

PRODUÇÃO DE PECTINASES POR LEVEDURAS: UMA REVISÃO

RODRIGO DE QUEIROZ OLIVEIRA¹, ARISTÓTELES GÓES-NETO², ANA PAULA TROVATTI UETANABARO³,
CARLOS AUGUSTO ROSA⁴ & SANDRA APARECIDA DE ASSIS⁵

¹Mestre em Biotecnologia (UEFS), Doutorando em Ciências/Biotecnologia (UEFS),

²Prof. Titular do DCBIO/UEFS, Doutor em Botânica (UFRGS)

³Profa. Assistente do DSAU/UEFS. Doutora em Ciência de Alimentos (UNICAMP)

⁴Prof. Adjunto do Departamento de Microbiologia (UFMG). Pós-Doutor (UWO, Canadá)

⁵Profa. Assistente do DSAU/UEFS. Doutora em Biotecnologia (UNESP) (sandraassis@uefs.br)

Universidade Estadual de Feira de Santana, Depto. Saúde, BR 116, KM 03, 44031-460, Feira de Santana, Bahia

(Produção de pectinases por leveduras: uma revisão) – O potencial biotecnológico das enzimas pectinolíticas vem chamando a atenção de vários pesquisadores em todo o mundo, devido à sua importância como catalisadores biológicos em uma variedade de processos industriais. A obtenção de enzimas extracelulares a partir de leveduras é interessante do ponto de vista econômico e industrial, devido à capacidade desses microrganismos de utilizarem substratos de baixo custo para crescimento e a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir maior produção da enzima. Assim, esta revisão tem o objetivo de divulgar o potencial industrial e biotecnológico das leveduras, buscando incentivar programas de seleção e triagem dos recursos microbianos, que poderiam levar ao surgimento de novos processos ou produtos biotecnológicos.

Palavras-chave: leveduras; pectinases; catalisadores biológicos.

(Production of pectinases by yeasts: a review) – The biotechnological potential of pectinolytic enzymes has drawn the attention of several researchers around the world due to their importance as biological catalysts in several industrial processes. Under economic and industrial points of view, the extracellular enzymes from yeasts are preferable among the others pectinases sources, since they can grow from low-cost substrates and high production of these enzymes can be ensured under controlled conditions. Thus, this review has the goal of divulge the economical and industrial potential of yeasts, aiming to stimulate programs of selection and screening of microbial resources, in a wide program of scientific, technological, economic and environmental development that could aid to create new processes or biotechnological products.

Key words: yeasts; pectinases; biological catalysts.

INTRODUÇÃO

Desde a década de 30, as pectinases são utilizadas em aplicação comercial no processamento de frutas e vegetais (KASHYAP *et al.*, 2001). Seu uso tem aumentado consideravelmente, especialmente na produção de vinho, na indústria têxtil, na extração de óleo, na fermentação do café, chá e cacau, em ração animal, em purificação de vírus de plantas, em tratamento de águas residuárias da indústria, e na indústria de papel e celulose (HOONDAL *et al.*, 2002; JAYANI *et al.*, 2005).

Apesar de células vegetais e animais serem também fontes de enzimas, do ponto de vista econômico e industrial, as enzimas extracelulares de microrganismos são preferíveis devido ao menor custo de sua extração, isolamento e purificação (SAID & PIETRO, 2002).

As pectinases de origem microbiana correspondem a 25% do total de enzimas utilizadas na indústria alimentícia, sendo empregadas tradicionalmente na extração e clarificação de suco de frutas em razão de sua especificidade e do seu potencial catalítico, melhorando o processo e qualidade do produto (JAYANI *et al.*, 2005). Existe ainda uma tendência de aumento do consumo dessas enzimas pela incorporação ao mercado tanto de novos produtos quanto

de pequenos produtores, os quais pouco a pouco vêm se especializando (CANTO & MENEZES, 1995).

As preparações comerciais de pectinases são normalmente de origem fúngica, principalmente a partir do fungo filamentosso *Aspergillus niger* (BLANCO *et al.*, 1999).

Outros microrganismos também são capazes de produzir estas enzimas, tais como as leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Stephanoascus*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Pseudozyma*, *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Kloeckera*, *Ambrosiozyma*, *Bullera*, *Geotrichum*, *Rhodospiridium*, *Saccharomycopsis*, *Trichosporonoides* sp. e *Ustilago*, além do fungo semelhante à levedura *Aureobasidium* e de leveduras pretas (BIELY & SLÁVIKOVÁ, 1994; STRAUSS *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2002; BUZZINI & MARTINI, 2002; SILVA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2007).

As leveduras despertam grande interesse para a produção de pectinases em larga escala, apresentando vantagens quando comparadas aos fungos filamentosos: são unicelulares, o crescimento é mais rápido e o meio do crescimento não requer um indutor (SILVA *et al.*, 2005).

Assim, esta revisão tem o objetivo de divulgar o

potencial industrial e biotecnológico das leveduras, tendo em vista que um aumento da exploração deste potencial pode trazer melhoria em processos já existentes ou ainda pode levar ao surgimento de novos processos ou produtos.

AS SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

Substância péctica é o nome genérico usado para um grupo complexo de polissacarídeos coloidais de elevada massa molecular, que ocorre principalmente na lamela média e nas paredes celulares de vegetais superiores associadas à celulose e à hemicelulose, contribuindo na firmeza e estrutura dos seus tecidos (GUMMADI & PANDA, 2003; JAYANI *et al.*, 2005).

A cadeia principal dos polissacarídeos pécticos é constituída de resíduos de α -1,4-D-galacturônico unidos por ligações α -1,4, intercalados ou não por resíduos de ramnose, e cadeias laterais contendo principalmente arabinose, galactose e xilose (ALKORTA *et al.*, 1997; KASHYAP *et al.*, 2001). Os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem estar parcialmente esterificados por grupos metil e parcial ou completamente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio (KASHYAP *et al.*, 2001).

A Sociedade Americana de Química classificou as substâncias pécticas em: protopectina, a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais, insolúvel em água e totalmente metoxilada; ácido péctico, composto de resíduos de ácido poligalacturônico coloidal sem a presença de metoxilas; pectina; e, ácido pectínico. Esses últimos possuem um grau variável de metoxilação e, em condições adequadas, são capazes de formar géis com ácidos e açúcares (SAKAI *et al.*, 1993; HOONDAL *et al.*, 2002).

AS PECTINASES

Enzimas pécticas, pectinases ou enzimas

pectinolíticas são um grupo heterogêneo de enzimas relacionadas que catalisam a degradação das substâncias pécticas nos vegetais (BLANCO *et al.*, 1999; JAYANI *et al.*, 2005).

As enzimas pectinolíticas são produzidas pelos vegetais, tendo importância na maturação dos frutos, crescimento, abscisão e desenvolvimento do pólen (BLANCO *et al.*, 1999). Por outro lado, também são produzidas por bactérias, fungos filamentosos, leveduras, insetos, nematóides e protozoários (HOONDAL *et al.*, 2002).

As pectinases podem ser classificadas em três grupos: pectina esterases, que catalisam a desesterificação do grupo metoxílico da pectina, produzindo álcool metílico e ácido péctico; enzimas despolimerizantes, as quais rompem as ligações glicosídicas α -1,4 entre os monômeros galacturônicos das substâncias pécticas (ácido péctico e pectina), podendo atuar por hidrólise (hidrolases, por exemplo, a poligalacturonase, PG) ou por transeliminação (liases, por exemplo, a pectina liase, PL), e protopectinases, que solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada (SAKAI *et al.*, 1993; ALKORTA *et al.*, 1997; KASHYAP *et al.*, 2001; JAYANI *et al.*, 2005).

LEVEDURAS

Os fungos são seres eucariontes, de nutrição quimio-heterotrófica absorvitiva, predominantemente aeróbios, com temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30° C e pH de 4 a 7, podendo apresentar-se sob a forma leveduriforme ou filamentosa (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

As leveduras são formadas por células únicas, caracteristicamente esféricas ou ovais, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou fissão. No entanto, algumas leveduras produzem brotos que não se separam, formando pseudomicélio. Além disso, alguns fungos exibem dimorfismo, ou seja, podem crescer tanto na forma de fungo

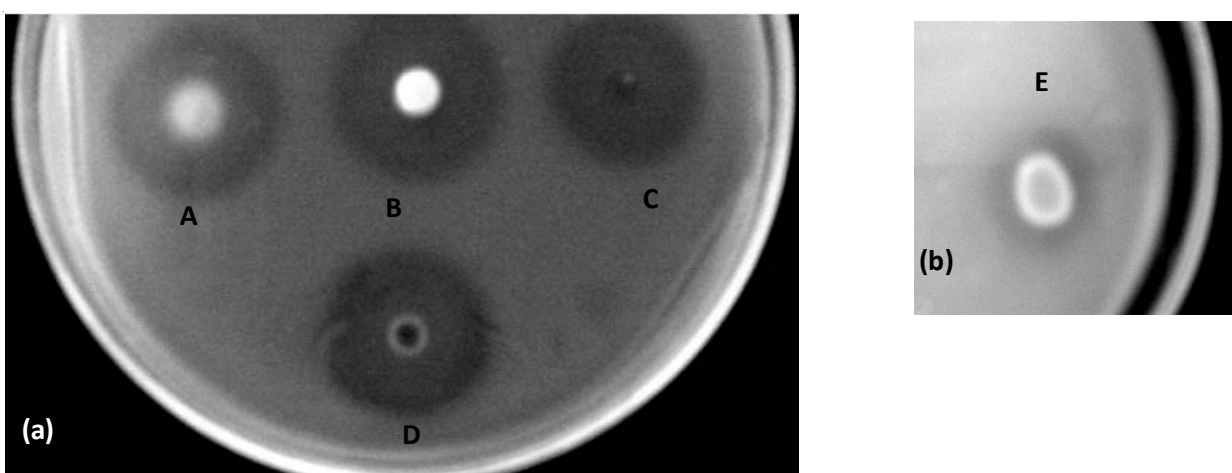


Fig. 1. (a) Halo de hidrólise do ácido poligalacturônico, visualizado após adição de hexadecil trimetil amônio brometo 1% (p/v), originado por microrganismos leveduriformes isolado do Semi-árido baiano, crescidos a 28°C por 48 h em meio MP-5: (A) *Aureobasidium pullulans* CCMB 312, (B) *Trichosporonoides* sp. CCMB 298, (C) *Pseudozyma* sp. CCMB 300 e (D) *Pseudozyma* sp. CCMB 299. (b) Halo de degradação da pectina, visualizado após adição de hexadecil trimetil amônio brometo 1% (p/v), originado por microrganismo leveduriforme isolado do Semi-árido baiano, crescido a 28°C por 48 h em meio MP-7; (E) *Aureobasidium pullulans* CCMB 316. Fonte: OLIVEIRA (2007).

filamentoso quanto na forma de levedura (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; LOGUERCIO-LEITE & ESPOSITO, 2004).

Na natureza as leveduras podem ocupar vários nichos ecológicos, já que são capazes de utilizar diversos substratos para sua nutrição absorptiva. Essa característica permite que as leveduras secretem enzimas extracelulares que são liberadas para o meio, sendo capazes de degradar macromoléculas a moléculas menores que então podem ser incorporadas e utilizadas nutricionalmente. Contudo, esses microrganismos não são tipicamente degradadores de polímeros, preferindo habitats onde abundam os açúcares solúveis, tais como nectário das flores e a superfície de frutas (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1996; GALVAGNO & FORCHIASSIN, 2004).

As leveduras são tradicionalmente identificadas através de técnicas convencionais, baseadas em características morfológicas (macro e micro) e fisiológicas, entre as quais: fermentação de diferentes fontes de carbono; assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio; crescimento em diferentes temperaturas; crescimento em diferentes concentrações de glicose e cloreto de sódio; tolerância ao ácido acético; produção extracelular de compostos amilóides; coloração com diazônio azul B e resistência à cicloexamida (YARROW, 1998).

Segundo ALEXOPOULOS *et al.* (1996), as leveduras podem ser classificadas como ascomicetos, basidiomicetos ou fungos mitospóricos.

Nos últimos anos, com a introdução de novas técnicas biotecnológicas grandes progressos na taxonomia de leveduras vêm ocorrendo (ORBERA-RATON, 2004).

Para VALENTE *et al.* (1999), o DNA ribossômico (rDNA) é muito empregado em estudos taxonômicos devido à presença de regiões que evoluem em diferentes taxas, servindo como base para análise das relações evolucionárias.

As seqüências do domínio D1/D2 da subunidade maior (26S) do rDNA, que são entre as regiões as mais variáveis dentro do gene inteiro, estão disponíveis para todas as espécies conhecidas de leveduras ascomicéticas (KURTZMAN & ROBNETT, 1995, 1997, 1998). Estes dados estão disponíveis também para leveduras basidiomicéticas, embora em alguns casos seja necessário sequenciar mais de uma região do DNA para se obter uma identificação precisa (FELL *et al.*, 2000). Neste caso, têm-se escolhido as regiões internas não codificadoras (ITS1 e ITS2) e as regiões não codificadoras intergênicas (IGS1 e IGS2) (FELL & BLATT, 1999; SCORZETTI *et al.*, 2002).

Das já conhecidas, a abordagem baseada em uma combinação de métodos clássicos (fenotípicas) e moleculares (genotípicas), tem resultado na descoberta de novas espécies e em rearranjos taxonômicos das já conhecidas (MANFIO, 2000; JESPERSEN *et al.*, 2005; LOPANDIC *et al.*, 2006; LEAW *et al.*, 2006).

Sem as leveduras não existiriam bebidas fermentadas como cervejas e vinhos, e outros alimentos nos quais esses microrganismos têm papel de destaque em

sua produção, como por exemplo, na produção de pão e queijo. Deve-se mencionar ainda que as leveduras são responsáveis pela produção de enzimas de interesse industrial e de valor econômico, destacando-se as pectinases (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Atualmente, há um grande interesse industrial e biotecnológico e, na verdade, um sentido de urgência sobre a documentação da biodiversidade das leveduras no Brasil, onde, invariavelmente, uma porcentagem das espécies encontradas é ainda desconhecida para a ciência (SANTOS *et al.*, 1996; MANFIO, 2000; BUZZINI & MARTINI, 2002; FUENTEFRIA, 2004; MORAES *et al.*, 2005; RUIVO *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2005). HAWKSWORTH (2001) estima a existência de 1,5 milhões de espécies de fungos no planeta, e menciona que apenas 5% da diversidade são conhecidos.

OCORRÊNCIA DE PECTINASE EM LEVEDURAS

A partir da observação de que os trabalhos discordavam sobre a produção de pectinases por leveduras, os pesquisadores LUH & PHAFF (1951), realizaram um estudo qualitativo com vista a evidenciar a produção de poligalacturonase por esses microrganismos. Os referidos autores testaram um grande número de espécies e linhagens de leveduras em meio líquido contendo pectina cítrica como substrato. No entanto, somente seis culturas foram capazes de degradar a pectina do meio, clarificando-o, sendo identificadas como *Saccharomyces fragilis* e sua forma anamórfica *Candida pseudotropicalis*, todas oriundas da *Division of Food Technology*, Universidade da Califórnia, Estados Unidos.

Após a pesquisa de LUH & PHAFF (1951), outros pesquisadores passaram a investigar a produção de pectinase extracelular por leveduras.

SANCHEZ *et al.* (1984), estudaram a atividade pectinolítica de leveduras isoladas na Costa do Marfim durante a fermentação do cacau, além de outras linhagens obtidas na *Ecole Nationale Supérieure de Agronomie*, França. Conforme foi verificado por estudos viscosimétricos, as leveduras *Torulopsis candida*, *Candida norvegenesis*, *Kluyveromyces fragilis* e *Saccharomyces chevalieri* degradaram a pectina do meio de cultura, sendo as quatro positivas para poligalacturonase. No entanto, leveduras positivas para a pectina liase não foram encontradas nesse estudo.

Outro método para detecção de levedura produtora de poligalacturonase foi descrito por MCKAY (1988). Segundo esse método, após o crescimento da cultura em placa de agarose com ácido poligalacturônico como substrato, recobre-se a superfície da placa com solução de vermelho de rutênio. Sem a degradação da poligalacturonase, o vermelho de rutênio não penetra no meio, sendo facilmente lavado. Nesse caso, a degradação do ácido poligalacturônico é detectada pela formação de halo vermelho intenso ao redor da colônia. Ainda, segundo esse

trabalho, as leveduras produtoras de poligalacturonase foram: *Cryptococcus macerans* NCYC 578, *Candida toressi* NCYC 786, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Candida pseudotropicalis* NCYC 744, todas elas obtidas da *National Collection of Yeast Cultures*, Inglaterra.

Em 1994, BIELY & SLÁVIKOVÁ, propuseram um método similar para seleção de leveduras pectinolíticas em meio sólido. Entretanto, este método consiste na precipitação da pectina cítrica não degradada em meio sólido, após a adição de brometo de cetil trimetil de amônio; onde as linhagens positivas mostram áreas transparentes em torno das colônias. Dentre os gêneros de leveduras que exibiram halo de degradação nesse trabalho, têm-se: *Ambrosiozyma*, *Aureobasidium*, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Georrichum*, *Kluyveromyces*, *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Saccharomycopsis*, *Strephanoascus*, *Trichosporon* e *Ustilago*, todas elas provenientes da *Culture Collection of Yeasts* (CCY), Eslováquia.

No Brasil, em 1997, SCHWAN, COOPER & WHEALS, isolaram, identificaram e depositaram na Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical “André Tosello” (CCT), as linhagens de leveduras oriundas da fermentação do cacau. No mesmo trabalho, as linhagens *Kluyveromyces marxianus* (CCT 3172), *K. thermotolerans* (CCT 1701), *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* (CCT 1698) e *Candida rugopelliculose* (CCT 1702) foram hábeis na secreção de poligalacturonase em meio líquido contendo pectina.

STRAUSS *et al.* (2001), pesquisaram a produção de enzimas extracelulares de 245 leveduras não *Saccharomyces*, isoladas de vinhedos da África do Sul, tendo em vista o seu uso como catalisadores durante a fermentação do vinho. Dentre outras enzimas, a pectinase foi estudada por esses pesquisadores, sendo utilizado o meio sólido contendo ácido poligalacturônico para detecção da produção da enzima. Entre as leveduras pectinolíticas, foram encontradas duas linhagens de *Candida stellata*, uma de *C. oleophila*, uma de *C. pulcherrima*, uma de *C. valida* e quatro de *Kloeckera apiculata*.

Por sua vez, TRINDADE *et al.* (2002), investigaram tanto a biodiversidade de leveduras em frutas maduras e em polpa de fruta congelada coletadas no Brasil, quanto à produção de enzimas por estas, incluindo pectinase, tendo em vista sua aplicação industrial. Assim, entre as 381 linhagens pesquisadas nesse trabalho, somente 16 produziram pectinases extracelulares, em meio sólido contendo ácido poligalacturônico, conforme listadas a seguir: levedura preta, *Candida azyma*, levedura semelhante a *C. bombicola*, *C. krusei*, *Leucosporidium scotii*, *Metschnikowia* spp., *Pichia membranifaciens*, *P. antarctica*, levedura semelhante a *P. fusiformata*, *Rhodotorula graminis*, *R. marina*, levedura semelhante a *Torulasporea delbrueckii*, *Trichosporon* spp., fungo semelhante a levedura e duas linhagens de *Cryptococcus* spp.

BUZZINI & MARTINI (2002) pesquisaram a produção de pectinase extracelular por leveduras e fungos semelhantes a leveduras. Neste trabalho, os 394 microrganismos testados para diferentes enzimas, foram isolados de solo, água, inseto e plantas coletadas em florestas do Brasil. Os citados autores relataram a produção de pectinase, em meio sólido com pectina, pelas linhagens *Candida sake*, *Pichia guilliermondii*, *P. spartinae*, correspondendo 1,5% do total de linhagens positivas dos ascomicetos; *Pseudozymas antarctica*, correspondendo a 18,7% do total de linhagens positivas dos basidiomiceto; *Aureobasidium pullulans*, correspondendo a 21,7% do total de linhagens positivas dos fungo semelhante a levedura. Este estudo demonstrou o potencial de microrganismos isolados de ambiente tropical, como fontes de enzimas de interesse industrial e biotecnológico.

No trabalho de NAKAGAWA *et al.* (2004), leveduras psicrófilas foram isoladas do solo, em Abashiri no Japão, e testadas quanto à produção de enzimas pectinolíticas em baixas temperaturas, usando meio sólido contendo pectina. Nesse trabalho, foram encontradas três espécies de leveduras psicrófilas pectinolíticas, que podem ser utilizadas na indústria de alimentos, são elas: *Cryptococcus cylindricus*, *Mrakia frigida* e *Cystofilobasidium capitatum*.

No trabalho de SILVA *et al.* (2005), de um total de 300 leveduras isoladas de frutas frescas e polpas de frutas tropicais do Brasil e da Colômbia, 21 foram positivas para poligalacturonase, usando como substrato em meio sólido o ácido poligalacturônico. Essas 21 foram: *Kluyveromyces wickerhamii* (3), *Stephanoascus smithiae* (5), *Debaryomyces hansenii* (2), *D. polymorphus* (1), *Candida intermedia* (1), *C. pseudoglaebosa* (1), *C. krusei* (1), *Zygosaccharomyces fermentati* (1), *Z. cidri* (1), *Pichia guilliermondii* (2), *P. angusta* (1), *P. anomala* (1), *Pichia* sp. (1). As leveduras *S. smithiae* (isolados FT-01, 168, 36 e 147), *Pichia* sp. (FT-28), *P. anomala* (SL-125) e *K. wickerhamii* (185), também foram capazes de secretar pectina liase, no entanto, em meio contendo pectina como substrato.

OLIVEIRA *et al.* (2006) analisaram 201 isolados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* quanto à atividade pectinolítica de poligalacturonase e pectinase em meio sólido, utilizando ácido poligalacturônico e pectina como substrato, respectivamente. Todos esses isolados foram provenientes de amostras do “leite de leveduras” coletadas em uma fábrica de etanol cítrico no Brasil. Neste trabalho os autores encontraram 107 isolados que apresentaram secreção da poligalacturonase e 97 da pectinase.

Deve-se ainda mencionar o trabalho de UENOJO & PASTORE (2006), no qual esses pesquisadores isolaram 104 leveduras, de resíduos de agroindústrias, e as testaram quanto à produção de pectinase em meio sólido contendo pectina cítrica, as quais 18 foram consideradas positivas.

A aparente contradição entre os resultados encontrados por LUH & PHAFF (1951), e dos pesquisadores

mais recentes, pode ser devido ao método empregado em cada caso (BLANCO *et al.*, 1999). Nos trabalhos recentes, os pesquisadores passaram a aferir a produção de pectinase extracelular pelas leveduras através da formação de halo de degradação do substrato em meio sólido (Fig. 1).

O uso de meio sólido, ao contrário do meio líquido, permite a triagem de uma grande quantidade de microorganismos, possibilitando uma rápida detecção de enzimas específicas, além da determinação de variantes fisiológicas (BIELY & SLÁVIKOVÁ, 1994; STRAUSS *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2002; BUZZINI & MARTINI, 2002; FUENTEFERIA, 2004; SILVA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; UENOJO & PASTORE, 2006).

Existem poucos trabalhos sobre prospecção de leveduras provenientes de ambientes com condições drásticas, tais como o semi-árido baiano. Recentemente, OLIVEIRA (2007) isolou 250 microrganismos leveduriformes de flores, frutos, tecido vegetal necrosado, insetos e solos da região Semi-árida baiana, sendo selecionados 33 pectinolíticos em meio sólido seletivo, utilizando ácido poligalacturônico e pectina como substrato (Fig. 1). Estes microrganismos selecionados foram identificados molecularmente e depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos (CCMB) da UEFS, Brasil. Entre os 33 isolados pectinolíticos, 23 foram ascomicetos [*Aureobasidium pullulans* (18), *Candida boidinii* (1), *Trichosporonoides* sp. (3) e *Kluyveromyces marxianus* (1)] e cinco basidiomicetos [*Cryptococcus liquefaciens* (1) e *Pseudozyma* sp. (4)]. Entretanto cinco dos 33 microrganismos leveduriformes pectinolíticos, foram identificados apenas como Fungal endophyte.

Cabe comentar que *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura anteriormente designada por *K. fragilis* ou *Saccharomyces fragilis* (ROSE & HARRISON, 1969 *apud* PEREIRA, 2005).

PRODUÇÃO DE PECTINASES POR LEVEDURAS

O estudo regulatório de síntese e excreção de enzimas por microrganismos é um aspecto do metabolismo celular de grande interesse para a indústria produtora de enzimas, sendo dependente da linhagem selecionada, da forma de condução do processo fermentativo e das características do meio de cultivo (SCHMIDELL, 2001).

Segundo SAID & PIETRO (2002), as enzimas produzidas pelos microrganismos podem estar localizadas dentro da célula (enzimas intracelulares), ou podem ser sintetizadas e posteriormente excretadas no meio (enzimas extracelulares); sendo esta produção influenciada pela fonte de carbono, tensão de oxigênio, pH do meio de cultivo, tempo de incubação e tamanho do inóculo.

Conforme GALVAGNO & FORCHIASSIN (2004), muitas vezes, as enzimas necessárias para viabilizar o metabolismo básico de um fungo estão sempre presentes e são enzimas constitutivas; em outros casos, é necessária a presença do

substrato para induzir a síntese ou a atividade da enzima para sua degradação, são as enzimas induzíveis. Além do mais, para os citados autores, os fungos podem produzir enzimas adaptativas na presença de um substrato que, normalmente não utilizam.

No trabalho de MCKAY (1988), as leveduras *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e a *Candida pseudotropicalis* NCYC 744, produziram a poligalacturonase em meio contendo glicose como substrato, nesse caso a enzima foi constitutiva. Por outro lado, no mesmo trabalho, as leveduras *Cryptococcus macerans* NCYC 578 e a *Candida toressi* NCYC 786, produziram poligalacturonase quando foi utilizado o ácido poligalacturônico como única fonte de carbono e de energia, indicando que a secreção da enzima foi induzida.

Entretanto, o trabalho de SCHWAN & ROSE (1994) demonstrou que a produção de poligalacturonase sob condições anaeróbicas acontece somente durante a fase de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* (CCT 3172, isolada da fermentação do cacau), sendo uma capacidade constitutiva, porque pectina, ácido poligalacturônico e ácido galacturônico, não foram requeridos para induzir a síntese desta enzima. Além do mais, uma fonte de carbono e de energia facilmente metabolizável, como a glicose 1% (p/v), foi requerida para regular a atividade pectinolítica, não ocorrendo o processo de repressão catabólica nesta concentração de açúcar.

SAID & PIETRO (2002) chamam de repressão catabólica o processo pelo qual a síntese de determinadas enzimas, em uma seqüência metabólica, é suprimida quando uma fonte de carbono facilmente metabolizável está presente.

Já o trabalho de MOYO *et al.* (2003), que apresenta a otimização das condições de crescimento e da atividade pectinolítica da levedura *Kluyveromyces wickerhamii* pela metodologia de superfície de resposta, aponta que a produção de poligalacturonase extracelular por essa linhagem foi parcialmente constitutiva; pois, a presença de pectina 1% (p/v) no meio contendo glicose 1% (p/v) aumentou em aproximadamente 50% a atividade pectinolítica. Além disso, as melhores condições estimadas para a atividade foram na combinação das seguintes variáveis independentes: pH 5,0, temperatura 32° C e 91 horas de incubação. Esse trabalho indicou ainda que o extrato bruto com a enzima foi termoestável em várias temperaturas quando na presença de íons Ca²⁺, sendo inibido pelos íons Mg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ e Na⁺.

Em sentido amplo, SAID & PIETRO (2002) consideram que a produção de pectinases extracelulares pelos microrganismos requer muitas vezes um indutor, por exemplo, a pectina. Devendo-se ainda destacar que em alguns casos, a principal fonte de carbono pode também servir como indutor. Da mesma forma, HOONDAL *et al.* (2002) em artigo de revisão relatam que as enzimas pectinolíticas microbianas são induzidas.

Com base nas considerações de BLANCO *et al.* (1999), dois tipos de leveduras podem ser discernidos quanto à produção de enzimas. Um grupo compreende aquelas incapazes de usar a pectina, o pectato ou seus produtos da hidrólise (ácido galacturônico) como fonte de carbono. O outro grupo abrange as leveduras que, assim como fungos semelhantes a leveduras, têm habilidade de crescer usando substâncias pécnicas com a única fonte de carbono, sugerindo um sistema enzimático mais complexo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leveduras são muito promissoras do ponto de vista industrial e biotecnológico, e existem ainda poucos trabalhos de prospecção em ambientes inóspitos, como o semi-árido baiano. Deste modo, a exploração do potencial desses microrganismos precisa incentivada através de programas de seleção e triagem de microrganismos do ambiente, tendo vista que o surgimento de novos processos ou produtos pode trazer benefícios econômicos ao país.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS CJ, C MIMS & M BLACKWELL. 1996. **Introductory mcology**. 4^a ed. New York: John Wiley & Sons.
- ALKORTA I, C GARBISU, MJ LLAMA & JL SERRA. 1997. **Industrial applications of pectic enzymes: a review**. *Process Biochem* 33(1): 21-28.
- BIELY P & E SLÁVIKOVÁ. 1994. New search for pectolytic yeasts. *Folia Microbiol.* 39(6): 485-488.
- BLANCO P, C SIEIRO & TG VILLA. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts: minireview. *FEMS Microbiol Lett.* 175: 1-9.
- BUZZINI P & A MARTINI. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J. Appl. Microbiol.* 93: 1020-1025.
- CANTO WL & TJB MENEZES. 1995. **Produção, usos e mercado de enzimas. Estudos econômicos-alimentos processados**. ITAL Campinas: ITAL, n. 29.
- ESPOSITO E & JL AZEVEDO. 2004. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS.
- FELL JW & GM BLATT. 1999. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhousand* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *J Ind Microbiol and Biot.* 23(1): 677-681.
- FELL JW, T BOEKHOUT, A FONSECA, G SCORZETTI & A STATZELTALLMAN. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Micr.* 50: 1351-71.
- FUENTEFRÍA AM. 2004. **Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis***. Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, M.Sc. diss.
- GALVAGNO MA & F FORCHIASSIN. 2004. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo, p.125-169. *In: E ESPOSITO & JL AZEVEDO (Orgs.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS.*
- GUMMADI SN & T PANDA. 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. *Process Biochem.* 38: 987-996.
- HAWKSWORTH DL. 2001. The magnitude of fungal iversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res.* 105(12): 1422-1432.
- HOONDAL GS, RP TIWARI, R TEWARI, N DAHIYA & QK BEG. 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biot.* 59: 409-418.
- JAYANI RS, S SAXENA & R GUPTA. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40: 2931-2944.
- JESPERSEN L, DS NIELSEN, S HONHOLT & M JAKOBSEN. 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.* 5(4-5): 441-453.
- KASHYAP DR, PK VOHRA, S CHOPRA & R TEWARI. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technol.* 77: 215-227.
- KURTZMAN CP & CJ ROBNETT. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol.* 35(5): 1216-1223.
- KURTZMAN CP & CJ ROBNETT. 1995. Molecular relationships among hyphal ascomycetous yeasts and yeastlike taxa. *Can J Botany.* 73(suppl. 1): S824-S830.
- KURTZMAN CP & CJ ROBNETT. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73(4): 331-71.
- LEAW SN, HC CHANG, HF SUN, R BARTON, JP BOUCHARA & TC CHANG. 2006. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 44(3): 693-9.
- LOGUERCIO-LEITE C & E ESPOSITO. 2004. Fungos: estrutura e ultra-estrutura, p. 15-44. *In: E ESPOSITO & JL AZEVEDO (Orgs.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: EDUCS.
- LOPANDIC K, S ZELGER, LK BANSZKY & H PRILLINGER. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* 23(4): 341-50.
- LUH BS & HJ PHAFF. 1951. Studies on polygalacturonase of certain yeasts. *Arch Biochem.* 33(2): 212-27.
- MANFIO GP. 2000. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil - Relatório final**. Campinas.
- McKAY AM. 1988. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiol Lett.* 56(3): 355-358.
- MORAES EM, CA ROSA & FM SENE. 2005. Preliminary notes on yeasts associated with necrotic cactus stems from different localities in Brazil. *Braz J Biology.* 65(2): 299-304.
- MOYO S, BA GASHE, EK COLLISON & S MPUCHANE. 2003. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. *Int J Food Microbiol.* 85(1-2): 87-100.
- NAKAGAWA T, T NAGAOKA, S TANIGUCHI, T MIYAJI & N TOMIZUKA. 2004. Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. *Lett Appl Microbiol.* 38: 383-387.
- OLIVEIRA RQ. 2007. **Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do Semi-árido baiano**. Univ. Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, M.Sc. diss.
- OLIVEIRA KF, L MALAVOLTA, CS SOUZA, EJ VICENTE & C LALUCE. 2006. Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. *J Appl Microbiol.* 100(4): 633-640.
- ORBERA-RATON T. 2004. Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest. *Rev. Iberoam. Micol.* 21(1):15-9.
- PEREIRA MSA. 2005. **Purificação de uma endopoligalacturonase, produzida por *Kluyveromyces marxianus*, utilizando sistema de duas fases aquosa**. Univ. de Minho, Braga, Tese.

- ROSA CA, PB MORAIS, SR SANTOS, PR PERES NETO, LC MENDONÇA-HAGLER & AN HAGLER. 1995. Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of southeastern Brazil. **Mycol Res.** 99(9): 1047-1054.
- RUIVO CCC, M-A LACHANCE, CA ROSA, JRM BACCI & FC PAGNOCCA. 2006. *Candida heliconiae* sp. nov., *Candida picinguabensis* sp. nov. and *Candida saopaulonensis* sp. nov., three ascomycetous yeasts from *Heliconia velloziana* (Heliconiaceae). **Int J Syst Evol Micr.** 56(5): 1147-1151.
- SAID S & RCLR PIETRO. 2002. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico.** 1ª ed. Rio de Janeiro: Eventos.
- SAKAI T, JT SAKAMOTO & EJ VANDAMME. 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. **Adv Appl Microbiol.** 39: 213-94.
- SANCHEZ J, JP GUIRAUD & P GALZY. 1984. A study of the polygalacturonase activity of several yeast strains isolated from cocoa. **Appl Microbiol Biot.** 20: 262-267.
- SANTOS EA, RB OLIVEIRA, LC MENDONÇA-HAGLER & AN HAGLER. 1996. Yeasts associated with flowers and fruits from a Semi-arid Region of Northeastern Brazil. **Rev. Microbiol.** 27(1): 33-40.
- SCHMIDELL W. 2001. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial, p. 5-18. In: W SCHMIDELL, UA LIMA, E AQUARONE & W BORZANI (Orgs.). **Biotecnologia Industrial.** V. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda.
- SCHWAN RF & AH ROSE. 1994. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. **J Appl Bacteriology.** 76: 62-67.
- SCHWAN RF, RM COOPER & AE WHEELS. 1997. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme Microb Tech.** 21: 234-244.
- SCORZETTI G, JW FELL, A FONSECA, A STATZELL-TALLMAN. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Res.** 2(4): 495-517.
- SILVA EG, MF BORGES, C MEDINA, RH PICCOLI & RF SCHWAN. 2005. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Res.** 5: 859-865.
- STRAUSS MLA, NP JOLLY, MG LAMBRECHTS & P VAN RENSBURG. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **J Appl Microbiol.** 91: 182-190.
- TRINDADE RC, MA RESENDE, CM SILVA & CA ROSA. 2002. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **System Appl Microbiol.** 25: 294-300.
- UENOJO M & GM PASTORE. 2006. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciênc Tecnol Aliment.** 26(3): 509-515.
- VALENTE P, JP RAMOS & O LEONCINI. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Can J Microbiol.** 45: 949-958.
- YARROW, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts, p. 77-100. In: CP KURTZMAN & JW FELL (ed.). **The yeasts. A taxonomic study.** Amsterdam: Elsevier Science.