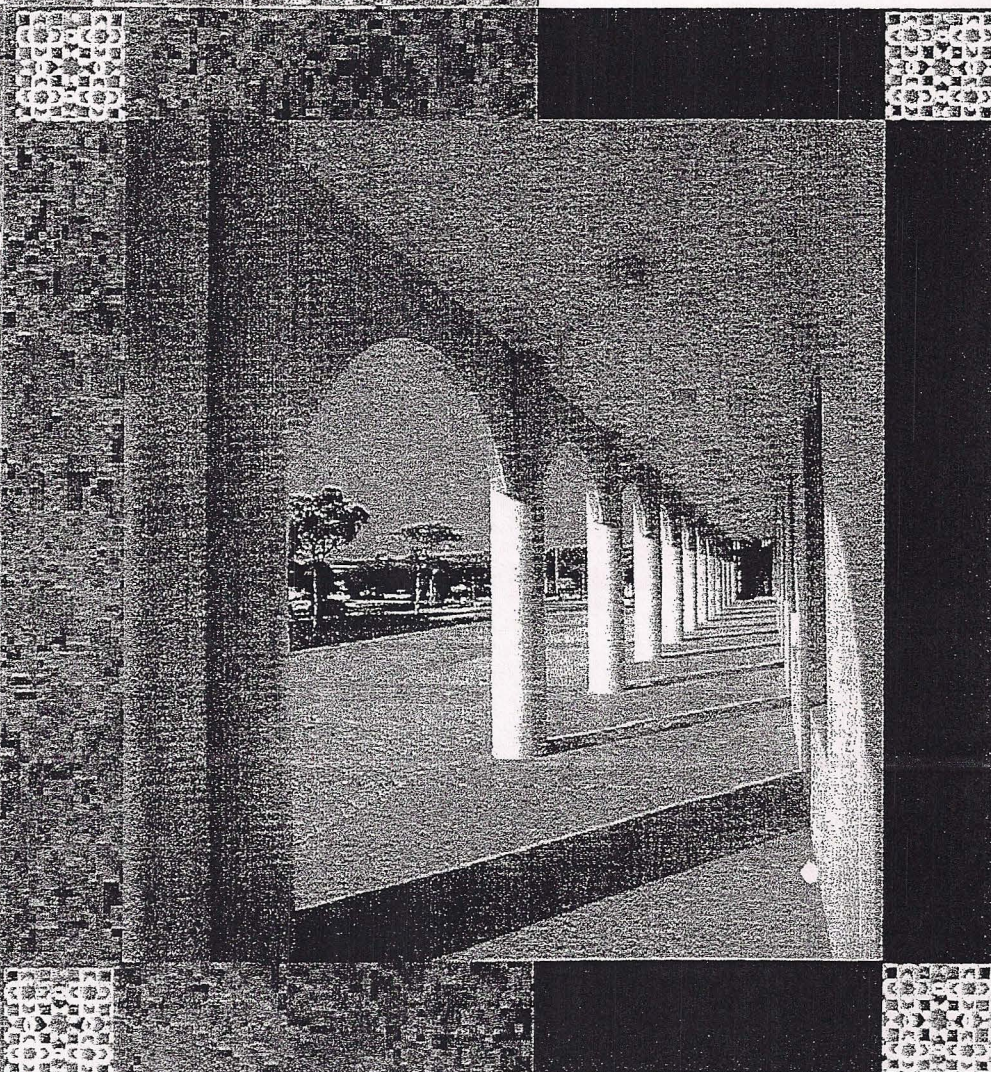


10^{as} JORNADAS DE BIOLOGIA DE LEVEDURAS

"Professor Nicolau van Uden"

23-25 MAIO 2002



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
CAMPUS DE GAMBELAS
FARO



EFEITO DO ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZÓICO NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO MEL

Barbosa, S.I.; Dias, L.; Dias, T.; Estevinho, M.L.

Departamento de Biologia, Escola Superior Agrária de Bragança, 5300 Bragança, Portugal.

De entre as características do mel, destaca-se a sua composição química em que os açúcares possuem um papel dominante. Possui um teor em água de 16 a 18%, contendo também enzimas, hidroximetilfurfural, sais minerais, substâncias azotadas, vitaminas, compostos aromáticos e ácidos. Os ácidos apesar de estarem presentes no mel em pequena proporção (teor máximo 0,5%) têm um efeito pronunciado no sabor e contribuem, para a resistência do mel ao ataque microbiano. Foram identificados no mel pelo menos 18 ácidos diferentes sendo o ácido glucorónico o mais abundante. Em alguns méis o ácido *p*-hidroxibenzóico, o objecto de estudo do presente trabalho também é frequente.

O ácido *p*-hidroxibenzóico pertence ao grupo dos ácidos fenólicos que são originados nas plantas a partir do metabolismo do fenil-propanoide. Este ácido tem um papel semelhante ao das vitaminas em alguns microrganismos (Haslam, 1972).

No presente trabalho estudou-se o efeito do ácido *p*-hidroxibenzóico a diferentes concentrações no crescimento de duas estirpes de leveduras a *Cryptococcus humicolus* ESA 51 isolada do mel e a *Saccharomyces cerevisiae* ESA 1 (levedura de referência). O crescimento efectuou-se em meio de cultura contendo 2% de glucose (quantidade normalmente utilizada em sistemas biológicos) e 10 % de glucose (quantidade existente no mel). Verificou-se que, em ambos os casos, a 25° e pH 4,0, a presença de ácido no meio de cultura, provocou um decréscimo na taxa específica de crescimento e na produção de biomassa. O efeito inibidor acentuou-se à medida que aumentou a concentração do ácido no meio extracelular. Nas nossas condições experimentais, para todos os ensaios efectuados, a taxa específica de crescimento e a produção de biomassa formam uma função exponencial de concentração de ácido. A constante exponencial de inibição pelo ácido foi estimada pelo declive das rectas semi-logarítmicas. O valor obtido para estes parâmetros foi idêntico nas duas leveduras em estudo. Adicionalmente, observamos que a inibição de crescimento foi mais evidente em culturas crescidas em meio com 2% de glucose, evidenciando o efeito protector do açúcar.

Haslam, 1974., The Enkiolate Pathway, Wiley, New York, 1974.

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DO MEL DE TRÁS-OS-MONTES, ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Afonso, F., Pinto, M. Â.; Estevinho L.; Choupina, A.

Departamento de Biologia, Escola Superior Agrária de Bragança, 5300 Bragança, Portugal.

Os métodos tradicionais de identificação de leveduras são normalmente baseados em critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos ⁽¹⁾ originando por vezes, identificações ambíguas ou incorrectas e necessariamente morosas. O nosso objectivo foi confirmar a identificação de leveduras isoladas a partir de mel de Trás-os-Montes feita pelos métodos tradicionais, recorrendo a *Polimerase Chain Reaction* (PCR).

Nesta técnica foram utilizados dois *primers* com os quais se obteve amplificação da região D1/D2 do gene 26S rRNA com tamanho compreendido entre 400 Pb e 600 Pb. As bandas ampliadas foram sequenciadas e após análise das respectivas sequências comprovou-se *on-line* a sua homologia por comparação de sequências depositadas nas bases de dados da *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) estabelecendo a classificação de algumas das leveduras a partir de elevado grau de homologia ⁽²⁾. Adicionalmente estão a ser efectuados alguns ensaios através de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) com o objectivo estabelecer polimorfismos e identificar bandas específicas para construir SCAR. Estes SCAR serão usados para identificar directamente leveduras responsáveis pela alteração e fermentação do mel. As bandas específicas para um determinado *primer* (únicas) numa determinada levedura são clonadas no vector pGEM[®]-T (PROMEGA), com esta construção genética está a ser transformada a *Escherichia coli* após um *Screening* das respectivas colónias, o plasmídeo obtido será sequenciado para desenhar os referidos *primers* (*Sequence Characterized Amplified Region* - SCAR) ⁽³⁾.

1 - Barnett, J. A., Payne R. W. and D Yarrow. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3th Edition, Cambridge University Press, Cambridge.

2 - Pinto, M. M., Afonso, F. M. M., Correia, R. S., Fernandes, M. L. M. and Choupina, A. B. 2001. Identification and phylogeny of honey yeasts from analysis of subunit (26 S) ribossomal DNA. AJ 437347. Library: NCBI (National Center for Biotechnology Information) and EMBL (European Molecular Biology Laboratory).

3 - M. Rosa Hermosa, Isabel Grondona, José María Díaz-Mínguez, Enrique ^a Iturriaga, Enrique Monte. 2001. *Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of Trichoderma atroviride 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens*. Curr Genet 38: 343-350.