valores das marismas e pradarias submersas no Estuário da Lagoa dos Patos (RS, Brasil)**. Atlântica, Rio Grande, v. 19, p. 65-83, 1997.
- COSTA, C. S. B. Marismas irregularmente alagadas. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J.P. (Ed.) **Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil**. Rio Grande : Ecoscientia, 1998. p. 82–87.
- COSTA, C. S. B.; MARANGONI, J. C. As comunidades das marismas. In: **O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações**. Rio Grande : FURG, 2010. p.125-133.

Disponível em:

<<http://www2.furg.br/instituto/io/ecoveco/ecomidia/livros/O%20Estuario%20da%20Lagoa%20dos%20Patos.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2013.

COSTA, J. M. **Caracterização enzimática de agentes da cromoblastose com ênfase em atividade lipase**. 2006. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

Disponível em:

<<http://www.bibliotecadigital.ufrgs.br/da.php?nrb=000542008&loc=2006&l=80a81609d33eec04>>. Acesso em: 21 maio 2013.

DAS, S. *et al.* Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n.1, p. 486-496, 2011. Disponível em: < http://ijpbs.net/volume2/issue1/pharma/_48.pdf >. Acesso em: 30 maio 2013.

DAY, J. W. *et al.* Intertidal Wetlands: Salt Marshes and Mangrove Swamps. *In*: _____ **Estuarine ecology**. New York : John Wiley, 1989. p.188-253.

DEÁK, T. **Handbook of food spoilage yeasts**. 2nd ed. Boca Raton, Fl.: CRC, 2008.

Disponível

em:

<http://books.google.com.br/books?id=RR21g8_2OXIC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=yeasts+test+DBB&source=bl&ots=fXe0Wwnf6A&sig=jcdYSau7oEzYFAi2awGYRnjjE1M&hl=en&sa=X&ei=3OlvUbaxMoma9gTMoIDQCA&ved=0CGcQ6AEwCA#v=onepage&q=yeasts%20test%20DBB&f=false>. Acesso em: 18 abr. 2013.

DEGRASSI, G. *et al.* Purification and properties of an esterase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of the encoding gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3470-3472, 1999.

CARMO-SOUZA, L. do. Distribution of yeasts in nature. *In*: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (ed.) **The Yeasts**. London: London Academic Press, 1969. p. 79-106.

ESTEVEES, F. de A.; GONÇALVES JÚNIOR, J. F. Etapas do metabolismo aquático. *In*: ESTEVEES, F. de A. (Org.) **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro : Interciência, 2011.

FARIAS, M. V. de. **Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais na Área de Bioprospecção) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2008.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2013. 131 p. Dissertação. (Doutorado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em:

<<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/10745/maria%20luiza.PDF?sequence=1>>. Acesso em: 01 jun. 2013.

FRANZOLIN, M. R. Fundamentos da Identificação Bioquímica das Bactérias. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed) **Microbiologia**, 5. Ed. 2008. p. 463 – 467.

FUENTEFRIA, A. M. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do Hibiscus rosa-sinensis**. 2004. 120 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana**. 2010. 53 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, 2010.

Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/micro/m/83722.pdf>>. Acesso em: 2 maio 2013.

FUNGARO, M.H.P. *et al.* Recurrent mutation-selection to improve rennet production in *Candida tsukubaensis*. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 4, p. 377-382, Dec. 1994.

GANTES, M. L. **Composição e estrutura da comunidade de insetos de uma marisma da Ilha da Pólvora** (Rio Grande, Brasil). 2011. 39 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande, 2011. Disponível em: <http://www.argo.furg.br/bdtd/tde_arquivos/2/TDE-2012-01-12T120555Z-348/Publico/Marcel%20Lucas%20Gantes.pdf>. Acesso em: 21 maio 2013.

GHOSH, S. K. R.; SANTRA, T.; CHAKRAVARTY, A. Study of antagonistic yeasts isolated from some natural sources of west bengal. **Agriculture and Biology Journal of North America**, Connecticut, v. 4, n. 1, p. 33-40, 2013.

KADEMI, A.; LEE, B., HOUDE, A. Production of heterologous microbial lipases by yeast. **Indian Journal of Biotechnology**, India, v. 2, n. 3, p. 346-355, July 2003.

KEBABCİ, Ö.; CIHANGİR, N. Immobilization of lipase and lipase producing yeast, *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658. Hacettepe **Journal of Biology and Chemistry**, Beytepe-Ankara, v. 39, n. 3, p. 283–288, 2011.

KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, England, v. 13, n. 4, p. 343-351, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12323357>>. Acesso em: 28 jun. 2013.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. **The yeasts, a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1998.

LANDELL, M. F. **Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias do Parque Itapuã, Viamão-RS**. 2006. 127 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LLOYD, G.; MORRIS, E. O.; SMITH, J. E. A study of the esterases and their function in *Candida lipolytica*, *Aspergillus niger* and a yeast-like fungus. **Journal of general microbiology**, v. 63, p. 141-150. 1971.

LOURENÇO, M. V. de M. **Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-24022010-171003/pt-br.php>>. Acesso em: 02 maio 2013.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2010. 1160 p.

MARANGONI, J. C. **Subsídios para o gerenciamento das marismas no estuário da Lagoa dos Patos (RS)**. 2008. 148 p. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande, 2008, Disponível em:<<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp076894.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2013.

MARANGONI, J. C.; COSTA, C. S. B. **Diagnóstico Ambiental das marismas da Lagoa dos Patos - RS**. Atlântica, Rio Grande, v. 31, n. 1, p. 85-98, jan./jun. 2009.

MAUTONE, N. J. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil**. 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

PAGNOCCA; F.G. *et al.* Yeasts associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. **Yeast**, Chichester, Apr. 5, 1989. Spec No: S479-83.

PANDA, T.; GOWRSHANKAR, B. S. Production and application of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 67, p.160-169, 2005.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate methods for detection of phospholipase in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxfordshire, England, v. 20, n. 1, p. 15-20, 1982.

RIBAS, T.T.Z.; MARCHESAN, E.D.; ONOFRE, S.B. Atividade hemolítica de *Streptomyces* sp. produtores de metabólitos ativos, isolados do solo da região sudoeste do Paraná. **Revista de Biologia e Saúde da UNISEP**, Dois Vizinhos, n.1, p. 27-33, jan./jun., 2009.

RIBEIRO, J. R. de A. **Diversidade e ecofisiologia de leveduras em plantio orgânico de cana-de-açúcar**. 2009. 158 p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: http://www.bdt.d.ufrrj.br/tde_arquivos/1/TDE-2010-09-16T071759Z-940/Publico/2009%20-%20Jose%20Roberto%20de%20Assis%20Ribeiro.pdf.

Acesso em: 30 maio 2013.

SANTOS, M. G. G. R. *et al.* Yeast in biotechnology . *In: Progress in microbial ecology*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p. 571-576.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I. Diversity of aquatic fungi in Brazilian ecosystems. *In: BICUDO, C.; MENEZES, N. A. (Ed.) Biodiversity in Brazil: a first approach*. São Paulo : CNPq, 1996. p. 31-48.

SHARMA, R. CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, New York, US, v. 19, p. 627–662, 2001.

SIBIRNY, A. A.; VORONOVSKY, A. Y. *Candida famata (Debaromyces hansenii)*. *In: Yeast biotechnology: diversity and applications*. Berlin : Springer, 2009. Disponível em:

<http://books.google.com.br/books?id=jLFmiervaqMC&pg=PA104&lpg=PA104&dq=enzyme+Esterase+yeast&source=bl&ots=CdeQtr5HBY&sig=U7RTfP3W9ByXuhUSwwBZIYaxs&hl=en&sa=X&ei=uCKSUfnvKZD49gSn7oCQAg&ved=0CFkQ6AEwCTgK#v=onepage&q=enzyme%20Esterase%20yeast&f=false> . Acesso em: 14 maio 2013.

SILVA, G. J. **Diatomáceas (Bacilariophyta) em sedimentos superficiais de marisma na planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2008. 32 f. Trabalho de Conclusão (Bacharelado em Ciências Biológicas Ênfase Ambiental) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande de Sul. Porto Alegre, 2008. Disponível em:

<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/15766/000648717.pdf?sequence=1> Acesso em: 21 maio 2013.

SILVA, M. dos S. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, BA. Feira de Santana, 2011.

SOUSA, F. M. P. de. **Diversidade fúngica e bacteriana em diferentes substratos em três trechos do rio Água Suja, Porto Nacional/TO**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência do Ambiente) - Universidade Federal do Tocantins. Palmas, 2010.

STEELE, D. B.; STOWERS, M. K. Techniques for selection of industrially importante microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 89-106, 1991.

STEIN, C. E. **Estudo do papel de *Spartina alterniflora* como espécie bioindicadora de contaminação por elementos traço no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape (SP)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Oceanografia

Química e Geológica) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/.../Stein.pdf>. Acesso em:

SUH, S-O. *et al.* **Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts.** *Mycologia*, New York, v. 98, n. 6, p. 1006-1017, 2006.

TAKAMOTO, T. *et al.* Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane inorganic solvent. **Chemistry Letters**, Tokyo, n. 6, p. 492-493, 2001.

TEAL, J. M. The ecology of regularly flooded salt marshes of New England: a community profile. **Biological Report**, Washington, v. 85 n. 7.4, 61 p. June 1986. Disponível em: <<http://www.nwrc.usgs.gov/techrpt/85-7-4.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed. 2012. 934 p.

TRINDADE, C. R. T. *et al.* Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do Campus Carreiros - FURG, Rio Grande, RS. **Cadernos de Ecologia Aquática**, Rio Grande, v. 5, n. 2, p. 1-22, 2010.

TSUBOI, R.; KOMATSUZAKI, H.; OGAWA, H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, n. 8, p. 2936-2940, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC174170/pdf/642936.pdf>>. Acesso em: 14 maio 2013.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1553-1558, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/13595113/38/11>>. Acesso em: 7 de maio de 2013.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast Lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, Chile, v.6, n. 1, 2006. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/viewFile/v9n1-9/235>> Acesso em: 7 de maio de 2013.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion Biotechnological**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 338-344. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166902003348>>. Acesso em: 18 jun. 2013.

WANG, L. *et al.* Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 57, p. 495-501, 2007.