

ANA MARIA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *Kluyveromyces marxianus* E  
ATIVIDADE ANTAGONISTA CONTRA *Botrytis cinerea***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

T

S237i  
2017

Santos, Ana Maria dos, 1984-

Identificação de proteínas secretadas por *Kluyveromyces marxianus* e atividade antagonista contra *Botrytis cinerea* / Ana Maria dos Santos. – Viçosa, MG, 2017.  
viii, 48f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.41-48.

1. *Kluyveromyces marxianus*. 2. Leveduras (Fungos).  
3. Fungos fitopatogênicos. 4. *Botrytis cinerea*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 579.562

ANA MARIA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *Kluyveromyces marxianus* E  
ATIVIDADE ANTAGONISTA CONTRA *Botrytis cinerea***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de julho de 2017.

---

Ieso de Miranda Castro

---

Maria Catarina Megumi Kasuya

---

Humberto Josué de Oliveira Ramos

---

Valéria Monteze Guimarães

---

Luciano Gomes Fietto  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal de Viçosa pelo ensino gratuito e de qualidade, a todo corpo docente e funcionários que auxiliam na nossa formação. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes pelo fornecimento da bolsa de estudos e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais- Fapemig e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq pelo suporte durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa.
- Ao meu orientador Professor Luciano Gomes Fietto pela orientação sempre disponível e otimista, pela confiança e bons conselhos.
- A todos do Laboratório de Biologia Molecular – UFV, alunos e ex-alunos, pela possibilidade de aprendizado e confraternizações sempre acompanhadas de boas comidas. Gostaria de agradecer especialmente às minhas amigas Gilza e Mônica que me acolheram e fizeram desse período em Viçosa muito feliz.
- Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise por todo auxílio na preparação das amostras, paciência na obtenção das imagens além do ótimo cafezinho e bom humor. Aos funcionários do Núcleo de Análise de Biomoléculas, em especial o Dr. Edvaldo Barros pela disposição e contribuições na proteômica do trabalho.
- Ao Professor Sukarno Olavo Ferreira por todo auxílio e paciência na obtenção das imagens de AFM.
- À minha família por estar sempre presente, apoiando e torcendo por mim.
- Aos meus amigos de Mariana e Ouro Preto por torcerem pelo meu sucesso e compreenderem minha ausência durante esses anos.
- Ao Thiago por ter sido um grande amigo e companheiro durante esse período.
- Aos amigos que fiz em Viçosa em especial o Apto 402 em todas às suas configurações, por terem sido tão presentes e companheiros.
- A todos que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho ou para o meu fortalecimento pessoal, deixo aqui registrada minha gratidão.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Leveduras <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	1
1.2. Glicanases fúngicas.....	2
1.3. Controle biológico na pós-colheita .....	4
1.4. <i>Botrytis cinerea</i> : Mofo cinzento em morangos e uvas de mesa .....	7
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
2.1. Objetivo geral .....	9
2.2. Objetivos específicos .....	9
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1. Microrganismos do estudo.....	10
3.2. Produção do extrato protéico .....	10
3.3. Atividades enzimáticas .....	10
3.4. Identificação das proteínas do extrato protéico .....	11
3.4.1. Precipitação de proteínas com acetona.....	11
3.4.3. Análises das proteínas por eletroforese .....	11
3.4.4. Digestão das proteínas.....	12
3.4.5. Sequenciamento por espectrometria de massa .....	12
4.5. Medida da viabilidade de leveduras.....	13
4.5.1. Medida da viabilidade celular por Citometria de fluxo.....	14
4.6. Microscopia eletrônica de varredura.....	14
4.7. Obtenção de imagens por microscopia de força atômica.....	15

4.8. Atividade antagonista <i>in vitro</i> de <i>Kluyveromyces marxianus</i> contra <i>Botrytis cinerea</i> ..	15
4.9. Atividade antagonista <i>in vivo</i> de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	15
4.10. Análise estatística .....	17
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
4.1. O extrato protéico de <i>K. marxianus</i> possui atividades de glicosidase e de protease .....	18
4.2. <i>K. marxianus</i> CCT 7735 secreta um conjunto enzimas hidrolíticas.....	19
4.3. Atividade lítica do extrato secretado por <i>K. marxianus</i> sobre <i>S. cerevisiae</i> .....	23
4.4. O extrato enzimático secretado por <i>K. marxianus</i> degrada a parede celular de leveduras <i>S. cerevisiae</i> .....	26
4.5. <i>Kluyveromyces marxianus</i> possui atividade antagonista ao fungo <i>Botrytis cinerea</i> .....	30
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gel SDS-PAGE das proteínas do extrato.....	20
<b>Figura 2.</b> Ação do extrato enzimático na densidade óptica da cultura de <i>S. cerevisiae</i> .....	24
<b>Figura 3.</b> Citometria de fluxo de células de <i>S. cerevisiae</i> .....	25
<b>Figura 4.</b> Microscopia eletrônica de varredura das células de <i>S. cerevisiae</i> .....	24
<b>Figura 5.</b> Microscopia de força atômica de células de leveduras .....	29
<b>Figura 6.</b> Inibição da germinação de esporos de <i>B. cinerea</i> CCF 109 por <i>K. marxianus</i> CCT 7735 .....	31
<b>Figura 7.</b> Inibição <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> em meio PDA sob lupa .....	32
<b>Figura 8.</b> Tratamento <i>in vivo</i> das uvas.....	33
<b>Figura 9.</b> Tratamento <i>in vivo</i> dos morangos .....	35

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Atividade específica ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de glicanases e proteinases totais do extrato enzimático frente aos substratos pNP $\beta$ G e Azocaseína, respectivamente..... 18

**Tabela 2.** Análise por espectrometria de massa das proteínas presentes no extrato enzimático secretado por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 após 48h de cultivo em YPD 0,1X, 4% de glicose..... 22

## RESUMO

SANTOS, Ana Maria dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Identificação de proteínas secretadas por *Kluyveromyces marxianus* e atividade antagonista contra *Botrytis cinerea*.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Co-orientadores: Wendel Batista da Silveira e Hilário Cuquetto Mantovani.

A conservação de frutos *in natura* com qualidade é primordial para reduzir as perdas no período após a colheita, devido à recorrente contaminação por fungos patogênicos. No entanto, a forma usual de controle por fungicidas e agentes químicos vem causando danos ao meio ambiente, à saúde humana e selecionando linhagens de patógenos resistentes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antagonista da levedura *Kluyveromyces marxianus* e seu mecanismo de ação contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Os resultados obtidos mostram que *K. marxianus* é capaz de secretar simultaneamente enzimas hidrolases envolvidas na degradação da ultra-estrutura da parede celular fúngica. O extrato protéico secretado foi testado contra os substratos Azocaseína e  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e apresentou atividades de glicosidase e proteásica para todas as linhagens testadas. O sequenciamento, por espectrometria de massas, das proteínas majoritárias que foram visualizadas em SDS-PAGE identificou vinte e sete proteínas, sendo 13 delas classificadas como hidrolases. Entre as hidrolases foram identificadas 4  $\beta$ -glicanases, 4 glicosidases, uma protease aspártica, uma endoquitinase e uma inulinase. Quando se avaliou o efeito do extrato enzimático secretado por *K. marxianus* sobre a ultra-estrutura da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* foi observado um dano substancial, causando deformações celulares e redução da viabilidade da população de células. Neste trabalho foi observada a atividade de antagonismo da *K. marxianus in vitro* e *in vivo* utilizando conhecidos alvos do patógeno *Botrytis cinerea*: morangos e uvas de mesa. Os resultados obtidos dos testes de antagonismo *in vitro* mostram que em cultivo simultâneo *K. marxianus* inibe 88% a germinação de esporos de *B. cinerea* ( $p$ -valor 0,0003) nas primeiras 12h, sugerindo que, além da competição por nutrientes, a inibição do crescimento micelial esteja relacionada com a capacidade de secretar enzimas líticas exibidas pela levedura antagonista. Os resultados dos testes *in vivo* em uvas não mostraram atividade de antagonismo da *K. marxianus* contra *B. cinerea*. Os resultados dos testes *in vivo* em morangos sugerem que a habilidade de secretar enzimas líticas fazem da *K. marxianus* um agente potencial para o controle biológico de *B. cinerea*.

## ABSTRACT

SANTOS, Ana Maria dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Identification of proteins secreted by *Kluyveromyces marxianus* and antagonist activity against *Botrytis cinerea*.** Advisor: Luciano Gomes Fietto. Co-advisers: Wendel Batista da Silveira and Hilário Cuquetto Mantovani.

The conservation of fresh fruits is essential to reduce losses in the post-harvest period due to recurrent pathogenic fungi contamination. However, the usual way of control, which is by using fungicide and chemical agents, has been causing damage to the environment, human health and selecting strains resistant to pathogens. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of the antagonist yeast *Kluyveromyces marxianus* and its mechanism of action against the phytopathogen fungus *Botrytis cinerea*. The results show that *K. marxianus* is able of simultaneously secreting hydrolyses enzymes, which are involved in the degradation of the ultra structure of the fungal cell wall. Recently, our group has identified a  $\beta$ -1-3(4)-glucanase secreted by *K. marxianus* and defined the best cultivation conditions for glucanases secretion. The secreted protein extract was tested against the substrates Azocasein and p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, and it showed glycosidase and protease activities for all examined strains. The mass spectrometry sequencing of the major proteins that were visualized on the SDS-PAGE identified twenty seven proteins, thirteen of them being classified as hydrolases. Among the hydrolases, four  $\beta$ -glucanases, four glycosidases, one aspartic protease, one endoquitinase and one inulinase were identified. When the effect of the enzymatic extract secreted by *K. marxianus* was evaluated against the ultra structure of *S. cerevisiae* cell wall, a substantial damage was observed, which caused cell deformations and reduction of cell populations viability. In this study, it was observed the antagonist activity of *K. marxianus in vitro* and *in vivo* using known targets of the *B. cinerea*: strawberries and table grapes. The results obtained from the *in vitro* antagonist testes show that the simultaneous cultivation of *K. marxianus* and spores of *B. cinerea* inhibit spores germination by 88% (*p*-valor 0,0003) during the first 12 hours. The simultaneous cultivation with fungal mycelium of *B. cinerea* suggests that, in addition to nutrient competition, the inhibition of mycelium growth may be related to the ability of the antagonist yeast to secrete lytic enzymes. The results of the *in vivo* tests on strawberries suggest that the ability of secreting lytic enzymes makes *K. marxianus* a potential agent for the biological control of *B. cinerea*.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Leveduras *Kluyveromyces marxianus*

O gênero *Kluyveromyces* foi descrito pela primeira vez em 1956, por Van der Wal (Van der Wal, 1956). Com uma alta heterogeneidade, as espécies desse gênero estão reunidas em seis clados filogenéticos (Van der Wal, 1956; Kurtzman, *et al.*, 2003). *Kluyveromyces marxianus* é caracterizada como uma levedura hemiascomiceto, homotática, filogeneticamente relacionada à *Saccharomyces cerevisiae* e, dentre as espécies conhecidas, a mais próxima é *Kluyveromyces lactis* (Lachance, 1998; Llorente *et al.*, 2000). Contendo oito cromossomos, a espécie *Kluyveromyces marxianus* teve seu genoma depositado em bancos de dados em 2005 (Inokuma, *et al.*, 2005).

Entre as espécies de *K. marxianus* podemos encontrar uma gama de diferenças fisiológicas. Essa variabilidade está em parte relacionada ao fato dessa espécie já ter sido isolada em ambientes bastante distintos tais como, suco de uva, superfície de frutos, resíduos de laticínios, solo e *kefir* (Rocha, *et al.*, 2011). Essa variabilidade entre as espécies tem como consequência as diferentes aplicações biotecnológicas dessa levedura. Dentro do gênero *Kluyveromyces*, a espécie *K. lactis* é a mais bem estudada e foi a pioneira nos estudos de aplicações biotecnológicas. Ainda assim, propriedades de *K. marxianus* tais como sua capacidade de crescer e fermentar uma ampla variedade de substratos como a lactose e inulina, sua capacidade de crescer em temperaturas acima de 40 °C e sua alta taxa de crescimento específico a tornam um microrganismo com alto valor de aplicação industrial (Nonklang *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2008).

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* possuem espécies de leveduras *killer*, como por exemplo, a *K. lactis*. Leveduras *killer* são potenciais agentes de biocontrole (Ullivari, *et al.*, 2014). O sistema *killer* de *K. lactis* é mediado por dois plasmídeos dsDNA lineares e a toxina *killer* de *K. lactis* é composta por três subunidades: um polipeptídeo glicosilado maior e dois componentes não condensados. Esse sistema é capaz de lisar células de outras leveduras e tem sido explorado em outras espécies de *Kluyveromyces* (Polonelli, *et al.*, 1991; Mehlomakulu, *et al.*, 2014). A capacidade de secretar enzimas tem feito da levedura *K. marxianus* fonte de  $\beta$ -glicanases, inulinases,  $\beta$ -galactosidases, poligalacturonas, fosfatases, carboxipeptidases e aminopeptidases, que são enzimas com potenciais aplicações na indústria. Em processos fermentativos a altas temperaturas, a capacidade de secretar enzimas da *K.*

*marxianus* faz com que sejam capazes de produzir etanol em temperaturas mais altas, entre 38 °C e 45 °C, que a *S. cerevisiae* (Raimondi *et al.*, 2013).

Uma levedura *K. marxianus* isolada da superfície de mamão, exibiu ação de biocontrole contra o mofo verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos cítricos. A atividade antagonista do tratamento foi aumentada quando combinada com bicabornato de sódio sendo equiparada ao fungicida comercial Imazalil (Geng, *et al.*, 2011). A espécie *Kluyveromyces phaffii* secreta uma glicanase com uma massa molecular de 33 kDa capaz de degradar leveduras contaminantes do processo de vinificação (Comitini, *et al.*, 2004). Através de uma superfície de resposta em função da atividade de glicanases, as condições ideais para a produção desta enzima foram avaliadas em *K. marxianus* e a concentração de glicose de 4% (p/v), um pH de 5,5 e uma temperatura de incubação de 35 °C foram padronizadas (Lopes, *et al.*, 2003). A metodologia de superfície de resposta também foi utilizada para determinar o pH e a temperatura necessários para a atividade enzimática ideal (Lopes, *et al.*, 2003). A maior atividade enzimática foi obtida a um pH de 5,5 e a uma temperatura de 55 °C (Lopes, *et al.*, 2003). Além disso, o sobrenadante da cultura foi eficaz na lise enzimática da levedura *S. cerevisiae* (Lopes, *et al.*, 2003). A utilização de leveduras *Kluyveromyces* é interessante comercialmente, pois são consideradas GRAS (Generally Recognized as Safe), sendo aceitas pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA para a produção de compostos alimentícios e farmacêuticos.

## 1.2. Glicanases fúngicas

Beta-glicanases são enzimas hidrolíticas, encontradas em diversos organismos como bactérias, plantas, fungos filamentosos e leveduriformes (Bauermeister *et al.*, 2010). Elas hidrolisam ligações glicosídicas em polímeros de  $\beta$ -glicanos e podem ser divididas em exo e endo- $\beta$ -glicanases. As exo- $\beta$ -glicanases clivam o polímero a partir da extremidade redutora ou não redutora liberando oligossacarídeos de cadeias curtas como produto. As endo- $\beta$ -glicanases clivam aleatoriamente em regiões internas do polímero liberando oligossacarídeos com graus de polimerização maior que três. O mecanismo e especificidade da enzima são dependentes do tipo de ligação e dos monossacarídeos envolvidos na ligação glicosídica (Peng *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 2003).

As  $\beta$ -glicanases pertencem ao grupo das glicosil hidrolases (GH). Estas GH representam um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois

carboidratos ou entre um carboidrato e outra molécula que não seja carboidrato (Henrissat, 1991). A classificação das GH aborda as características estruturais e funcionais das hidrolases de glicosídeos. Seus domínios catalíticos são agrupados em 120 famílias de acordo com as sequências de aminoácidos na classificação internacional das enzimas ativas de carboidratos (banco de dados CAZy). Essa classificação é baseada na homologia entre as sequências de aminoácidos, apresentando uma estrutura tridimensional comum para o domínio catalítico de cada família (Naumoff, 2011; Adrangi *et al.*, 2013).

Essas enzimas podem ser classificadas em quatro categorias: (1)  $\beta$ -1,3-1,4-glicanases, a qual clivam ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas adjacentes a ligações  $\beta$ -1,3; (2)  $\beta$ -1,4-glicanases, que clivam ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas; (3)  $\beta$ -1,3(4)-glicanases, que clivam polímeros de  $\beta$ -1,3-1,4-glicano e  $\beta$ -1,3-glicano; e (4)  $\beta$ -1,3-glicanases, que clivam ligações  $\beta$ -1,3 glicosídicas em polímeros de  $\beta$ -1,3-glicano (Lopes *et al.*, 2014). As  $\beta$ -1,3-Glicanases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas específicas do tipo  $\beta$ -1,3. Estas ligações estão presentes em  $\beta$ -D-glicanas, seu principal substrato.

As  $\beta$ -D-glicanas apresentam-se na natureza como polímeros de glicose que possuem várias unidades de glicose unidas por ligações  $\beta$ -glicosídicas e que diferem entre si pelo grau de ramificação, tipo de ligação e grau de polimerização (Barbosa *et al.*, 2010; Nelson and Cox, 2002). Essas enzimas também são utilizadas na obtenção de oligossacarídeos bioativos, na caracterização da parede celular de microrganismos, como aditivos em rações para animais, na produção de vinhos para melhorar suas características organolépticas e no controle biológico de patógenos de algumas plantas (Barbosa, *et al.*, 2010; Sutivisedsak., *et al.*, 2013). Por vezes, glicose e celbiose podem funcionar como inibidores de algumas  $\beta$ -glicanases, assim como compostos como clorofórmio, organofosfatos, benzenóides e quelantes. Alguns íons avaliados também inibem a atividade das  $\beta$ -glicanases como  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Ag}^{+}$  provocando redução ou perda total da atividade catalítica (Castro, 2010; Bauermeister *et al.*, 2010; Ketudat Cairns & Esen, 2010).

Em leveduras essas enzimas são necessárias em eventos morfogênicos que requerem hidrólise controlada da parede celular como, por exemplo, durante o crescimento, esporulação e estresse celular. Uma  $\beta$ -glicanase secretada pela levedura *Schizosaccharomyces pombe*, possui expressão transitória durante o ciclo celular coincidindo períodos de maior expressão com o processo de septação (Duenas-Santero, *et al.*, 2010). Beta-glicanases são capazes de

hidrolisar as ligações poliméricas dos glicanos presente na parede celular de microrganismos, assim como quitinases e outras hidrolases (Bauermeister *et al.*, 2010). Em um estudo utilizando uma preparação comercial de  $\beta$ -glicanases contra leveduras contaminantes na produção de vinho *in vitro* foi mostrada a inibição do crescimento de *Debaromyces bruxellensis* e *Zygosaccharomyces bailii* quando tratadas com as glicanases (Enrique, *et al.*, 2010). Em muitos fungos essa enzima é secretada, e dependendo das condições ambientais e da linhagem podem secretar diversas formas da mesma enzima (Riou *et al.*, 1998).

Microrganismos produtores de  $\beta$ -glicanases são também alvos da engenharia genética. Através de evolução direcionada o gene de uma BGLII sofreu mutações aleatórias, resultando em uma variante BGLII com atividade hidrolítica três vezes maior que a do tipo selvagem em laminarina. Além disso, a enzima purificada apresentou maior atividade lítica em células de levedura (Salazar, *et al.*, 2006). Uma  $\beta$ -1,3 glicanase lítica, obtida da bactéria *Cellulosimicrobium cellulans*, foi utilizada na produção de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* e lisar a parede celular das leveduras *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii*, *Pichia membranaefaciens* e *Kluyveromyces drosophilum* (Fleuri & Sato, 2010). A bactéria *Micromonospora chalybeata* na presença de laminarina como única fonte de carbono, produziu um sistema enzimático extracelular contendo glicanases, protease e quitinase. Essas enzimas foram capazes de lisar células de várias espécies de leveduras e produzir protoplastos com elevado rendimento, sugerindo uma sinergia dessas enzimas quando secretadas conjuntamente (Gacto, *et al.*, 2000).

### **1.3. Controle biológico na pós-colheita**

No Brasil, o aperfeiçoamento do sistema agroalimentar é um dos focos do investimento financeiro destinado à agricultura na busca de uma melhor competitividade no mercado externo. Estima-se que atualmente a produção de frutas frescas no Brasil tem mantido a média de 40 milhões de toneladas, segundo o balanço de 2015 realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Nos últimos anos, mesmo atravessando severas crises hídricas, o país manteve-se como terceiro maior produtor de frutas frescas, ficando atrás apenas da China e da Índia (IBRAF, 2016). No entanto, as perdas ocorridas no período da pós-colheita podem chegar a 25% da produção total nos países industrializados e mais de 50% nos países em desenvolvimento como o Brasil (Nunes *et al.*, 2012).

Após a colheita, os frutos perdem a proteção intrínseca fornecida pela planta e ficam susceptíveis à infecção por patógenos uma vez que possuem grande quantidade de nutrientes, água e baixo pH (Droby, *et al.*, 1992). O uso de fungicidas químicos para a preservação dos frutos ainda é o método mais utilizados. A Instrução Normativa Conjunta da Anvisa e do Ministério da Agricultura (MAPA), publicada em junho de 2017 no Diário Oficial da União, aprova o regulamento técnico e os critérios para o reconhecimento de limites máximos de resíduos (LMR) de agrotóxicos em produtos vegetais *in natura* no Mercosul. A principal disposição contida nessa resolução estipula que os LMRs de agrotóxicos devem conter ingredientes ativos já registrados no país importador (Decreto Nº 4.074). A questão é que existe uma demanda mundial de redução de defensivos químicos nos alimentos e uma maior pressão internacional para que países em desenvolvimento, como o Brasil, reduzam os níveis de defensivos químicos nos insumos agrícolas de exportação. Por estas razões, métodos alternativos para o manejo de doenças pós-colheita têm sido cada vez mais explorados nos últimos 25 anos (Ghaouth, *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2013).

Uma das estratégias de biocontrole na pós-colheita, pioneiras no meio científico, foi o uso do fungo *Trichoderma sp.* para controlar a podridão causada por *Botrytis* em morangos. As críticas e avanços na pesquisa, desde então, promoveram uma riqueza de descobertas e várias tentativas de desenvolvimento de produtos em todo o mundo (Wilson & Pusey, 1985). Os estudos sobre biocontroladores ganharam impulso em 1987 com a declaração do Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA afirmando que os fungicidas eram responsáveis por cerca de 60% dos compostos cancerígenos presentes nos pesticidas (Wisniewski, *et al.*, 2007). A perspectiva de controle das condições ambientais faz do controle biológico na pós-colheita uma realidade mais palpável que no campo, onde as variações do meio podem afetar a sobrevivência e a eficácia desse método (Janisiewicz & Korsten, 2002).

O primeiro microrganismo a ser comercializado como agente de controle biológico na pós-colheita foi o *B. subtilis* que inibia o aparecimento do *Monilinia fructicola* responsável pela podridão parda em pêssegos. Estudos posteriores mostraram que a forma de antagonismo era por produção de antibiótico e a resistência do mercado ao uso de controladores biológicos que produzem antibióticos abriu espaço nesse campo de pesquisa para o uso de leveduras antagonistas (Pusey, *et al.*, 1988). O interesse pelas leveduras fez com que a fonte inicial de isolamento de leveduras antagonistas foi a superfície e o suco de frutas, isso porque a utilização de um microrganismo já adaptado ao habitat facilita o manejo, no entanto leveduras

isoladas em diferentes habitats têm sido utilizadas pelas suas características de suportar condições de armazenamento e estocagem além novos modos de ação de controle biológico (Vero, *et al.*, 2012). Algumas características são requeridas para classificar um organismo como um bom antagonista, entre elas estão: ser geneticamente estável; eficaz em baixas concentrações; poucas exigências nutricionais; capacidade de sobreviver a condições ambientais adversas e isso inclui baixas temperaturas e armazenamentos com condições controladas; ser eficaz contra mais de um patógeno ou em mais de uma variedade de fruta; passível de produção em um meio de crescimento barato; longa vida útil; fácil de dispensar; não produzir metabolitos que são prejudiciais à saúde humana e ser resistente a pesticidas, são algumas delas (Liu *et al.*, 2013).

Os estudos de controle biológico na pós-colheita buscam compreender melhor as características que tornam o microrganismo um bom antagonista. Inicialmente acreditava-se que a competição de nutrientes e a taxa de crescimento rápido dos antagonistas eram os principais mecanismos de controle biológico. Posteriormente, foram descobertos outros mecanismos de ação das leveduras antagonistas como, por exemplo, a capacidade de formar biofilmes, a adesão e parasitismo das hifas dos fungos patogênicos, indução de defesa do hospedeiro, controle da densidade populacional, indução da tolerância a espécies reativas de oxigênio, capacidade de tolerar altos níveis de sais e a produção de enzimas líticas toxinas *killer* (Bar-Shimon *et al.*, 2004; Chan & Tian, 2005; Wisniewski, *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Ullivarri, *et al.*, 2014). Alguns antagonistas apresentam, simultaneamente, mais de um mecanismo de controle de patógenos, potencializando a ação de controle biológico (Lutz, *et al.*, 2012).

Durante as primeiras 24h da colonização pelas leveduras antagonistas o modo de ação mais importante é a competição por nutrientes e exclusão de nicho e essa etapa pode interferir diretamente na germinação de esporos, sendo um passo importante do controle biológico. Colonizações tardias das leveduras antagonistas podem desencadear as demais formas de biocontrole, particular a cada microrganismo e regulada pelas características ambientais.

Alguns estudos mostram que biocontroladores segregam enzimas glicanases na presença da parede de fungos, como os agentes de biocontrole *Trichoderma harzianum*, *Micromonospora chalybeata* que secretam  $\beta$ -glicanases na presença de diferentes polímeros de glicose (Gacto, *et al.*, 2000; Vazquez-garciduenas, *et al.*, 1998). *Candida oleophila* é a levedura base do produto comercial ASPIRE® que é indicado para controle de fungos que

acometem frutas cítricas na pós-colheita. O mecanismo de ação dessa levedura parece envolver a competição por nutrientes e espaço. Um estudo mostrou que essa levedura é capaz também de produzir e secretar várias enzimas de degradação de parede celular, incluindo uma exo- $\beta$ -1,3 glicanase, quitinase e protease. A combinação de controle biológico com fungicidas já utilizados no mercado também se apresenta como uma boa estratégia assim, limites máximos de químicos exigidos para a exportação poderiam ser alcançados sem que haja prejuízo na qualidade dos frutos (Long, *et al.*, 2007; Cañamás, *et al.*, 2010).

#### **1.4. *Botrytis cinerea*: Mofo cinzento em morangos e uvas de mesa**

O fungo filamentosso *Botrytis cinerea* é o patógeno responsável por causar doenças em mais de 200 espécies de plantas, atacando órgãos como folhas, hastes, frutas e flores, pré e pós-colheita (Elad, *et al.*, 2007). O patógeno age removendo a água dos tecidos do parênquima e esgotados os recurso inicia rapidamente o surgimento das estruturas reprodutoras na forma de uma massa cinza de conídios (Williamson *et al.*, 2007). O processo de infecção de *B. cinerea* geralmente se dá nos seguintes estágios: penetração da superfície do hospedeiro, morte do tecido hospedeiro, formação da lesão primária, expansão da lesão e destruição dos tecidos e por último, esporulação (Van Kan, 2006). O fungo possui um comportamento predominantemente necrotrófico matando as células hospedeiras da planta e produzindo vários compostos fitotóxicos e enzimas que degradam a parede celular vegetal (Lazniewska *et al.*, 2010). *Botrytis cinerea* é difícil de controlar, devido a seus diferentes modos de ataque, a sobrevivência em condições menos favoráveis por períodos prolongados e desenvolvimento de cepas resistentes a fungicidas (Williamson *et al.*, 2007). As despesas globais para o controle de *B. cinerea* são altas e somando às perdas na pós-colheita, esse valor deve ser ainda maior (Dean *et al.*, 2012). Além disso, o uso de fungicidas no controle da infecção traz prejuízos para a saúde humana e para o meio ambiente e seleciona linhagens resistentes, o que aumenta a importância da abordagem sobre formas complementares ou alternativas ao uso de químicos (Choquer, *et al.*, 2007; Elad, *et al.*, 2007).

*Botrytis cinerea* é responsável por uma importante doença que acomete frutos e sementes no período da pós-colheita. Conhecida como podridão do mofo cinzento essa a doença atinge principalmente as colheitas e os frutos de videiras e morangueiros em muitas regiões do mundo, causando perdas significativas da produção. O fungo pode passar o outono e o inverno sobre as varas das videiras e nas folhas jovens do morangueiro formando filamentos de micélio aglomerados, negros, duros e resistentes às condições adversas. Quando

as condições climáticas são favoráveis na presença de água ou de elevados teores de umidade relativa, tendo como temperatura ótima entre os 15°C e os 25°C o fungo volta a reproduzir. Durante períodos muito chuvosos os ataques de *Botrytis* podem ser muito graves e originar perdas elevadas (Cañamás., 2010). Além disso, as uvas infectadas pelo patógeno podem reduzir a qualidade da fermentação em adegas, com conseqüente redução na qualidade do vinho produzido (Ribereau-Gayon *et al.*, 1980; Zahavi *et al.*, 2000; La Guerrche *et al.*, 2006).

No morango, a infecção por *B. cinerea* reduz a meia vida de prateleira dos pseudofrutos. O mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*, é uma doença que acomete tanto videiras e os morangueiros quanto os seus frutos na pós-colheita. Diferentemente dos morangos, as uvas de mesa podem ser armazenadas por longos períodos, porém elas sofrem ação severa da desidratação e por isso as condições de armazenamento requeridas pelas uvas de mesa exigem alta e constante umidade o que as tornam suscetíveis ao desenvolvimento de fungos causadores de podridões, sendo o fungo responsável pelas perdas mais significativas na pós-colheita o *B. cinerea*. As perdas causadas pelo mofo cinzento são agravadas nos períodos do ano em que o período das chuvas coincide com o período de amadurecimento dos frutos (Nigro *et al.*, 2006). Alguns estudos revelaram que é possível proteger os frutos da doença do mofo cinzento usando revestimentos antifúngicos pós-colheita e diferentes microrganismos já se mostraram eficientes na atividade antagonista contra *B. cinerea* (Elmer e Reglinski, 2006; Zahavi *et al.*, 2000; Csutak, *et al.*, 2012; Lutz, *et al.*, 2013). Uma pesquisa em campos de morango com uso contínuo de fungicidas mostrou que linhagens resistentes de *Botrytis* surgiram após uso contínuo de um mesmo fungicida. Análises filogenéticas mostraram que essa linhagem tinha características similares à espécie *Botrytis fragariae* sp., espécie que apresenta padrões de resistência à fungicidas (Rupp, *et al.*, 2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Identificar as proteínas hidrolases secretadas pela levedura *Kluyveromyces marxianus* e avaliar suas características como antagonista do fungo *Botrytis cinerea*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificação de proteínas secretadas por espectrometria de massas;
- Avaliação do extrato enzimático na ultra-estrutura da parede celular de *S. cerevisiae*;
- Viabilidade celular de *S. cerevisiae* tratadas com o extrato enzimático;
- Antagonismo *in vitro* na inibição da germinação de esporos e no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*;
- Antagonismo *in vivo* no controle da infecção induzida de *Botrytis cinerea* por *K. marxianus* em *Fragaria* sp. e *Vitis vinífera*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismos do estudo

As linhagens de leveduras utilizadas no estudo foram: *Saccharomyces cerevisiae* W303; *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, anteriormente denominada UFV-3, pertencente ao acervo de culturas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia (DMB) da UFV. Essa levedura também se encontra depositada na Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tonsello, em Campinas-SP; *Kluyveromyces marxianus* ATCC8554, linhagem pertencente a coleção biológica American Type Culture Collection; *Kluyveromyces marxianus* UFMG 42, *Kluyveromyces marxianus* UFMG 43 e *Kluyveromyces marxianus* UFMG 44, pertencentes ao acervo de cultura do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da UFMG. As leveduras foram cultivadas e mantidas em YP ágar, suplementado com 2% de glicose a 4°C por um tempo máximo de um mês. Estoques por tempos prolongados foram feitos em meio YP adicionado de 30% de glicerol e armazenado a -80 °C. A linhagem fúngica utilizada foi *Botrytis cinerea* CCF 109. O fungo filamentoso foi cultivado em meio BDA e mantido a 4°C por um tempo máximo de 20 dias. Estoques por tempos prolongados foram feitos com recortes da malha fúngica, armazenados em sílica gel a 4 °C.

#### 3.2. Produção do extrato protéico

As leveduras foram cultivadas em meio YP 0,1X [0,1% (p/v) de extrato de levedura, 0,2% (p/v) de peptona] suplementado com 4% de glicose, 50 mL de inóculo com densidade óptica inicial entre 0,6 e 0,8, foi incubado por 48h a 37 °C e 180 rpm. O extrato bruto, livre de células, das linhagens de *K. marxianus* foi concentrado 10 vezes por ultra filtração, utilizando Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare) a 4500 x g. O extrato bruto, livre de células, foi concentrado 10 vezes por ultra filtração, utilizando Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare), a 4500 x g.

#### 3.3. Atividades enzimáticas

A atividade  $\beta$ -glicolítica foi realizada utilizando o substrato cromogênico  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $p$ NP $\beta$ G) (Sigma). A hidrólise do  $p$ -NP $\beta$ G foi medida pela da incubação de 25  $\mu$ L do extrato concentrado, 725  $\mu$ L de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,5 e 250  $\mu$ L de  $p$ NP $\beta$ G 2 mM em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,5 à 45 °C por 40 min. A reação foi

interrompida com a adição de 1 mL de carbonato de sódio 500 mM. Quantificou-se a atividade enzimática através da leitura de absorbância a 410 nm do *p*-nitrofenol ( $\epsilon = 18,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) liberado. Uma unidade (U) de  $\beta$ -glicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 mmol de pNP por minuto de reação. A atividade de proteases totais foi realizada utilizando o substrato azocaseína. A hidrólise da azocaseína foi estimada através da incubação de 60  $\mu\text{L}$  do extrato concentrado e 50  $\mu\text{L}$  de azocaseína 2% (p/v) dissolvida em tampão citrato 50 mM, pH 5,5 à 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida com a adição de 240  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 10% (p/v), homogeneizada e seguida de banho de gelo por 15 min. O produto da reação foi centrifugado à 10.000 x g a 25 °C por 5 min e 240  $\mu\text{L}$  do sobrenadante transferidos para tubos contendo 280  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M. A atividade enzimática foi quantificada pela leitura da absorbância a 440 nm da sulfanilamida liberada ( $\epsilon = 1,975 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma unidade (U) de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mMol de sulfanilamida por minuto de reação. A atividade de quitinase foi realizada utilizando substrato quitina azure (QA). A hidrólise da quitina azure foi estimada através da incubação de 100  $\mu\text{L}$  do extrato concentrado, 20  $\mu\text{L}$  de quitina azure 1 mg.mL<sup>-1</sup> e 1,880 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,0 à 37 °C por 24h, o produto da reação foi centrifugado por 10 min, 16.000 x g à 25 °C. A atividade enzimática do sobrenadante foi quantificada através da leitura de absorbância a 570 nm.

### **3.4. Identificação das proteínas do extrato protéico**

#### **3.4.1. Precipitação de proteínas com acetona**

A precipitação das proteínas para tripsinização foi feita com 20 mL do extrato bruto da *K. marxianus* CCT 7735 e adição de 120 mL de acetona gelada deixando overnight a -20°C. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 min e em seguida os sobrenadantes foram descartados. Os pellets foram lavados com etanol gelado 80% (v/v), centrifugados e os sobrenadantes descartados novamente. Por último, os pellets secos em estufa a 37 °C foram ressuspensos em água MilliQ.

#### **3.4.3. Análises das proteínas por eletroforese**

As proteínas presentes no extrato enzimático foram precipitadas com acetona e analisadas por SDS-PAGE. Um volume de 5  $\mu\text{L}$  do tampão de amostra (Glicerol 30% [v/v]; SDS 9,2% [p/v]; azul de bromofenol 1% [p/v];  $\beta$ -mercaptoetanol 20% [v/v]; Tris-HCl 1,0 M pH 6,8) foi adicionado a 20  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e incubado a 100°C por 5 min. As

amostras foram então aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS a 100 V. As bandas foram visualizadas pelo método de coloração por Coomassie Coloidal e removidas manualmente para a digestão.

#### 3.4.4. Digestão das proteínas

Após a remoção do gel, as bandas foram descoradas (acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM). O gel foi então desidratado com acetonitrila 100% e seco em *speedvac* a vácuo alcoólico por 50 min. As proteínas contidas nas bandas removidas do gel foram reduzidas com DTT (ditiotreitól) 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min, a 56 °C, em banho-maria. Os géis foram retirados da solução de DTT e incubados com Iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, por 30 min, à temperatura ambiente, no escuro. Após serem lavados com bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 min, os géis foram desidratados com acetonitrila 100% e reidratados com bicarbonato de amônio 100 mM. A digestão das proteínas foi feita com a adição de uma solução contendo tripsina (Sigma-Aldric) 25 ng.µL<sup>-1</sup> em banho de gelo para uma eficiente penetração no gel. A reação foi incubada a 37 °C por 20h. A extração dos peptídeos após digestão foi feita por sonicação das amostras em banho de ultrassom e o sobrenadante removido para um novo micro tubo por repetidas vezes até que os peptídeos tenham sido removidos dos géis. A amostra removida para o outro micro tubo foi seca em *speedvac*. Os peptídeos trípticos foram analisados por espectrometria de massa.

#### 3.4.5. Sequenciamento por espectrometria de massa

A análise dos peptídeos por espectrometria de massas foi realizada utilizando MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics) e Q-TOF (micrOTOF-Q III, Bruker Daltonics). Para análise por MALDI-TOF-TOF os peptídeos trípticos foram solubilizados em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e uma alíquota de 1,0 µL da digestão tríptica foram adicionadas a uma matriz ácida alfa-ciano-4- hidroxicinâmico. Os espectros de massas trípticos foram obtidos em modo refletivo positivo e a fragmentação por meio do método do LIFT. Os espectros de massas foram processados usando o software FlexAnalysis (Bruker). As listas de picos monoisotópicos obtidas foram utilizadas para pesquisas contra banco de dados de proteínas pelo método de “Peptide Mass Fingerprinting” utilizando o banco de dados Uniprot por meio do pacote computacional MASCOT, rodando em plataforma local.

Os espectros de fragmentação MS/MS foram utilizados para identificação das sequências de aminoácidos dos peptídeos por meio do método “MS/MS ion search”, utilizando-se o MASCOT. As sequências obtidas foram confirmadas por inspeção visual dos fragmentos de massas utilizando-se o software FlexiAnalysis. A sequência de aminoácidos obtida foi utilizada para pesquisa no banco de dados Uniprot, utilizando o pacote computacional MASCOT search. Para análise por Q-TOF 10 µL da digestão trípica foi usada para análise por LC-MS usando um sistema HPLC (Prominence UFLC, Shimadzu) e uma coluna C18 (5 Å, 300 µm x 100 mm) com um fluxo de 3.0 µL/min. Os peptídeos eluídos foram então injetados em um espectrômetro de massa micrOTOF-Q usando um ionizador micro-ESI. Os tampões da fase móvel utilizada para o programa de gradiente foram: água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido (v/v) fórmico (B).

O espectro de massa foi escaneado entre 190 e 1,200  $m/z$  no modo positivo e os dados adquiridos por 67 min por cada corrida de LC-MS/MS. A aquisição de dados por ambos os instrumentos de MS foi gerida utilizando o pacote Hystar (Bruker), e os espectros foram processados com o pacote de Análise de Dados (Bruker) usando as configurações padrão para proteômica. O espectrômetro de massa operado em modo de auto-MS<sup>n</sup>, que coletou espectros MS<sup>2</sup> para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completa. O tempo de varredura foi ajustado em 0,5 s a fim de permitir a coleta de um número máximo de espectros MS<sup>2</sup> durante a análise. A lista de picos foi gerada num mgf pelo pacote de análise de dados (Bruker) e utilizadas para a identificação de proteínas com o algoritmo PEAKS (BSI). A sequência de aminoácidos obtida foi utilizada para pesquisa no banco de dados Uniprot, utilizando o pacote computacional PEAKS.

### **3.5. Medida da viabilidade de leveduras**

A linhagem *S. cerevisiae* W303 foi cultivadas em YP suplementado com 2% (p/v) de glicose a 30 °C, 180 rpm por 18h. As células foram coletadas por centrifugação (10.000 x g por 10 min) e lavadas duas vezes com tampão citrato 50 mM, pH 5,5. As células foram incubadas em microplaca com 0,5 U.mg<sup>-1</sup> do extrato enzimático concentrado de *K. marxianus* CCT 7735 a 45 °C por 18h. Células foram incubadas com tampão livre do extrato enzimático nas mesmas condições. Foram escolhidos os tempos em que o gráfico mostrou reduções consideráveis da densidade óptica para microscopia eletrônica de varredura, citometria de fluxo e microscopia de força atômica.

### 3.5.1. Medida da viabilidade celular por Citometria de fluxo

A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* W303 foi cultivadas em YP suplementado com 2% (p/v) de glicose a 30° C, 180 rpm por 18h. As células foram coletadas por centrifugação (10.000 x g por 10 min) e lavadas duas vezes com tampão citrato 50 mM, pH 5,5. A suspensão de células foi incubada em microplaca com 0,5 U.mg<sup>-1</sup> do extrato enzimático concentrado de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 a 45 °C por 18h. As células foram então coletadas e lavadas duas vezes com tampão PBS (8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) e resuspendidas no mesmo tampão e volume. A suspensão celular recebeu, no momento da injeção no citômetro, 10 µL de iodeto de propídio (1 mg.mL<sup>-1</sup>) e a contagem de células processadas pelo citômetro de fluxo BD FACS Verse.

### 3.6. Microscopia eletrônica de varredura

A levedura *S. cerevisiae* W303 foi cultivada em YP suplementado com 2% (p/v) de glicose a 30 °C, 180 rpm por 18h. As células foram coletadas por centrifugação (10.000 x g por 10 min) e lavadas duas vezes com tampão citrato 50 mM, pH 5,5 e incubadas em microplaca com 0,5 U.mg<sup>-1</sup> do extrato enzimático concentrado de *K. marxianus* CCT 7735 a 45 °C por 18h. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 3, 5 e 15h e lavadas duas vezes (10.000 x g, 10 min) com tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,2). 10 µL dessas amostras foram adicionados sobre 30 µL de 0,1% (m/v) poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) e colocados na superfície de um parafilme. A lamínula foi colocada por cima dessa suspensão e mantida a temperatura ambiente por 40 min. Posteriormente, a lamínula foi lavada duas vezes por 10 min em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,2) e fixadas overnight em glutaraldeído 2,5%. As amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,2) e em seguida, submetidas a desidratação alcoólica sequencial nas concentrações de 30, 50, 70, 80, 90% (v/v), por 15 min à temperatura ambiente em cada uma das etapas e desidratadas três vezes de 15 min em álcool 100% à temperatura ambiente. Imediatamente após a última etapa de desidratação, as lamínulas foram submetidas à secagem pelo ponto crítico (Critical Point Dryer - CPD®, Bal-tec, modelo 030), imobilizadas em porta espécimes (stubs) e cobertas com 15 nm de ouro, utilizando metalizador Sputtercoater (Balzers, modelo FDU 010). As imagens foram capturadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo 1430 VP) operando a 20 kV.

### **3.7. Obtenção de imagens por microscopia de força atômica**

Amostras do ensaio de atividade lítica foram coletadas nos tempos 0 e 15h com o tratamento enzimático e 15h na ausência do extrato enzimático. As células foram lavadas duas vezes (10.000 x g, 10 min) com tampão PBS e alíquotas de 10 µL dessa suspensão foram coletadas e dispostas sobre lâminas e deixadas para secar a temperatura ambiente por 24h. As amostras foram então analisadas por microscopia de varredura por sonda Ntegra Prima. As imagens foram analisadas pelo software Nova (Nova 1.0.26 NT-MDT, 2004).

### **3.8. Atividade antagonista *in vitro* de *Kluyveromyces marxianus* contra *Botrytis cinerea***

A linhagem fúngica *B. cinerea* CCF 109 foi cultivada em meio BDA, conjuntamente com a *K. marxianus* CCT 7735, a linhagem *S. cerevisiae* W303 foi utilizada como controle negativo. Foi retirada uma amostra de 0,5 x 0,5 cm do meio contendo a cultura de *B. cinerea* e inoculado no centro de uma placa de petri contendo meio BDA, as placas foram incubadas a 28 °C por 24h. Após incubação foram feitas estrias das leveduras na lateral das placas e as mesmas foram novamente incubadas por 9 dias a 28 °C. O crescimento do fungo na presença das duas linhagens de leveduras foi observado pela presença de regiões de inibição na cultura do patógeno na presença das leveduras. Foram feitas imagens das bordas da malha fúngica e da estria de leveduras (quando presentes) sob lupa com um aumento de 10x.

O ensaio de antagonismo na germinação de esporos foi realizado de acordo com *Geng, et al*, (2011), seguido de análise por microscopia. O efeito de *K. marxianus* na germinação de esporos do patógeno foi avaliado em meio YP 0,1X [0,1% (p/v) de extrato de levedura, 0,2% (p/v) de peptona] suplementado com 4% de glicose. Os tubos contendo os ensaios foram incubados em 5 mL de meio e acrescidos com 100 µL (D.O. 0,7) de uma suspensão de *K. marxianus*, 100 µL de suspensão de esporos de *B. cinerea* ( $1 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>). Os tubos foram incubados a 25 °C com rotação de 90 x g por 12h. Foram contados 120 esporos em cada triplicata, através de microscopia óptica, utilizando a câmara de Neubauer. Os esporos foram considerados germinados quando o tubo de germinação excedeu o diâmetro do esporo. Cada tratamento foi realizado em triplicata e os experimentos realizados por três vezes.

### **3.9. Atividade antagonista *in vivo* de *Kluyveromyces marxianus***

A atividade antagônica *in vivo* foi realizada utilizando dois dos principais alvos do mofo cinzento durante o período de pós-colheita: uvas de mesa (*Vitis vinífera*) e morango (*Fragaria sp.*). Os cachos de uva de mesa (*Vitis vinífera*) foram lavados com água corrente

em abundância seguida de imersões subseqüentes de 20 min em água destilada, solução hipoclorito de sódio 2% (v/v) e água destilada. Os cachos foram então acomodados por 24h à temperatura ambiente para secagem completa das bagas seguida pela infecção induzida. As feridas para a infecção induzida foram feitas com um furo de  $\pm 2$  mm de profundidade, em cada baga, com o auxílio de uma microagulha estéril 8 x 0,30 - 30G 5/16''(BD). Depois de realizado o ferimento, os cachos foram inoculados através da aspersão de suspensão de esporos ( $1.10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>) em PBS (NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7). Os cachos foram então acomodados a 25 °C por 24h. Após 24h de infecção induzida os frutos foram aspergidos com 5 mL de *K. marxianus* CCT 7735 em suspensão com PBS na D.O. 0,5. Soluções contendo somente a suspensão de esporos do patógeno, suspensão de células da levedura e uma solução de PBS estéril foram também aspergidas e os frutos utilizados como controle da atividade de antagonismo. Os cachos foram então incubados a 25 °C e o peso percentual foi observado durante 9 dias de incubação. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Os morangos (*Fragaria sp.*) foram lavados com água corrente em abundância seguida de imersões de seqüenciais de 20 min em água destilada, solução hipoclorito de sódio 2% (v/v) e água destilada. Os pseudofrutos foram então acomodados por 24h à temperatura ambiente para secagem completa seguida pela infecção induzida. A ferida para a infecção induzida foi feita com um furo de  $\pm 2$  mm de profundidade com o auxílio de uma microagulha estéril 8 x 0,30 - 30G 5/16''(BD). Depois de realizada a ferida, os pseudofrutos foram inoculados através da aspersão de suspensão de esporos ( $1.10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>) em PBS. Os pseudofrutos foram então acomodados a 25 °C por 24h em câmara úmida. Após 24h de infecção induzida o tratamento foi realizado com a aspersão de 5 mL de uma suspensão celular de *K. marxianus* CCT 7735 em PBS com uma D.O. 0,5. Soluções contendo somente a suspensão de esporos do patógeno, suspensão de células da levedura e uma solução de PBS estéril foram também aspergidas e os frutos utilizados como controle da atividade de antagonismo. Os pseudofrutos foram então acomodados a 25 °C em câmara úmida e o peso percentual foi observado nos dias 2, 3 e 6 de incubação. Os experimentos foram feitos em triplicata.

### **3.10. Análise estatística**

Os experimentos apresentados foram realizados em triplicata e tiveram médias e desvios padrões calculados. A influência da levedura *K. marxianus* para a germinação de esporos de *B. cinerea* foi avaliada utilizando-se ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). Para análise da influência da levedura *K. marxianus* na massa percentual de frutos utilizou-se ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) seguida de teste t de Student ( $\alpha=0,05$ ) para efeitos principais e de interação entre cada fator.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. O extrato protéico de *K. marxianus* possui atividades de glicosidase e de protease

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados para confirmação da produção de  $\beta$ -glicanase e busca de outras possíveis hidrolases secretadas por *K. marxianus*. Os ensaios foram realizados com o extrato protéico, livre de células. A análise da variância (ANOVA) mostrou que a média das atividades específicas é diferente entre as linhagens testadas ( $p$ -valor =  $1,18 \cdot 10^{-13}$ ).

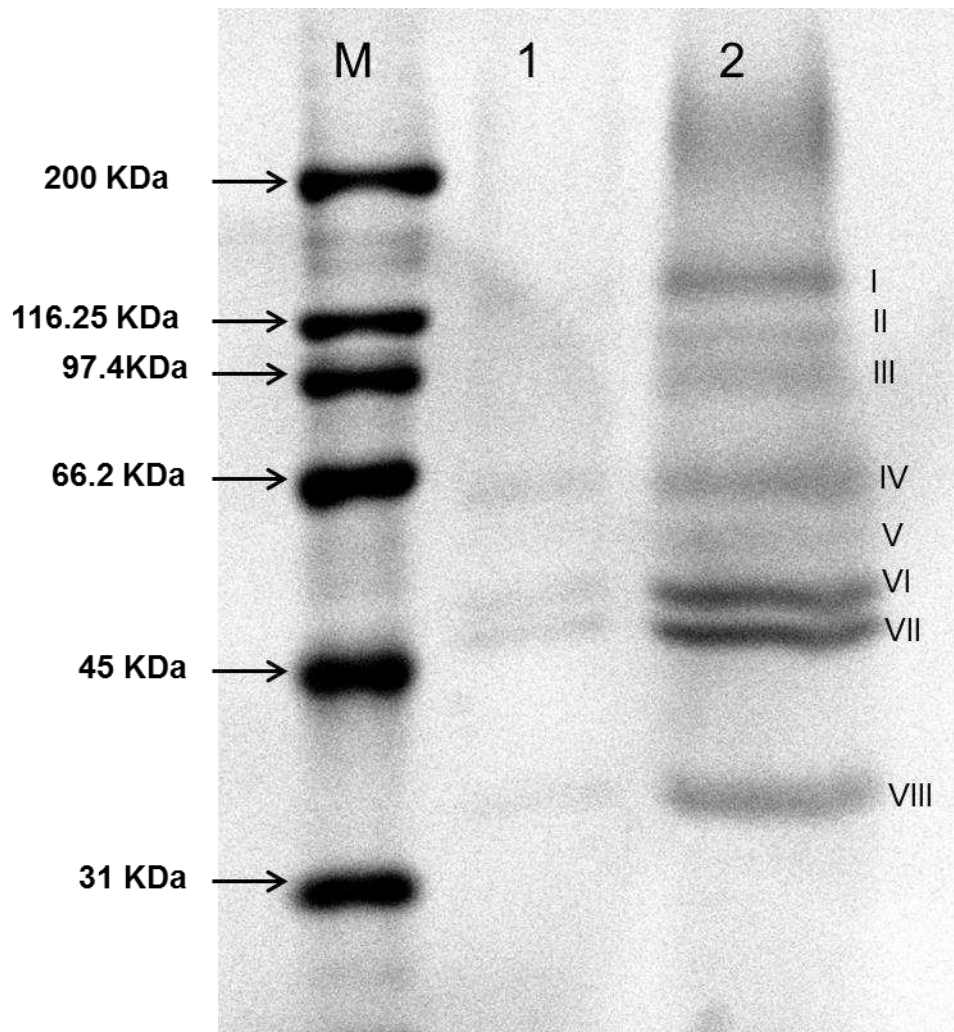
Tabela 1. Atividade específica ( $U \cdot mg^{-1}$ ) de glicanases e proteinases totais do extrato enzimático frente aos substratos pNP $\beta$ G e Azocaseína, respectivamente.

Linhagens <i>K. marxianus</i>	Substratos			
	pNP $\beta$ G	DP*	Azocaseína	DP*
CCT 7735	2,06	$\pm 0,07$	4,93E-03	$\pm 0,0002$
ATCC8554	1,33	$\pm 0,15$	3,63E-05	$\pm 4,62E-06$
UFMG 42	0,65	$\pm 0,09$	2,23E-06	$\pm 3,06E-07$
UFMG 43	0,71	$\pm 0,08$	1,33E-05	$\pm 2,08E-06$
UFMG 44	0,66	$\pm 0,03$	3,93E-06	$\pm 2,08E-07$

\*DP=Desvio Padrão

#### **4.2. *K. marxianus* CCT 7735 secreta um conjunto enzimas hidrolíticas**

O conjunto de proteínas secretadas por *K. marxianus* CCT 7735, foi visualizado inicialmente por eletroforese em gel de acrilamida SDS-PAGE e apresentando 8 spots em destaque (figura 1). O extrato concentrado em coluna e o extrato bruto precipitado com acetona foram observados no gel em *spots* de proteína, nos intervalos entre 31 a 200 KDa (Figura 1). Os *spots* majoritários foram removidos do gel e digeridos com tripsina. Os peptídeos tripticos foram sequenciados por espectrometria de massas utilizando MALDI-TOF-TOF e Q-TOF.



**Figura 1. Gel SDS-PAGE das proteínas do extrato.** As proteínas do secretado de *K. marxianus* em SDS-PAGE utilizando um gradiente de 5-10% de poliacrilamida em gel Tris-tricina. A coluna M corresponde aos padrões protéicos. A coluna 1 representa o extrato protéico centrado 10x. A coluna 2 representa o precipitado de 4ml do extrato protéico. Coloração com Coomassie-Blue G-250 coloidal. Os spots utilizados estão indicados pelos números romanos à direita.

Os peptídeos trípticos foram identificados inicialmente por MALDI-TOF, os que não obtiveram um sinal claro no espectro MS1 foram submetidos à análise por Q-TOF. A combinação das duas metodologias assegurou uma maior cobertura de identificação permitindo que fossem identificadas 27 proteínas nos sete spots analisados, entre elas quatorze proteínas hidrolases (Tabela 2). Entre as hidrolases identificadas, 7 são da família das glicosidase (Figura 3). As proteínas foram identificadas com score acima de 85% no MASCOT e um FDR de 1% no PEAKS. Entre as proteínas hidrolases, todas foram identificadas com dois ou mais peptídeos únicos alinhados ao banco de dados de fungos. Foi identificada no extrato protéico uma endo- $\beta$ -1,3-glicanase de massa molecular acima de 100 KDa. A proteína não caracterizada foi agrupada juntamente com as proteínas hidrolases por estar anotada no banco de dado UNIPROT como uma glicosidase ainda não caracterizada. Apesar de não termos encontrado atividade quitinase nos testes enzimáticos do extrato, uma endoquitinase foi identificada entre as hidrolases. Confirmando os resultados dos testes de atividade foi identificada uma protease classificada como uma protease aspártica da família das peptidases aspárticas. Entre as 27 proteínas identificadas, 24 possuem um peptídeo sinal com confirmação da sequência de sítios de clivagem na região N-terminal logo após a sequência hidrofóbica característica do peptídeo sinal, segundo análise realizada pelo programa *SignalP-4.1 prediction*. Entre as proteínas identificadas pelo alinhamento dos peptídeos no PEAKS, duas não foram identificadas e não apresentaram similaridade, acima de 50%, com outras proteínas do UniProt Reference Clusters UniRef) (Tabela 2).

As proteínas do extrato enzimático estão distribuídas entre um grupo representativo de diferentes famílias como as glicosil hidrolases 5, 16, 17, 32, fosfoesterases e proteases. As hidrolases também chamadas glicosidases compreende o grupo de enzimas responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas em açúcares complexos. As classificações das proteínas em suas respectivas famílias foram feitas de acordo com o banco de dados *Carbohydrate-active enzymes* (CAZy) e do Uniprot. Sendo predominantes as famílias glicosidases e das transferases com 66% do total das famílias identificadas no secretado celular de *K. marxianus* CCT7735 (Tabela 2). A família GH 72 é a família com maior representatividade no extrato protéico. Essa família é formada exclusivamente por transglicosilases fúngicas, que são enzimas comumente ancoradas à membrana plasmática e estão diretamente relacionadas com o crescimento e manutenção da parede celular. Entre o grupo de proteínas que não tiveram

ainda seus dados anotados nos bancos de dados consultados, estão incluídas as proteínas não caracterizadas nesse estudo.

Tabela 2. Análise por espectrometria de massa das proteínas presentes no extrato enzimático secretado por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 após 48h de cultivo em YPD 0,1X, 4% de glicose.

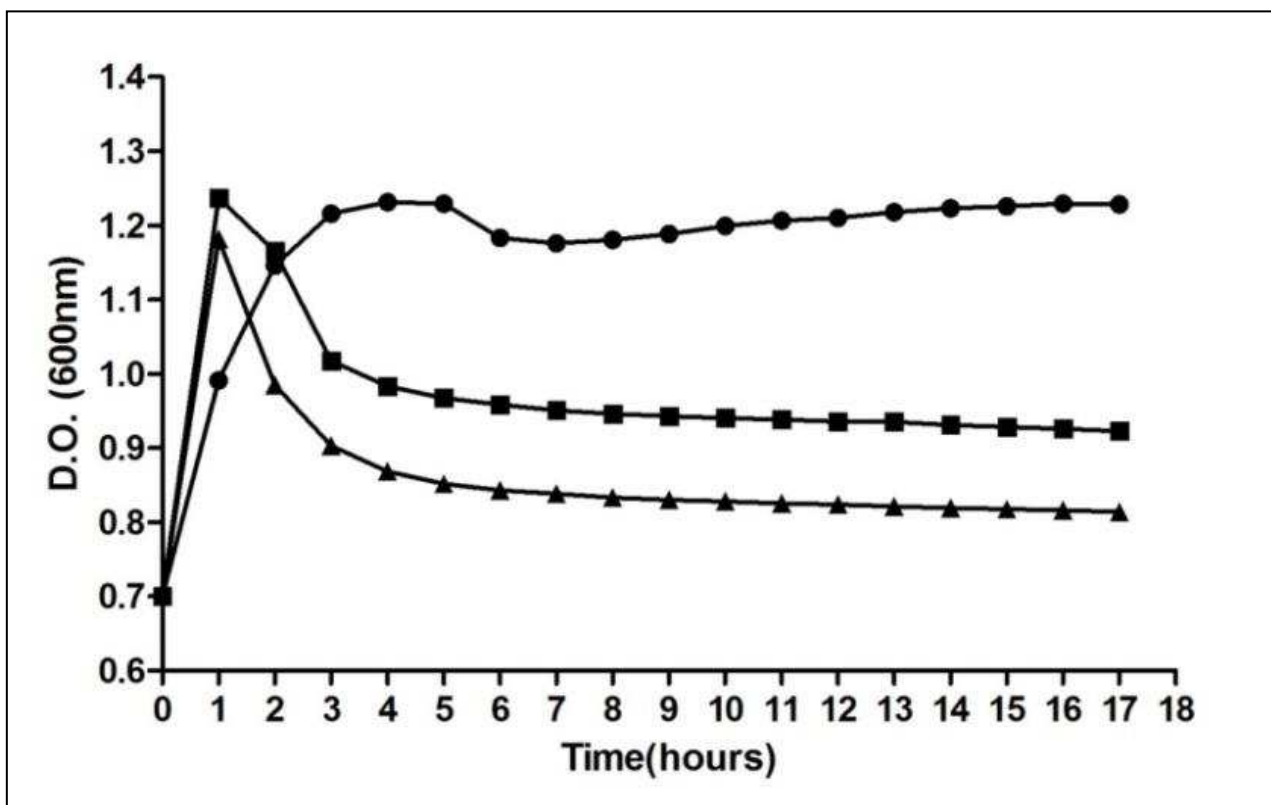
<i>K. marxianus</i> <i>ORF</i>	Proteína	Peptídeo único (FDR1%)	Peptídeo sinal	Massa (Da)	Família	Spot
<b>Hidrolase</b>						
<b>Kmar_80183</b>	Bgl2	2	+	33,996	Glicosil hidrolase 17	VIII
<b>Klma_10234</b>	$\beta$ -1,3-glicosidase	6	+	49,491	Glicosil hidrolase 5	I; II
<b>Kmar_10210</b>	$\beta$ -1,3-glicosidase	5	+	49,859	Glicosil hidrolase 5	VI; VII
<b>Kmar_20177</b>	Endo- $\beta$ -1,3-glicanase	3	+	108,848	Glicosil hidrolase 81	II
<b>Klma_40287</b>	Glicosidase crh1	2	+	47,816	Glicosil hidrolase 16	III
<b>Kmar_40294</b>	Glicosidase crh1	2	+	47,816	Glicosil hidrolase 16	I
<b>Klma_30283</b>	Glicosidase crh2	3	+	50,665	Glicosil hidrolase 16	I
<b>Kmar_30580</b>	Glicosidase scw10	4	+	38,542	Glicosil hidrolase 17	I; IV; V
<b>Klma_10216</b>	Endoquitinase	2	+	58,934	Glicosil hidrolase 18	I
<b>Kmar_20509</b>	Proteinase aspártica 3	3	+	62,907	Peptidase A1	I; II
<b>Klma_40003</b>	Fosfatase ácida	6	+	52,559	Fosfoesterase	I; II
<b>Kminu1</b>	Inulinase	12	+	62,204	Glicosil hidrolase 32	I; II
<b>Kmar_10798</b>	c800. 11	3	+	40,399	Inosina/uridina nucleosídeo hidrolase	I; II
<b>Epg1</b>	Endopoligalacturonase	2	+	37,621	Glicosil hidrolase 28	I
<b>Transferase</b>						
<b>Kmar_80193</b>	$\beta$ -1,3-glicosiltransferase	11	+	60,437	Glicosil hidrolase 72	I; II
<b>Kmar_10289</b>	$\beta$ -1,3-glicosiltransferase	3	+	54,598	Glicosil hidrolase 72	I; II
<b>Kmar_80192</b>	$\beta$ -1,3-glicosiltransferase	7	+	58,526	Glicosil hidrolase 72	I; II
<b>Kmar_50392</b>	$\beta$ -1,3-glicosiltransferase	3	+	51,798	Glicosil hidrolase 72	I
<b>Klma_80196</b>	$\beta$ -1,3-glicosiltransferase	3	+	60,485	Glicosil hidrolase 72	III
<b>Lisofosfolipase</b>						
<b>Kmar_10235</b>	Lisofosfolipase	1	+	71,054	Lisofosfolipase	I
<b>Estrutural</b>						
<b>Kmar_30528</b>	Proteína de parede ecm33	4	-	36,722	Glicosil hidrolase	I; II; III
<b>Kmar_50235</b>	Manoproteína hsp150	4	-	32,289	PIR proteína	I; II
<b>Klma_60543</b>	sun4	2	+	41,797	SUN	I; II
<b>Klma_70062</b>	Proteína de ligação da parede 14	4	+	21,232		I; II
<b>Klma_50255</b>	Manoproteína hsp150	1	+	34,578		II

	Não Caracterizada				
<b>Klma_10829</b>	Não caracterizada	9	+	32,901	I; II; IV
<b>Klma_10826</b>	Não caracterizada	3	+	22,846	II

---

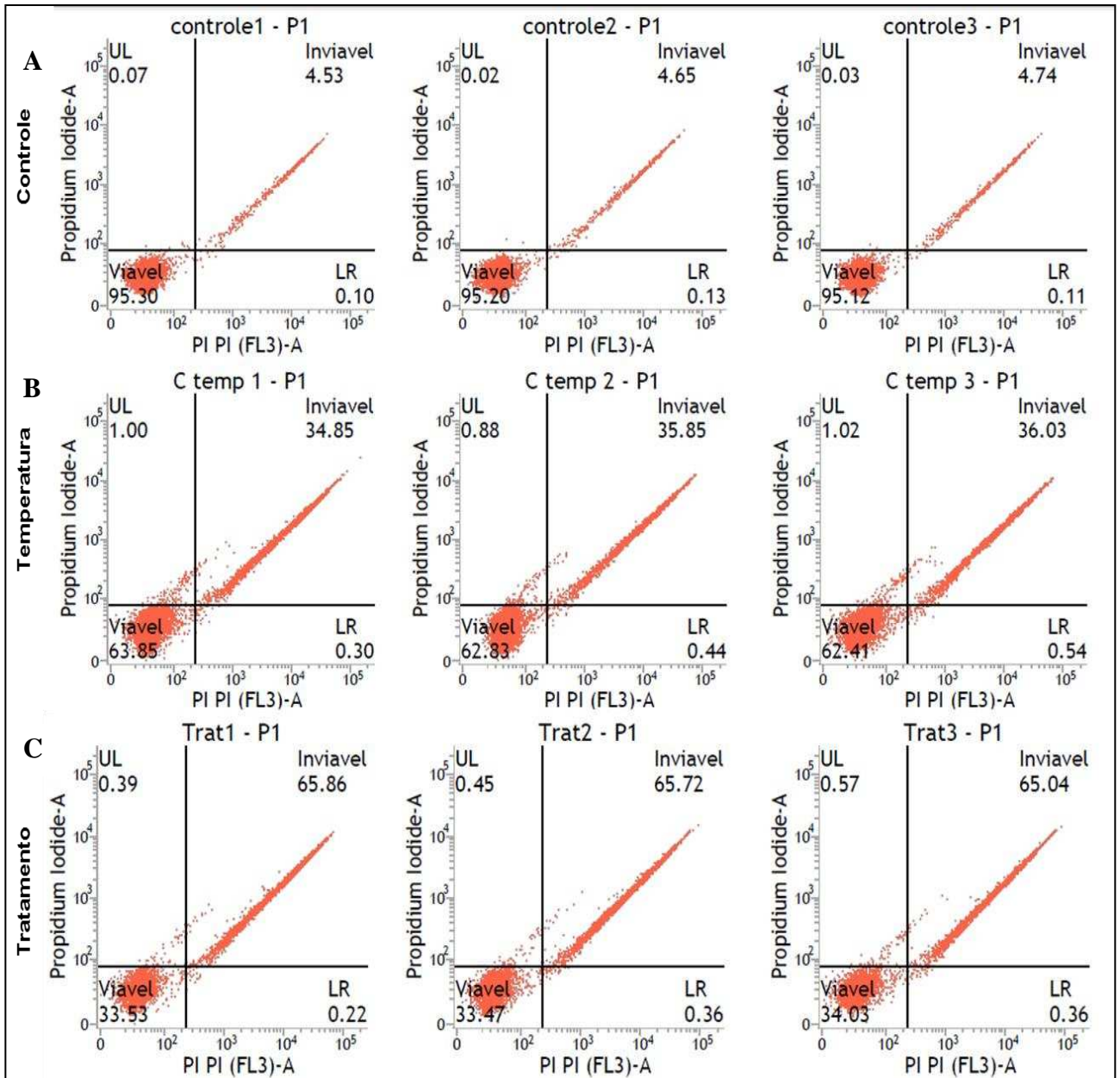
### 4.3. Atividade lítica do extrato secretado por *K. marxianus* sobre *S. cerevisiae*

Os extratos enzimáticos, livre de células, de duas cepas de *K. marxianus* foram capazes de causar redução da densidade óptica (D.O.) quando incubados com a cultura de *S. cerevisiae* W303. Quando comparados, o extrato enzimático da linhagem CCT 7735 mostrou-se mais efetiva para a redução da densidade óptica no ensaio enzimático entre as duas linhagens de *K. marxianus* houve diferença na redução da densidade óptica da cultura de *S. cerevisiae* W303. Um aumento inicial da D.O. foi observado na primeira hora de incubação em todos os ensaios. Atribuiu-se a esse efeito a liberação dos brotos que são formados durante o crescimento da levedura quando na presença de abundantes proteínas glicosil hidrolases do extrato enzimático (Figura 2).



**Figura 2. Ação do extrato enzimático na densidade óptica da cultura de *S. cerevisiae*.** Ação do extrato de *K. marxianus* CCT 7735 e *K. marxianus* ATCC 8554 sobre as células alvo de *S. cerevisiae* W 303. Células alvo incubadas com tampão (●); células alvo incubadas com 0,5 U.mg<sup>-1</sup> do extrato enzimático concentrado da linhagem ATCC 8554 (■); linhagem CCT 7735 (▲).

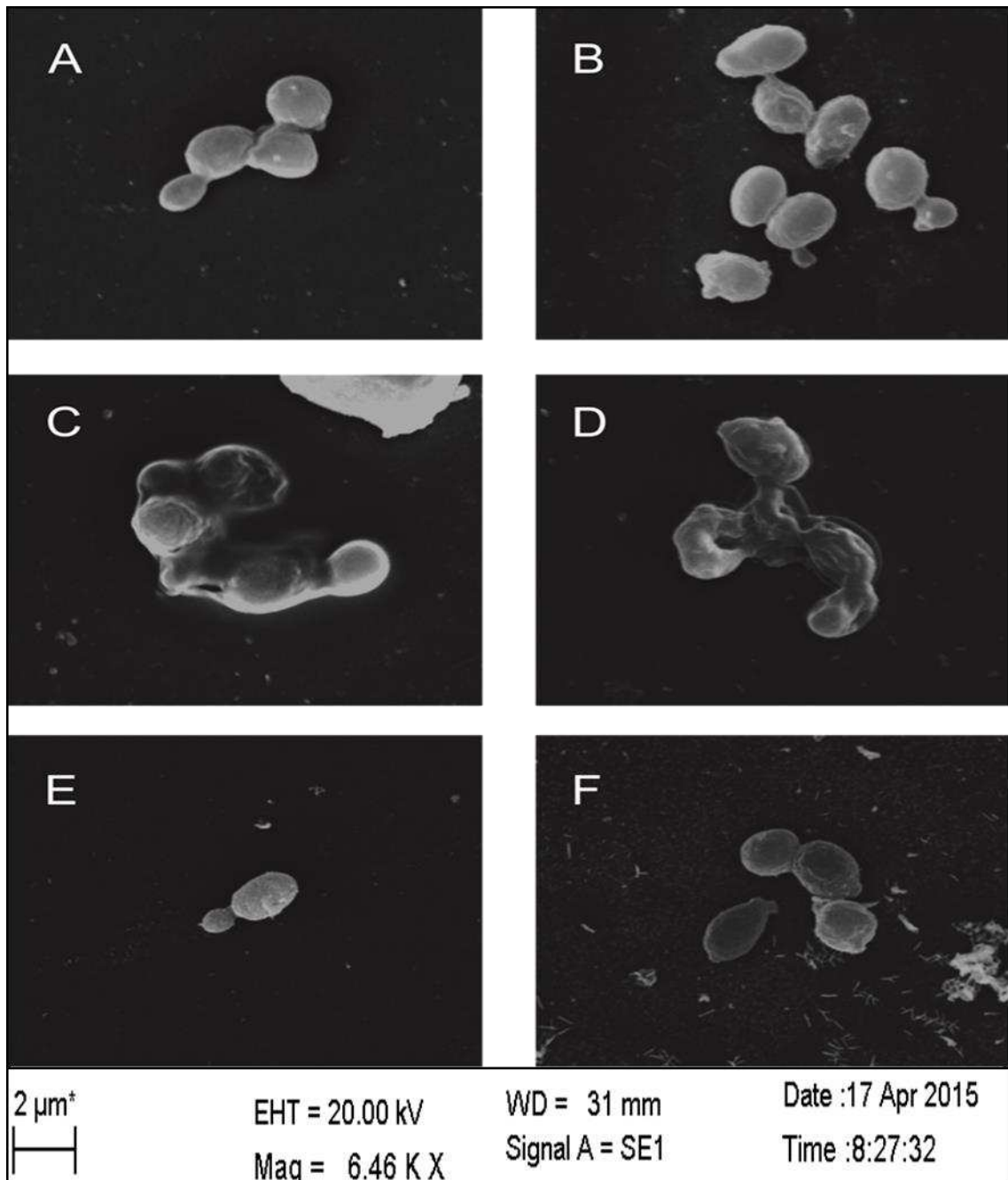
Células de *S. cerevisiae* tratadas com o extrato enzimático de *K. marxianus*, apresentaram redução da população de células viáveis (Figura 3 C). Esse resultado mostra que aproximadamente 65% das células de *S. cerevisiae* expostas ao tratamento enzimático tornaram-se inviáveis após 15h de tratamento. As células que foram incubadas somente na presença de tampão citrato também apresentaram uma taxa de células inviáveis de 35,6% (Figura 3 B), quando comparadas às células que não foram tratadas.



**Figura 3. Citometria de fluxo de células de *S. cerevisiae*.** Células *S. cerevisiae* W303 tratadas com  $0,5 \text{ U.mg}^{-1}$  do extrato enzimático concentrado durante 15 h a  $45^\circ \text{C}$  e sensibilizadas com iodeto de propídio: (A) células não tratadas em PBS; (B) células tratadas somente com temperatura e (C) células tratadas com extrato enzimático concentrado.

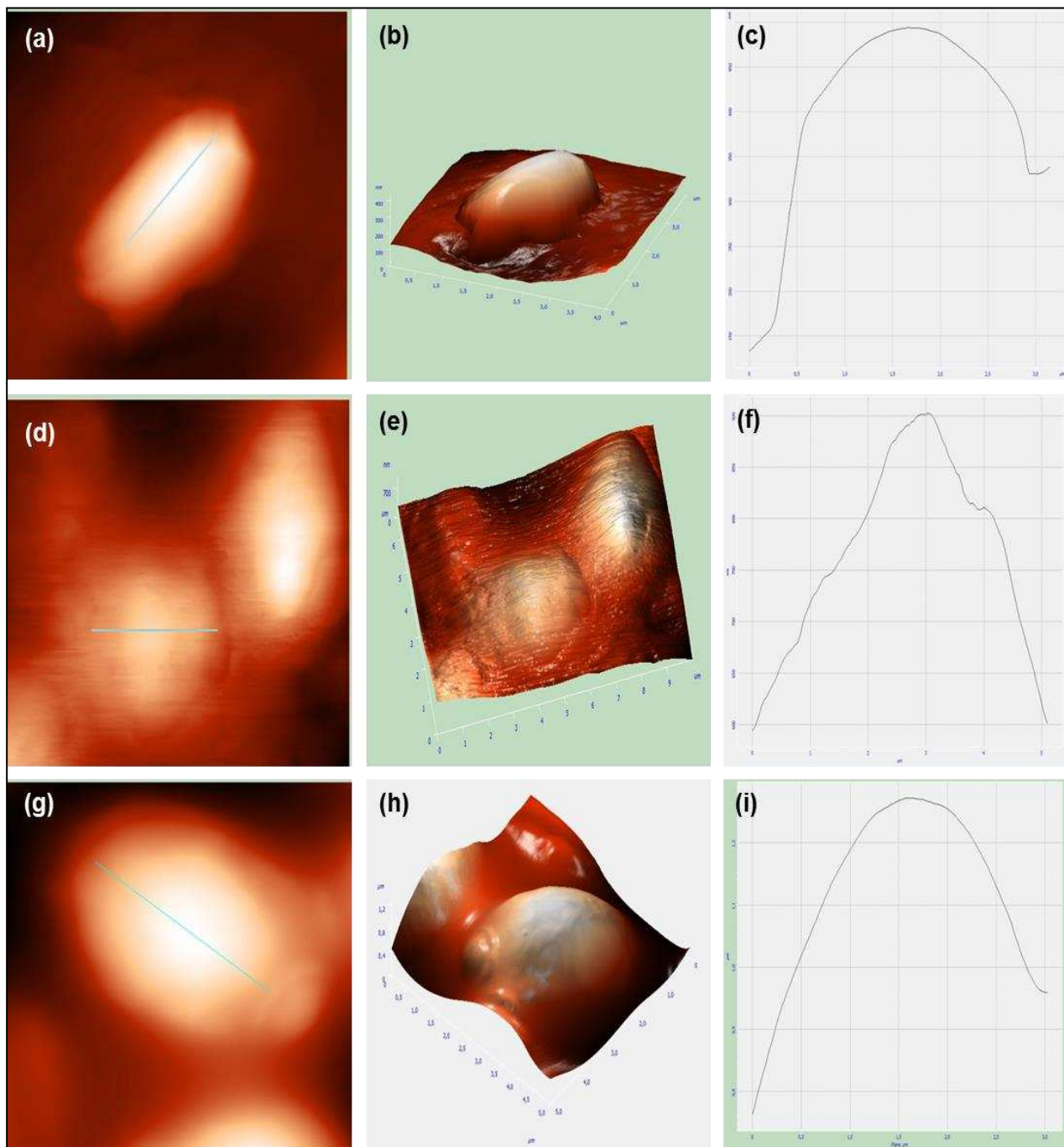
#### **4.4. O extrato enzimático secretado por *K. marxianus* degrada a parede celular de leveduras *S. cerevisiae***

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que após o tratamento com o extrato enzimático, as células alvo apresentam rugosidades e deformações na superfície da parede celular (Figura 4). As mudanças ultra-estruturais observadas nas células alvo agravam-se no decorrer tempo, sendo no tempo 15 h onde se observou maior dano e alteração da forma inicial da célula (Figura 4-A e D). Os resultados mostram ainda que as alterações estruturais das células não sofrem influência direta da temperatura de 45 °C utilizada no tratamento com o extrato enzimático (Figura 4-E). A adição do sorbitol, um osmorregulador celular, preservou o turgor celular durante o tratamento com o extrato protéico (Figura 4-F).



**Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura das células de *S. cerevisiae*.** Células *S. cerevisiae* W303 tratadas com o extrato enzimático de *K. marxianus* CCT 7735 e teste *in vitro*, utilizando meio sólido YPD 2% a 25 °C, da atividade antagônica das leveduras *K. marxianus* CCT 7735 e *K. marxianus* ATCC 8554 sobre o fungo *Botrytis cinerea* CCF 109 incubado previamente por 24 h antes da adição das leveduras antagônicas. Em (A) células não tratadas; (B) células após 3 h de tratamento; (C) células após 5 h de tratamento (D) células após 15h de tratamento; (E) células após 15 h de tratamento somente com a temperatura de 45 °C; (F) células tratadas após 15 h com adição de 0,5 M de sorbitol.

Com a microscopia de força atômica (MFA), as células foram visualizadas em alta resolução, sem o revestimento de ouro utilizado na MEV e frescas, produzindo imagens que permitiram estudos mais detalhados da rugosidade do envelope das leveduras sensíveis ao extrato enzimático. A análise MFA mostrou que a rugosidade das células não tratadas foi diferente das amostras tratadas com extrato. Foi traçada uma linha transversal na superfície das células que mostrou que as células que foram expostas apenas à temperatura de incubação apresentaram um perfil de rugosidade semelhante entre elas (Figura 5-c, i). A superfície das células tratadas com o extrato apareceu irregular, mostrando um perfil com alto nível de rugosidade (Figura 5- e, f). Além disso, o tamanho das células observadas mostrou uma redução e alteração da normalidade da forma nas células tratadas com extrato em comparação às células não tratadas (Figura 5- b, e, h). As imagens da MFA confirmaram os resultados obtidos pela MEV.



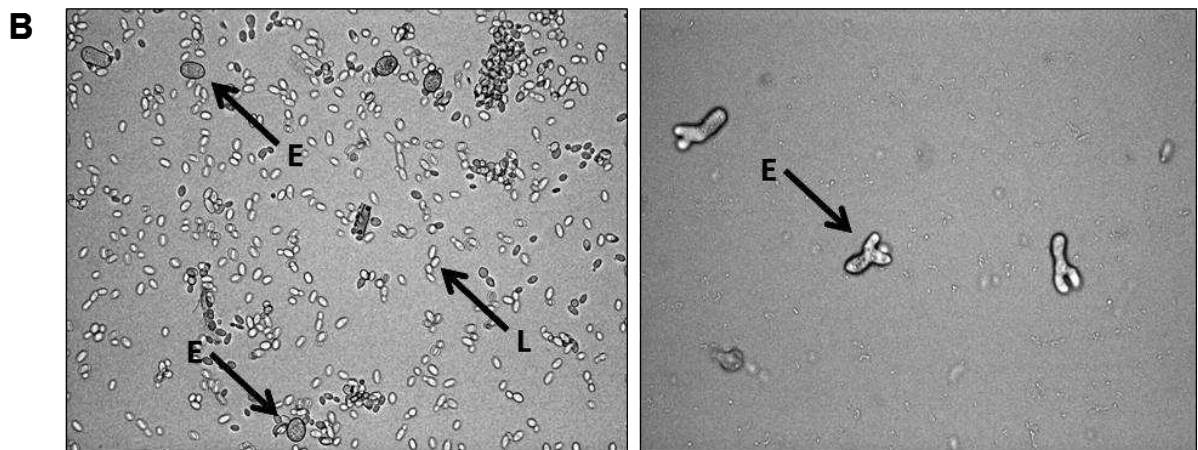
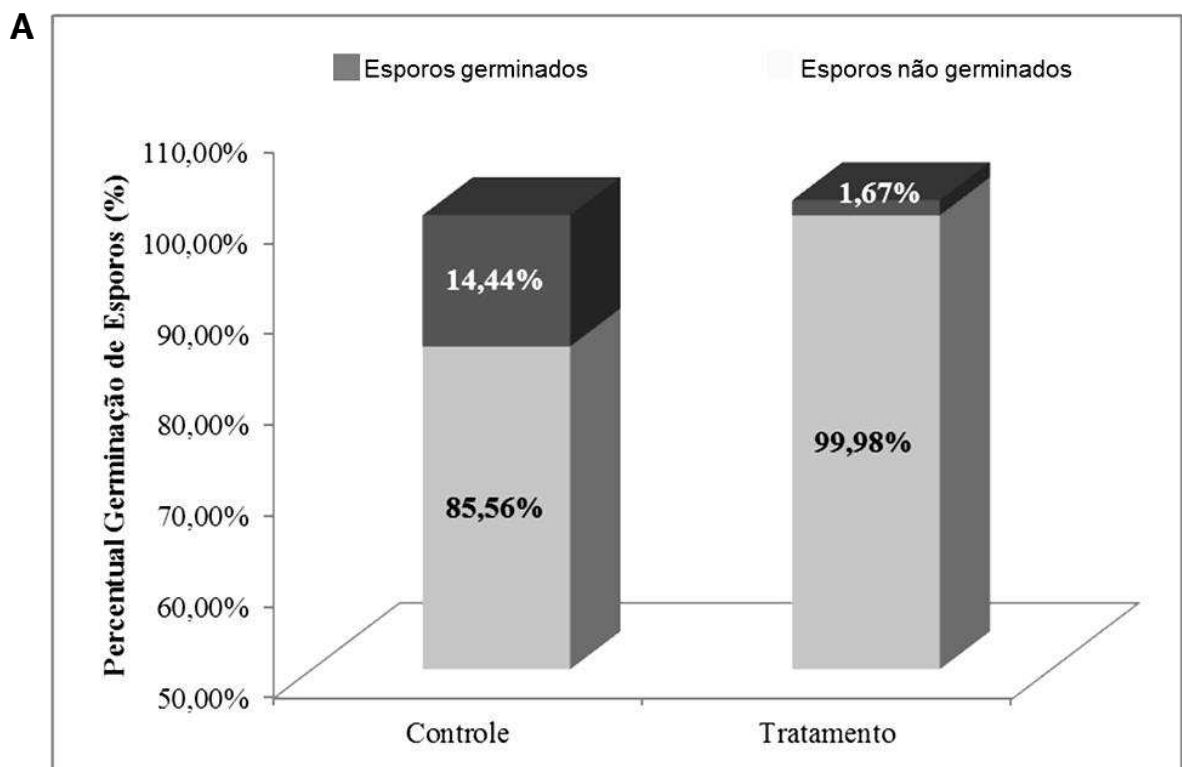
**Figura 5. Microscopia de força atômica de células de leveduras.** Varredura da superfície de células de *S. cerevisiae* W303 por AFM. (a-b-c) Células não tratadas; (d-e-f) células tratadas durante 15 h com  $0,5 \text{ U.mg}^{-1}$ ; (g-h-i) células tratadas somente com temperatura  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **4.5. *Kluyveromyces marxianus* possui atividade antagonista ao fungo *Botrytis cinerea***

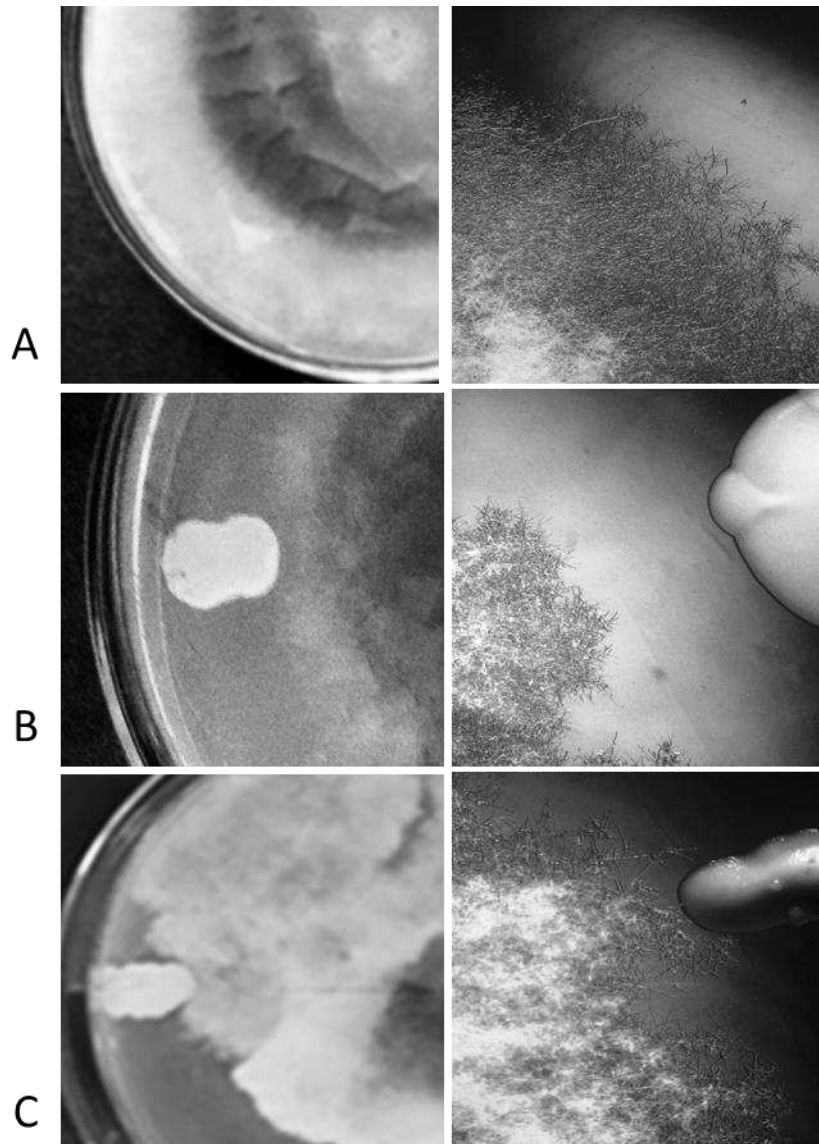
Os testes de avaliação da atividade antagonista de *K. marxianus* CCT 7735 contra *Botrytis cinerea* CCF 109 realizados *in vitro* foram feitos na etapa de germinação de esporos e no crescimento do micélio em placas de Petri. A inibição da germinação dos esporos foi avaliada após 12h de crescimento dos esporos na presença e na ausência da levedura *K. marxianus* CCT 7735. A contagem dos esporos germinados na câmara de Neubauer mostrou diferença significativa (*P*-valor 0,0003) quando os esporos foram cultivados na presença da levedura (Figura 6-A). A taxa de inibição da germinação de foi de 88% após 12h de incubação. Os esporos foram considerados germinados quando o tubo de germinação ultrapassou o diâmetro da célula (Figura 6-B).

A inibição do crescimento do *Botrytis cinerea* CCF 109 em placa mostrou que a linhagem CCT 7735 foi ativa contra *Botrytis cinerea* CCF 109 a 25°C o que pode ser observado pelo não crescimento do fungo em torno da cultura de levedura estriada. Quando o fungo foi cultivado em conjunto à *S. cerevisiae* W303. Observou-se um crescimento irregular do micélio fúngico ao redor da cultura da levedura. (Figuras 7-A e B).

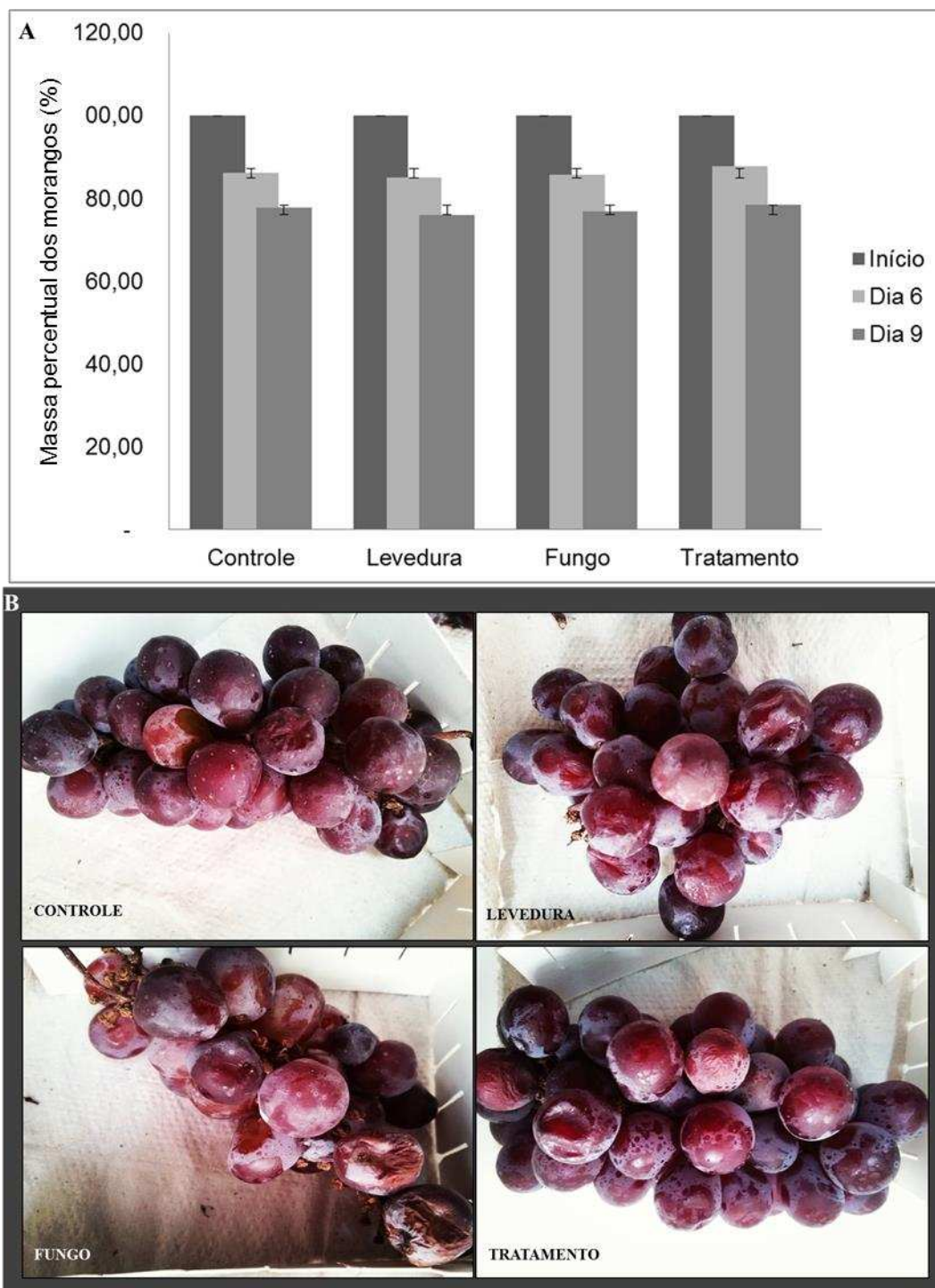
Os ensaios de inibição *in vivo* realizados com os cachos da uva de mesa não mostraram uma diferença significativa das médias dos valores dos pesos percentuais ao longo do período de incubação (Figura 8-A). No tempo final do período de incubação os frutos já apresentavam sinais de desidratação, sendo observado o efeito nos controles e no tratamento através da perda simultânea de peso (Figura 8-B).



**Figura 6. Inibição da germinação de esporos de *B. cinerea* CCF 109 por *K. marxianus* CCT 7735. (A) Percentual da taxa de inibição dos esporos após 12h de incubação. (B) Microscopia óptica em um aumento de 40 vezes dos esporos germinados indicados pelas setas no controle e no tratamento com a presença da levedura antagonista.**

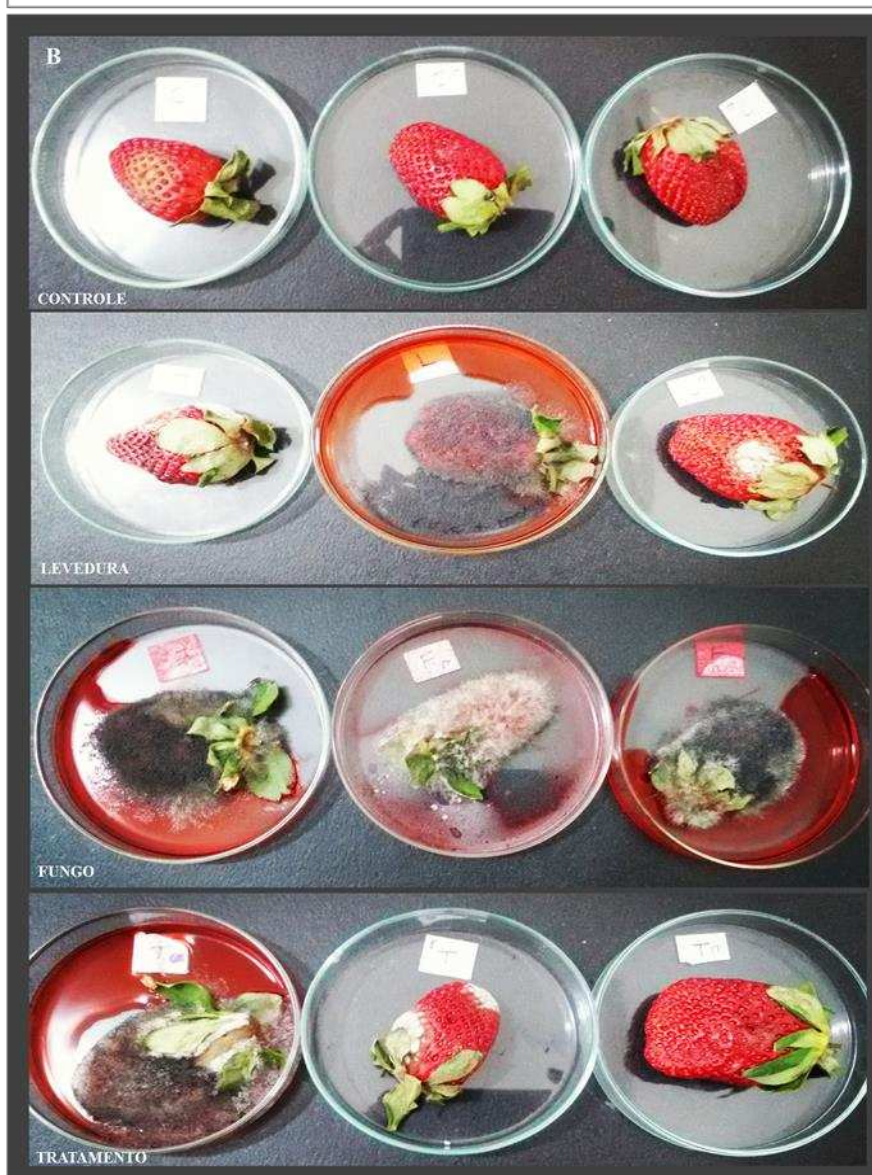
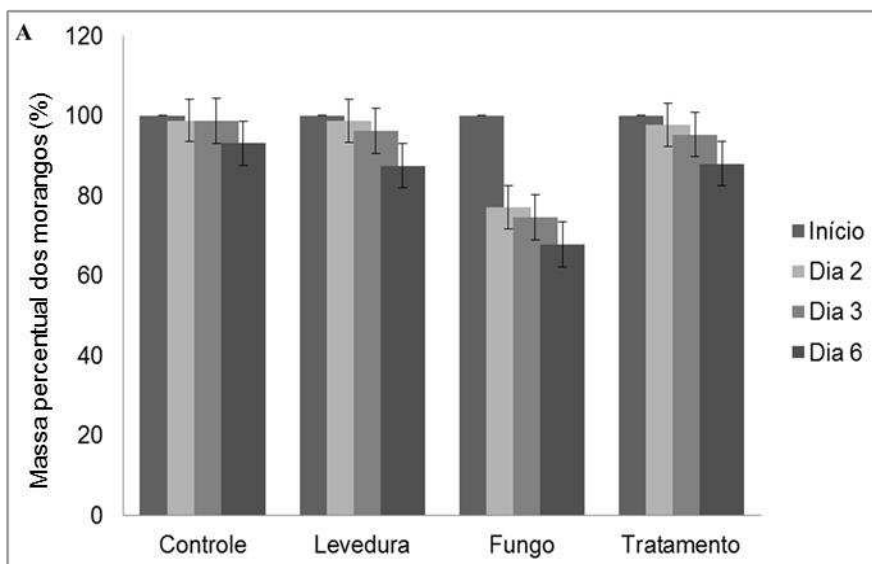


**Figura 7. Inibição *in vitro* de *Botrytis cinerea* em meio PDA sob lupa.** À esquerda está representado o crescimento do fungo *B. cinerea* (A), *K. marxianus* CCT773 inibindo o crescimento de *B. cinerea* (B) e *B. cinerea* na presença de *S. cerevisiae* W303 sem inibição(C). À direita, micélios de cada cultura à esquerda são mostrados sob a aproximação de lupa (aumento 10x).



**Figura 8. Tratamento *in vivo* das uvas.** (A) Gráfico de distribuição das médias dos pesos entre os tratamentos ao longo de 9 dias de incubação ( $p=9,98E-01$ ). (B) Aspectos físicos das bagas após 9 dias de incubação.

Os ensaios realizados com os morangos apresentaram uma diferença significativa entre a variância das médias percentuais dos pesos dos pseudofrutos (Figura 9-A). A comparação entre o grupo de morangos tratados com os esporos e o tratamento com a levedura foi feita pelo teste t de *Student* e mostrou uma diferença significativa entre as médias dos pesos sendo o peso percentual do tratamento maior que o peso percentual do grupo tratado com o *B. cinerea* ( $p=3,55E-03$ ). Os morangos, por possuírem um tempo mais curto de deterioração, tiveram suas pesagens realizadas nos primeiros três dias de infecção e a data final de incubação no sexto dia. O controle negativo sucumbiu à infecção pelo *B. cinerea* já ao terceiro dia, sendo o tratamento com *K. marxianus* CCT 7735 eficaz em manter o peso percentual semelhante ao controle positivo (Figura 11-B).



**Figura 9. Tratamento *in vivo* dos morangos.** Distribuição das médias das massas após 6 dias de incubação (A). Aspectos físicos dos morangos em réplicas, após 6 dias de incubação (B).

## 5. DISCUSSÃO

A conservação pós-colheita de frutos é etapa crucial para diminuir as perdas causadas por fungos patogênicos. A busca por estratégias para reduzir custos e perdas econômicas devido à contaminação por fungos e também agregar valor à produção é interesse da indústria e da comunidade científica. O uso contínuo e crescente de conservantes químicos e defensivos agrícolas no tratamento pós-colheita de morangos e uvas acarreta problemas como a seleção de cepas resistentes, assim como o aumento da fiscalização a despeito da toxicidade e segurança desses produtos utilizados para o meio ambiente e para o consumo humano (Ghaouth, *et al.*, 2016). O mercado externo tem então, aumentado o rigor a respeito da quantidade de resíduos químicos permitidos nos insumos comercializados (Jacometti, *et al.*, 2016). A busca por alternativas de biocontrole se faz então necessária e a utilização de leveduras antagonistas ganham destaque pelas vantagens oferecidas

O sequenciamento das proteínas secretadas por de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 por espectrometria de massas revelou um conjunto de hidrolases no extrato enzimático (Tabela 2). As glicanases encontradas no presente trabalho pertencem ao grupo das glicosil hidrolases, um grupo de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais hidratos de carbono ou entre um hidrato de carbono e uma porção não hidrato. Além da endo-1,3- $\beta$ -glicanase já identificada previamente por nosso grupo (Lopes, *et al.*, 2013) foram identificadas duas  $\beta$ -1,3-glicosidase, uma  $\beta$ -glicosidase (Bgl2) e uma glicosidase scw10. As duas  $\beta$ -1,3-glicosidase secretadas por *K. marxianus* têm em média uma massa molecular de 39,5 KDa e pertencem à família das glicosil hidrolases cinco, essa família compreende enzimas com diversas atividades, incluindo endoglicanase, beta-mananase, exo-1,3-glucanase, endo-1,6-glicanase, xilanase e endoglicoceramidase. A família 5 das glicosil hidrolases também é conhecida como a família das celulases, suas enzimas estão envolvidas na degradação de celulosas e xilanos (Beguin, 1990). Outra hidrolase, secretada por *K. marxianus* e identificada no extrato enzimático foi uma endoquitinase de 59 KDa. Essa hidrolase pertence à família 18 de glicosídeo hidrolases e alguns membros dessa família GH 18 pertencem ao grupo de quitinases classe II que inclui quitinase, chitodextrinase e uma toxina killer de *Kluyveromyces lactis* (Stark & Boyd, 1986; Colussi, *et al.*, 2005).

No extrato enzimático de *K. marxianus* foi encontrada uma protease alinhada com uma protease aspártica de 62,9 KDa, pertencente à família de peptidases aspárticas. Essa família possui ampla distribuição sendo encontrada em vertebrados, fungos, plantas, retrovírus e alguns vírus de plantas. Em fungos, as representantes mais comuns de peptidases aspárticas são aspergillopepsina, candidapepsina, mucoropepsina e rhizopuspepsina. Proteinases aspárticas secretadas por leveduras como a *Candida albicans* já foram reportadas como responsáveis pela degradação de proteínas presentes na matriz extracelular (Rodier, *et al.*, 1999). A ação combinada da protease juntamente com as demais hidrolases presentes no extrato parece auxiliar na capacidade de causar danos na ultra-estrutura da parede celular de *S. cerevisiae* observada no presente estudo. Uma  $\beta$ -1,3-glicanase e duas proteases da bactéria *Oerskovia xanthineolytica* foram purificadas e usadas na tentativa de lisar parede celular de *S. cerevisiae*, o estudo mostra que a incubação simultânea dessas enzimas resulta na melhora da lise da parede celular (Ventom & Asenjo, 1991). Algumas das proteínas encontradas no extrato enzimático (Tabela 2) estão envolvidas na síntese e manutenção da parede celular da levedura, entre elas, estão as proteínas transferases e as constituintes da parede e da membrana (Fang, *et al.*, 2013; Mazan, *et al.*, 2011). Em leveduras, as porções de quitina componentes da parede vão ser encontradas principalmente nas regiões de brotamento das células (Okada, *et al.*, 2016).

A existência dessa multiplicidade de enzimas glicanases já foi descrita para um fungo filamentososo, o fungo *Trichoderma harzianum* que secreta no mínimo, sete  $\beta$ -1,3-glicanases quando cultivado em laminarina, e parede celular do fungo *Mucor rouxii*. Vázquez-Garcidueñas *et al.*, (1998) mostraram que a produção de  $\beta$ -1,3-glicanases, quitinases e proteases extracelulares aumentaram significativamente quando uma espécie de *Trichoderma* foi cultivada em meio suplementado com micélio autoclavado ou parede celular fúngica. As hidrolases encontradas no secretado de *K. marxianus* podem estar relacionadas com o crescimento celular e os mecanismos de manutenção e reparo da parede, assim como a liberação de brotos ao longo do crescimento.

A ação do extrato enzimático de *K. marxianus* na ultra-estrutura da parede celular de *S. cerevisiae* W303, observada nas imagens de MEV e MFA, sugere que essa levedura possui um potencial antagonista para controle biológico (Figuras 4 e 5). Quando incubadas com extrato enzimático conjuntamente com as células alvo de *S. cerevisiae* a ação de  $\beta$ -glicanases

tem como alvo a parede celular. Isso porque, a parede celular desses microrganismos é abundante em  $\beta$ -glicanos. As  $\beta$ -glicanases são de grande interesse biotecnológico e sua ação em paredes de fungos e leveduras já foi descrita por ser responsável por danos à integridade da parede celular por uma toxina *killer* com atividade  $\beta$ -glicanase denominada Kpkt e secretada por *Tetrapisispora phaffii* (Comitini *et al.*, 2009). Uma preparação enzimática proveniente de *Trichoderma spp.* e *Aspergillus niger* contendo  $\beta$ -glicanases mostrou ação hidrolítica na parede celular de duas cepas de *S. cerevisiae* tipicamente empregadas na produção de vinhos espumantes. A liberação de componentes da parede celular da levedura no vinho após essa degradação acelerou algumas características de envelhecimento de vinhos espumantes tradicionais (Torresi *et al.*, 2014).

A análise por citometria de fluxo mostra a redução da viabilidade das células de *S. cerevisiae* quando tratadas com o extrato enzimático concentrado (Figura 3). A temperatura de 45 °C, utilizada no tratamento, pode ter alterado a permeabilidade da membrana, facilitando a absorção de iodeto de propídeo para o interior das células resultando em uma interferência da temperatura na viabilidade celular. O mesmo efeito não foi encontrado nas imagens de microscopia e a manutenção do turgor das células na presença de um osmorregulador reafirma a ação específica das enzimas do extrato na parede celular das leveduras (Figura 4-f).

A inibição da germinação de esporos é etapa essencial para a contenção dos fungos patogênicos, isso porque essa forma de propágulo é comumente a forma inicial da infecção. A parede celular dos esporos fúngicos também possui composição diferenciada devido à especialização da estrutura (Neiman, 2011). O percentual de inibição de germinação de esporos pela *K. marxianus* de 88% em 12 h e a capacidade de secretar proteínas hidrolases em conjunto, tornam essa levedura um potencial microrganismo de biocontrole. Entre os mecanismos já descritos de biocontrole, a inibição da germinação de esporos acontece principalmente nas primeiras 24 h com a ocupação do espaço físico e utilização dos recursos energéticos do meio com mais eficiência pelo microrganismo antagonista (Cohen, *et al.*, 1998). As interações microbianas *in vitro* em meio sólido, comumente resultam em um dos seguintes resultados: produção de uma zona de inibição, inibição por contato ou nenhuma inibição. Os resultados mostram que as interações entre *K. marxianus* CCT 7735 e *B. cinerea* CCF 109 causam a formação de uma zona de inibição. Resultado semelhante não foi

observado quando o fungo foi incubado juntamente com *S. cerevisiae*, utilizada como parâmetro comparativo. Estes aspectos estão relacionados com a variação do potencial de biocontrole entre as leveduras, a eficiência em utilizar os nutrientes disponíveis no meio e a capacidade de secretar enzimas. Resultados similares, foram observados em estudos de antagonismo com leveduras não *Saccharomyces*. Leveduras *Debaryomyces hansenii* e *Pichia anomala* isoladas do café, foram eficazes na inibição de esporos, inibindo em média 60 a 75,6% dos esporos de *A. ochraceus* e *P. roqueforti*. No entanto, essas leveduras em cultivo pareado com fungos filamentosos não foram capazes de inibir o crescimento micelial. (Ramos *et al.*, 2010; Csutak, *et al.*, 2013). Estudos com a levedura *Pichia membranifaciens* mostraram a ação hidrolítica de  $\beta$ -1,3-glicanases secretadas sobre a parede celular do fungo *Botrytis cinerea* que causa a doença do mofo cinzento em videiras (Masih & Paul, 2002). De acordo com os ensaios *in vivo*, a levedura *K. marxianus* CCT 7735 protege os pseudofrutos do morangueiro, prevenindo a colonização pelo fungo patogênico *B. cinerea*. Efeito semelhante não pode ser observado nos frutos da videira. Esses resultados sugerem que a levedura representa potencial agente de biocontrole contra uma das principais doenças pós-colheita em morangos. Outras leveduras não *Saccharomyces* também foram descritas como agentes de controle biológico de fitopatógenos (Vero, *et al.*, 2002; Lutz, *et al.*, 2012; Perez, *et al.*, 2016). Em ensaios *in vivo*, Lutz e colaboradores (Lutz, *et al.*, 2012) observaram que *P. membranifaciens* e *C. victoriae* exibiram características favoráveis à sua utilização como agentes biológicos para proteção de pêras na pós-colheita uma vez que tiveram ação contra *P. expansum* e *B. Cinerea*. A levedura *K. marxianus* CCT 7735 apresenta-se como uma levedura antagonista com ações promissoras de controle biológico na preservação de frutos na pós-colheita. Os resultados apresentados nesse estudo sugerem para estudos posteriores, a ação conjunta de dois importantes mecanismos de biocontrole: competição por nutrientes e secreção de enzimas líticas. Esses mecanismos já foram descritos na literatura e estão presentes em leveduras antagonistas comercializadas, como a *Candida oleophila* (ASPIRE®). O sinergismo de mecanismos de biocontrole potencializa o efeito antagonista de leveduras utilizadas no biocontrole e é um dos critérios utilizados quando selecionadas para comercialização.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Foram identificadas vinte e sete proteínas secretadas por *K. marxianus*, entre elas um grupo de sete proteínas com função hidrolase. As enzimas hidrolases, importantes para o crescimento celular e manutenção da parede celular, são também capazes de causar danos na ultra-estrutura na parede celular de *S. cerevisiae*. *K. marxianus* apresentou atividade antagonista contra a germinação de esporos e inibição do micélio fúngico de *B. cinerea in vitro*. Na tentativa de controle biológico *in vivo*, somente os morangos receberam uma cobertura contra *B. cinerae* sendo necessários ainda outros testes confirmativos em campo. *K. marxianus* parece reunir mais de um mecanismo de controle biológico, utilizando com mais eficiência que o patógeno os recursos nutricionais disponíveis e secretando enzimas líticas capazes de romper a integridade da parede celular de outras leveduras. O presente trabalho abre a perspectiva de novos estudos a respeito dos mecanismos de ação de leveduras antagonistas e sugere experimentos no campo com a levedura *K. marxianus* para demonstrar o efeito real do uso desta levedura no controle biológico de fungos fitopatógenos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABADIAS, M., TEIXIDÓ, N., USALL, J. AND VINÑAS, I. (2003). Optimization of growth conditions of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in a lab-scale fermenter. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 301–309.
- AGUILAR-USCANGA, B., FRANÇOIS, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol*. 37: 268–274.
- BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.(2004). Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics*. 45: 140-148.
- BARA, M.T.F., LIMA, A.L., ULHOA, C.J. (2003). Purification and characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *Fems Microbiology Letters*. 219: 81-85.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; GIESE, E. C. (2010). Bioactive oligosaccharides: production, biological functions and potential commercial applications. Nova Science Publishers. 75:01.
- BAUERMEISTER, A., REZENDE, M. I., GIESE, E. C., DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M. (2010). Fungal  $\beta$ -1,3-glucanases: production and biotechnological applications. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*. 31(2): 75-86.
- BEGUIN, P. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Review of Microbiology*. 44: 219-248.
- BOWER, C. (2007). Postharvest handling, storage, and treatment of fresh market berries. In: ZHAO, Y. *Berry fruit: value-added products for health promotion*. Boca Raton. 262-288.
- DECRETO Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico que dispõe sobre critérios para o reconhecimento de limites máximos de resíduos de agrotóxicos em produtos vegetais in natura. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 123, p. 32, 29 junho 2017. Seção I, parte .*
- BUERTH, C., HEILMANN, C.J., KLIS, F.M., KOSTER, C.G., ERNST, J.F., TILLKER, D. (2011). Growth- dependent secretome of *Candida utilis*. *Microbiology*. 157: 2493-2503.
- CABIB, E., ROH, D. H., SCHMIDT, M., CROTTI, L. B., VARMA, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem*. 276: 19679–19682.

- CAÑAMÁS, T. P., VIÑAS, I., TORRES, R., USALL, J., SOLSONA, C., TEIXIDÓ, N. (2010). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*. 56: 150–158.
- CHAN, Z., TIAN, S. (2005). Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology*. 36: 215-223.
- COLUSSI, P. A., SPECHT, C. A. AND TARON, C. H. (2005). Characterization of a Nucleus-Encoded Chitinase from the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Applied and environmental microbiology*. 71: 2862–2869.
- COMITINI F., DE INGENIIS J., PEPE L., MANNAZZU I., CIANI M.(2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 235–240.
- COMITINI, F., MANNAZZU, J., CIANI, M. (2009). *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific  $\beta$ -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microbial Cell Factories*. 8: 55.
- CSUTAK, O., VASSU, T., SARBU, I., STOICA, I. AND CORNEA, P. (2012). Antagonistic Activity of Three Newly Isolated Yeast Strains from the Surface of Fruits. *Food Technol. Biotechnol.* 51 (1): 70–77.
- DEAN, R., VAN KAN, J.A.L., PRETORIUS, Z.A., HAMMOND-KOSACK, K.E., DI PIETRO, A., SPANU, P.D., RUDD, J.J., 610 DICKMAN, M., KAHMANN, R., ELLIS, J. AND FOSTER, G.D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant 611 pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 414-430.
- DEDO, J. E. D., DUEÑAS, E., ARNAÍZ, Y., DEL REY, F. AND ALDANA, C. R. V. (2009).  $\beta$ -Glucanase Eng2 Is Required for Ascus Wall Endolysis after Sporulation in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*. 8: 1278–1286.
- DROBY, S., CHALUTZ, E., WILSON, C. L., WISNIEWSKI, M. E. (1992). Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica*. 20: S149-S153.
- DUENAS-SANTERO, E., MARTÍN-CUADRADO, A.B., FONTAINE, T., LATGE, J.P., DEL REY, F. AND ALDANA, C.V. (2010). Characterization of Glycoside Hydrolase Family 5 Proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*. 1650–1660.
- ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P., DELEN, N. (2007). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer Netherlands.411-428.
- ENRIQUE, M., IBANEZ, A., MARCOS, J.F., YUSTE, M., MARTÍNEZ, M., VALLES, S. AND P. MANZANARES. (2010).  $\beta$ -Glucanases as a Tool for the Control of Wine Spoilage Yeasts. *Journal of food science*. 75: 1.

- FANG, Y., JAISENG, W., MA, Y., HU, L., YAMAZAKI, S., ZHANG, X., HAYAFUJI, T., SHI, L., KUNO, T. (2014). E3 Ubiquitin Ligase Pub1 Is implicated in Endocytosis of a GPI-Anchored Protein Ecm33 in Fission Yeast. *Plos one*. 9(1): e85238.
- FLEURI, L.F. & SATO, H.H. (2010). Protoplasts production and yeast cell wall lysis using  $\beta$ -1,3 glucanase. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 30(2): 471-476.
- FONSECA, G.G., HEINZLE, E., WITTMANN, C., GOMBERT, A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 339–354.
- GACTO, M., VICENTE-SOLER, J., CANSADO, J. AND VILLA, T.G. (2000). Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. *Journal of Applied Microbiology.* 88: 961-967.
- GENG, P., CHEN, S., HU, M., RIZWAN-UL-HAQ, M., LAI, K., QU, F., ZHANG, Y. (2011). Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. *International Journal of Food Microbiology.* 151: 190-194.
- GOLUBEV, W. I. (2000). Mycocins (killer toxins). In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (Eds.). *The Yeasts- A Taxonomic Study*. Elsevier.
- GOMBERT, A. K. & MADEIRA JR, J. V. & CERDÁN, M. E. & GONZÁLEZ-SISO, M. I. (2016). *Kluyveromyces marxianus* as a host for heterologous protein synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.*
- HATHOUT, Y. (2007). Approaches to the study of the cell secretome. *Heathcare* 4(2): 239-248.
- HENRISSAT, B., CALLEBAUT, I., FABREGA, S., LEHN, P., MORNON, J., DAVIES, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *National Academy of Sciences of the USA.* 92: 7090-7094.
- INOKUMA, K., ISHII, J., HARA, K.Y., MOCHIZUKI, M., HASUNUMA, T., KONDO, A. (2015). Complete genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777, a nonconventional thermotolerant yeast. *Genome Announc.* 3:2.
- JANISIEWICZ, W.J. AND KORSTEN, L. (2002). Biological control of postharvest Diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:411–41.
- KARTHINK, N., AKANKSHA, K., BINOD, P., PANDEY, A. (2014). Production, purification and properties of fungal chitinases – A review. *Indian Journal of Experimental Biology.* 52: 1025-1035.
- KIERS, J., ZEEMAN, A.M., LUTTIK, M., THIELE, C., CASTRILLO, J.I., STEENSMA, H.Y., VAN DIJKEN, J.P., PRONK, J.T. (1998). Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 23359. *Yeast.* 459-469.

KIM JH, LEE SH, KIM CS, LIM EK, CHOI KH, KONG HG, KIM DW, LEE SW, MOON BJ.(2007). Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *J Microbiol Biotechnol.*17(3):438-44.

KOIKE, S. T. & BOLDA, M. (2016). *Botrytis Fruit Rot of Strawberry*. UC Cooperative Extension. California Strawberry Commission. 831: 759-7350.

KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *Fems Yeast Res.* 3(4): 417–432.

LAZNIIEWSKA, J., MACIOSZEK, V.K., LAWRENCE, C.B. AND KONONOWICZ, A.K. (2010). Fight to the death: 713 *Arabidopsis thaliana* defence response to fungal necrotrophic pathogens. *Acta Physiol. Plant.* 32: 1-10.

LENSKI R, RILEY M. (2002). Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc Natl Acad Sci* 99: 556-558.

LIU, J., WISNIEWSKI, M., DROBY, S., NORELLI, J., HERSHKOVITZ, V., TIAN, S., FARRELL, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *Fems Microbiology Ecology.* 80: 578-590.

LIU, J., SUI, Y., WISNIEWSKI, M., DROBY, S., LIU, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology.* 167: 153-160.

LOMBARD V, GOLACONDA RAMULU H, DRULA E, COUTINHO PM, HENRISSAT B (2014). The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490–D495.

LONG, C-A., DENG, B-O., DENG, X-X. (2007). Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34-9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. *Annals of Microbiology.* 57 (2): 203-207.

LOPES, M.R., SOUZA, C.J.A., RODRIGUES, M.Q.R.B., COSTA, D.A., SANTOS, A.F., OLIVEIRA, L.L., RAMOS, H.J.O., GUIMARÃES, V.M., SILVEIRA, W. B., PASSOS, F.M.L., FIETTO, L.G. (2014). Production and Characterization of  $\beta$ -Glucanase secreted by the Yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Biochem Biotechnol.*

LUTZ, M. C., LOPES, C. A., RODRIGUEZ, M. E., SOSA, M. C., SANGORRÍN, M. P. (2012). Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology.* 164:166–172.

MAZAN M, RAGNI E, POPOLO L, FARKAS V. (2011). Catalytic properties of the Gas family (1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. *Biochem. J* 438(2): 275-82.

- MASIH, E.I., PAUL, B. (2002). Secretion of  $\beta$ -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology*. 44: 391-395.
- MCCARTHY, T., HANNIFFY, O., SAVAGE, A.V., TUOHY, M.G. (2003). Catalytic properties and mode of action of three endo- $\beta$ -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble  $\beta$ -1,4- and  $\beta$ -1,3;1,4-linked glucans. *International Journal of Biological Macromolecules*. 141-148.
- MEHLOMAKULU, N., SETATI, M. E., DIVOL, B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeast and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 188: 83-91.
- NAUMOFF, D.G. (2011). Hierarchical Classification of Glycoside Hydrolases. *Biochemistry*. 76 (6): 622-63.
- NEIMAN, A. M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 189: 737–765.
- NIGRO F, SCHENA L, LIGORIO A, PENTIMONE I, IPPOLITO A, SALERNO MG. (2006). Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts. *Postharvest Biology and Technology*. 42 (2): 142–149.
- NONKLANG, S., ABDEL-BANAT, B.M.A., CHA-AIM, K., HOSHIDA, N.M.H., LIMTONG, S., YAMADA, M., AKADA, R. (2008). High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with linear DNA In The Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces Marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol*. 74: 7514–7521.
- ORO L., CIANI M., COMITINI F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol*. 116: 1209–1217.
- PENG, Y., LIU, G.L., YU, X.J., WANG, X.H., JING, L., CHI, Z.M. (2011). Cloning of exo-beta-1,3-glucanase gene from a marine yeast *Williopsis saturnus* and its overexpression in *Yarrowia lipolytica*. *Mar Biotechnol*. 193-204.
- PETERSEN, T. N., BRUNAK, S., HEIJNE, G.V. & NIELSEN, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*. 8: 785-786.
- PHILLISKIRK, G. & YOUNG, T. W. Z. (1975). The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie van Leeuwenhoek*. 41: 147-151.
- POLONELLI, L., CONTI, S., GERLONI, M., MAGLIANI, W., CHEZZI, C. & MORACE, G. (1991). Interfaces of the Yeast Killer Phenomenon. *Critical Reviews in Microbiology*. 18(1):47-87.
- PORRO, D., SAUER, M., BRANDUARDI, P., MATTANOVICH, D. (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Mol biotechnol*. 245-259.

RAIMONDI, S., ZANNI, E., AMARETTI, A., PALLESCHI, C., UCCELLETTI, D., ROSSI, M. (2013). Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*. 12: 34.

RIBÉREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E., SUDRAUD, P. (1980). *Tratado de enología, ciencias y técnicas del vino*. Hemisferio Sur. 671.

RIOU, C., SALMON, J., VALLIER, M., GUNATA, Z., BARRE, P. (1998). Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol*. 64(10): 3607-3614.

ROCHA, S. N., ABRAHAO-NETO, J., GOMBERT, A. K. (2011). Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 100:619–630.

RODIER, M-H., MOUDNI, B. E., KAUMANN-LACROIX, K., DANIAULT, G., JACQUEMIN, J-L. (1999). A *Candida albicans* metallopeptidase degrades constitutive proteins of extracellular matrix. *FEMS Microbiology Letters*. 177: 205-210.

ROSINI, G. (1983). The occurrence of killer characters in yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*. 29(10): 1462-1464.

RUPP, S., PLESKEN, C., RUMSEY, S., DOWLING, M., SCHNABEL, G., WEBER, R. W. S., HAHN, M. (2017). *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-based fungicide resistance. *Appl. Environ. Microbiol*.

SALAZAR, O., BASSO, C., BARBA, P., ORELLANA, C. AND ASENJO, J.A. (2006). Improvement of the Lytic Properties of a  $\beta$ -1,3-Glucanase by Directed Evolution. *Molecular biotechnology*. 33.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., VARGAS, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A., & CHÁFER, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*. 23(8): 2102-2109.

SHARMA, R.R., SINGH, D., SINGH, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*. 50: 205-221.

SOMERS, J. M. AND BEVAN, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genet. Res. Comb*. 13:71-8.

STARMER, W.T., GANTER, P.F., ABERDEEN, V., LACHANCE, M. AND PHAFF, H.J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*. 33: 783±796.

STARK, M. J. R. AND BOYD, A. (1986). The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *The*

embo Journal. 5: 1995 -2002.

STUMM, C.; HERMANS, J.M.; MIDDELBEEK, E.J.; CROES, A.F.; VAN DE VRIES, G.J.M.L. (1977). Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antonie van Leeuwenhoek*. 43:125-128.

SUTIVISEDSEKA, N., LEATHERSA, T.D., BISCHOFFA, K.M., NUNNALLYA, M.S., PETERSONB, S.W. (2013). *Enzyme and Microbial Technology*. 52: 203– 210.

SUZEK, B. E., WANG, Y., HUANG, H., MCGARVEY, P. B., WU, C.H. AND THE UNIPROT CONSORTIUM. (2015). UniRef clusters: a comprehensive and scalable alternative for improving sequence similarity searches. *Bioinformatics*. 31: 926-932.

SWAIM, C.L., ANTON, B.P., SHARMA, S.S., TARON, C.H., BENNER, J.S. (2008). Physical and computational analysis of the yeast *Kluyveromyces lactis* secreted proteome. *Proteomics*. 8: 2714-2723.

THE UNIPROT CONSORTIUM. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase *Nucleic Acids Res*. 45: D158-D169.

THOMAS, B. R., ROMERO, G.O., NEVÍNS, D.J., RODRIGUEZ, R.L. (2000). New perspectives on the endo-beta-glucanases of glycosyl hydrolase Family 17. *International Journal of Biological Macromolecules*. 27: 139-144.

TORRESI, S., FRANGIPANE, M.T., GARZILLO, A.M.V., MASSANTINI, R., CONTINI, M. (2014). Effects of a  $\beta$ -glucanase enzymatic preparation on yeast lysis during aging of traditional sparkling wines. *Food Research International*. 55: 83-92.

ULLIVARRI, M. F., MENDOZA, L. M., RAYA, R.R. (2014). Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106:865–878.

VAN DER WALT, J.P. (1956). *Kluyveromyces* - a new yeast genus of the Endomycetales. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 22(3): 265–272.

VAN KAN, J. A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci*. 11: 247–253.

VÁSQUES-GARCIDUEÑAS, S., LEAL-MORALES, C.A., HERRERA-ESTRELLA, A. (1998). Analysis of the  $\beta$ -1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol agente *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1442-1446.

VENTOM, A.M. AND ASENJO, J.A. (1991). Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. *Enzyme and Microbial Technology*. 13: 71-75.

VERO, S., GARMENDIA, G., ALEZ, M. B. G., BENTANCUR, O. & WISNIEWSKI, M. (2012). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the

management of postharvest diseases of apple (*Malus domestica*). *Fems Yeast Res.* 13:189–199.

WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P. AND VAN KAN, J.A.L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8: 561-580.

WILSON, C.L. AND PUSEY, P.L. (1985). Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Disease.* 69: 375–378.

WISNIEWSKI, M., WILSON, C., DROBY, S., CHALUTZ, E., EL GHAOUTH, A. AND STEVENS, C. (2007). Postharvest Biocontrol: New Concepts and Applications. *Biological Control: a Global Perspective.* 29: 262-273.

U.S. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, BOARD AGRIC. (1987). *Regulating Pesticides in Food – The Delaney Paradox.* Washington D.C. Nat. Acad. Press. 272.

ZAHAVI, T., COHEN, L., WEISS, B., SCHENA, L., DAUS, A., KAPLUNOV, T., ZUTKHI, J., BEN-ARIE, R., DROBY, S. (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 115–124.

ZHANG, J., YUAN, H., WEN, T., XU, F., DI, Y., HUO, K., LI, Y.Y. (2003). Cloning of the KcURA3 gene and development of a transformation system for *Kluyveromyces cicerisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62: 387–391.