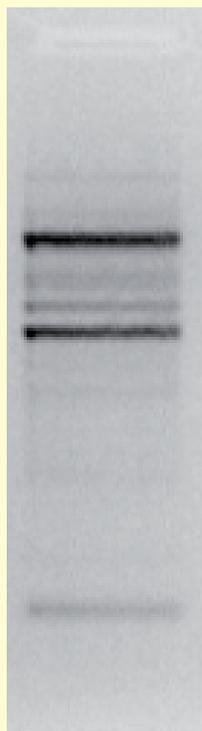
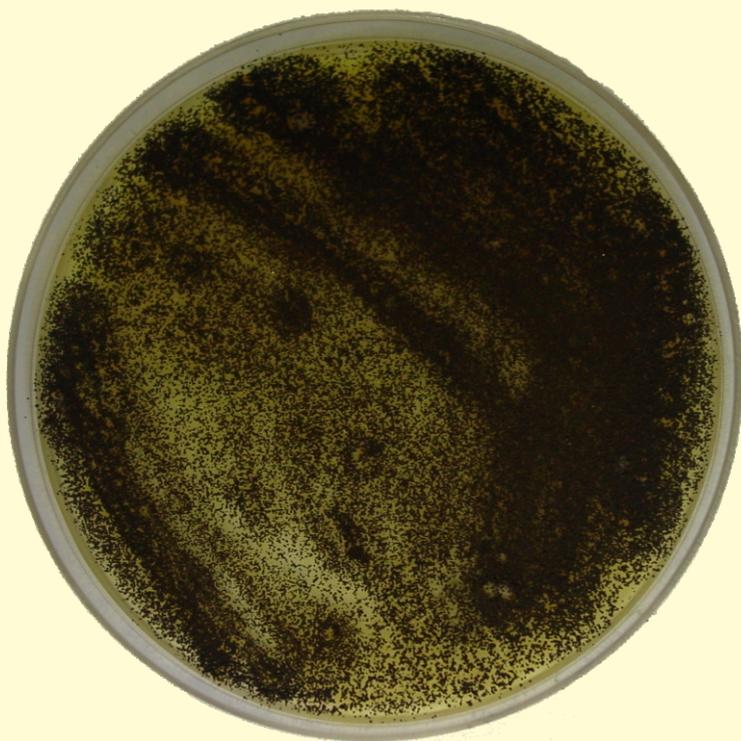


Perfil Genotípico dos Microrganismos da “Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia” – parte I



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos118

Perfil Genotípico dos Microrganismos da “Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia” – parte I

*Janine Passos Lima da Silva
Erika Fraga de Souza
Edna Maria Morais Oliveira
Tatiane Correa de Oliveira
Andressa Moreira de Souza
Ivanilda Santos de Lima
Edmar das Mercês Penha
Leda Maria Fortes Gottschalk
Selma da Costa Terzi*

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Rio de Janeiro, RJ
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba

CEP: 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Telefone: (21) 3622-9600

Fax: (21) 3622-9713

Home Page: www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos

E-mail: www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações e Editoração da Unidade

Presidente: Virgínia Martins da Matta

Membros: Ana Iraidy Santa Brígida, André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela de Grandi Castro Freitas de Sá, Leda Maria Fortes Gottschalk, Nilvanete Reis Lima, Renata Torrezan e Rogério Germani

Supervisão editorial: Virgínia Martins da Matta

Revisão de texto: Regina Celi Araujo Lago

Normalização bibliográfica: Celma Rivanda Machado de Araujo

Editoração eletrônica: Andre Luis do Nascimento Gomes e Marcos Moulin

Fotos: Géis: Erika Fraga de Souza / Perfis: Tatiane Correa de Oliveira

Ilustração da capa: Andre Luis do Nascimento Gomes

1ª edição

1ª impressão (2014): 50 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria de Alimentos**

Perfil genotípico dos microrganismos da “coleção de microrganismos de interesse da indústria de alimentos e agroenergia” – parte I / Janine Passos Lima da Silva... [et al.]. – Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2014.

33 p. ; 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 1516-8247 ; 118).

1. Microrganismo. 2. Fungo. 3. Enzima. I. Silva, Janine Passos Lima da. II. Souza, Erika Fraga de. III. Oliveira, Edna Maria de Moraes. IV. Oliveira, Tatiane Correa de. V. Souza, Andressa Moreira de. VI. Lima, Ivanilda Santos de. VII. Penha, Edmar das Mercês. VIII. Gottschalk, Leda Maria Fortes. IX. Terzi, Selma da Costa. X. Série.

CDD 579 (21. ed.)

© Embrapa 2014

Autores

Janine Passos Lima da Silva

Química, D.Sc. em Ciência dos Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Erika Fraga de Souza

Bióloga, M.Sc. em Produção Vegetal, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Edna Maria Morais Oliveira

Engenheira Química, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Tatiane Correa de Oliveira

Química, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Andressa Moreira de Souza

Química, MSc. Química Ambiental, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Ivanilda Santos de Lima

Graduanda em Ciências Farmacêuticas, bolsista do CNPq-Brasil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Edmar das Mercês Penha

Engenheiro Químico, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Leda Maria Fortes Gottschalk

Engenheira Química, D.Sc. em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Selma da Costa Terzi

Bióloga, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Apresentação

A Embrapa Agroindústria de Alimentos possui uma coleção de microrganismos que inclui linhagens de fungos filamentosos de interesse da indústria de alimentos e agroenergia. Nos últimos 29 anos, algumas linhagens foram isoladas de diversos biomas e testadas quanto à sua habilidade de expressão de metabólitos de interesse agroindustrial, porém algumas já foram melhoradas geneticamente através de técnicas tradicionais de mutação. Os diferentes tipos de coleções de microrganismos, incluindo coleções de trabalho, coleções institucionais e, principalmente, as coleções de serviço, têm uma importância destacada na conservação e exploração da diversidade genética e metabólica.

O presente documento mostra as informações organizadas sobre cada espécie abrigada na Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia (CMIIAA), e a respectiva ilustração do perfil genotípico e do crescimento macroscópico das culturas, sob a forma de um catálogo com fotografias. Essas informações são importantes, pois podem ser usadas como ferramenta de monitoramento da estabilidade genética das linhagens mantidas na CMIIAA.

Desse modo, associando as informações morfológicas e do perfil genético com a descrição técnica das linhagens, espera-se tornar a consulta à coleção mais atraente para o público interessado em utilizar esses cultivos em suas atividades laborais.

Portanto, essa obra passa a ser uma referência para outras coleções que poderão disponibilizar informações de forma mais didática aos interessados em obter amostras de microrganismos para futuras aplicações em pesquisa e desenvolvimento agroindustrial.

Lourdes Maria Corrêa Cabral

Chefe Geral da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Sumário

Introdução	9
Consulta ao AleloMicro	10
Crescimento do fungo para análise molecular	11
Caracterização molecular de fungos filamentosos de interesse na agroindústria de alimentos	12
Fotos do gel do perfil genotípico associado ao crescimento macroscópico das culturas dos microrganismos da CMIAA	12
Referências	32

Perfil Genotípico dos Microrganismos da “Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia” – parte I

*Janine Passos Lima da Silva
Erika Fraga de Souza
Edna Maria Moraes Oliveira
Tatiane Correa de Oliveira
Andressa Moreira de Souza
Ivanilda Santos de Lima
Edmar das Mercês Penha
Leda Maria Fortes Gottschalk
Selma da Costa Terzi*

Introdução

A Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia (CMIIAA) está localizada na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

A CMIIAA tem laboratório próprio e o apoio de outros três laboratórios da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Micologia, Diagnóstico Molecular e Processos Fermentativos) que auxiliam na identificação e caracterização dos fungos filamentosos e produção de metabólitos para aplicação na indústria de alimentos ou agroenergia.

O laboratório da CMIIAA utiliza dois métodos de preservação das subamostras depositadas e, assim, conta com um Ultrafreezer MDF-U73V da marca SANYO para preservação das linhagens, em solo (MARTIN, 1964), por ultracongelamento a -80°C e um refrigerador para preservação das linhagens pelo método de Castellani que consiste na preservação dos microrganismos em água estéril a 4°C . Além disso, como uma espécie de “back-up”, há uma cópia de segurança de todos os microrganismos no Laboratório de Processos Fermentativos preservados em solo a -20°C , procedimento realizado desde meados da década de 1980.

A Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia é responsável pela manutenção de linhagens utilizadas na produção de diversas enzimas de interesse comercial, entre elas, celulases, xilanases, pectinases, amilases, lipases, proteases, fitases, feruloil esterase tanto por fermentação em estado sólido quanto por fermentação submersa. Cada microrganismo preservado na CMIIAA, quando reativado para uso em fermentação ou para verificação de sua viabilidade, é cultivado em meio gelose básico (COURI; FARIAS, 1995) contendo o substrato específico para produção do metabólito de interesse, como por exemplo, óleo de oliva para produção de lipase, avicel para produção de celulase, pectina para pectinase.

Para enriquecer o acervo e receber depósito de microrganismos de outras unidades da Embrapa foi necessário que a coleção se tornasse Fiel Depositária do Patrimônio Genético junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) em acordo com a Deliberação 055/12/SECEX/CGEN, Processo 02000.001123/2011-54.

Atualmente o acervo conta com 230 microrganismos entre os originais da coleção e os depósitos de subamostras de outras unidades da Embrapa.

Neste volume são apresentadas as fotografias de 38 microrganismos da CMIIAA. As informações referentes a cada microrganismo da CMIIAA, contidas neste volume também podem ser consultadas na base de dados da Embrapa, AleloMicro, no sítio <http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/>.

Consulta ao AleloMicro

A organização das informações sobre as linhagens mantidas nas Coleções Microbianas em um Banco de Dados é parte essencial da Gestão dos acervos. O sistema informatizado das Coleções Microbianas da Embrapa conta com um banco de dados centralizado constituído de dois módulos interligados, o Alelo Micro Base de Dados e o Alelo Micro Web. A Base de Dados é de uso restrito, com acesso controlado para curadores e parte das informações é disponibilizada para acesso externo, via Internet.

A Base de Dados contempla informações mínimas requeridas internacionalmente sobre determinada linhagem e sua incorporação nas diferentes Coleções [Passaporte], tais como dados de coleta, isolamento e purificação; a identificação taxonômica; a inserção do acesso na coleção; a catalogação das amostras do acesso na Coleção (armazenamento), entre outras. O usuário externo pode consultar via o Alelo Micro Web algumas

informações básicas sobre as linhagens mantidas nas Coleções. As consultas podem ser feitas por navegação ou diretamente por ferramenta de busca pelo nome científico do organismo, pelo código da linhagem ou combinando parâmetros no sítio <http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/>.

Crescimento de fungos para extração de DNA e análise molecular

Para caracterização molecular e obtenção do perfil genotípico dos microrganismos, os fungos foram crescidos por meio de fermentação submersa, durante 5 dias em shaker Nova Ética a 80 rpm e 32°C.

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 250 mL esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 10 minutos, contendo 50 mL de meio com a seguinte composição:

- Sacarose 20 g/L
- Sulfato de amônio 3,5 g/L
- Fosfato monobásico de potássio 1 g/L
- Sulfato de magnésio 0,5 g/L
- Cloreto de potássio 0,1 g/L
- Sulfato de zinco 5 mg/L
- Sulfato de ferro 23 mg/L
- Sulfato de cobre 6 mg/L
- Sulfato de manganês 20 µg/L

Após esterilização, os meios foram inoculados a partir de uma alçada da cultura mantida em tubo com solo.

Ao final da fermentação, o fungo foi separado por filtração. A biomassa obtida foi lavada com água destilada para retirada dos sais presentes no meio e enviada para análise molecular em tubos Falcon estéreis.

Caracterização molecular de fungos filamentosos de interesse na agroindústria de alimentos

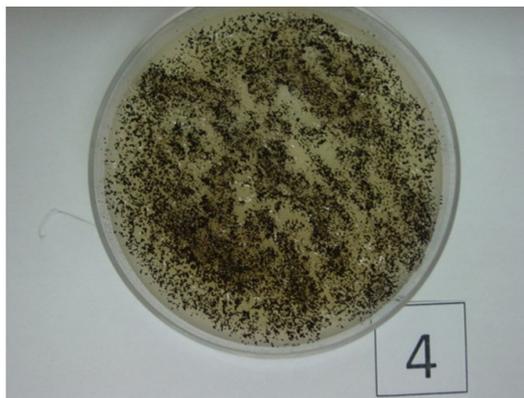
A biomassa das linhagens mantidas na CMIIAA foram tratadas para o isolamento do DNA total usando o protocolo CTAB e os kits comerciais Dneasy (Qiagen) e NucleoSpin (Macherey-Nadel). Após o isolamento, o DNA (30 ng) foi usado como “molde” para a condução das reações de RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* com o oligonucleotídeo iniciador randômico OPW2 (Operon) no termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Em seguida, o perfil de bandas foi revelado após aplicação em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio e condução de corrida eletroforética (100mV; 100mA; 2horas), com posterior fotodocumentação (Vilbert-Biosystems) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A técnica RAPD-PCR vem sendo usada para a caracterização molecular e análise da variabilidade genética em plantas e microrganismos (AGARWAL et al., 2008; DIJKSHOORN, et al., 2001; GIMÉNEZ et al., 2009; GOSTIMSKY et al., 2005; SEWARD et al., 1997; WONG, H. et al., 1997).

As fotos revelam o perfil genotípico de cada linhagem analisada. Essas informações são usadas como ferramenta de monitoramento da estabilidade genética das linhagens mantidas na coleção.

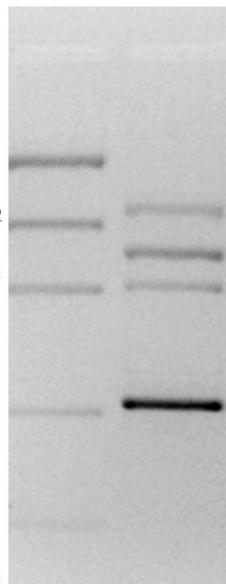
Fotos do gel do perfil genotípico associado ao crescimento macroscópico das culturas dos microrganismos da CMIIAA

Para facilitar o reconhecimento das principais culturas mantidas na CMIIAA foi organizado um álbum com fotografias que mostram a aparência macroscópica dos cultivos crescidos em placa de Petri associada ao seu perfil genotípico.

As fotos foram realizadas após reativação dos fungos filamentosos preservados pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1963, 1967), por cultivo em meio ágar batata dextrose (BDA) e incubação por 5 dias.



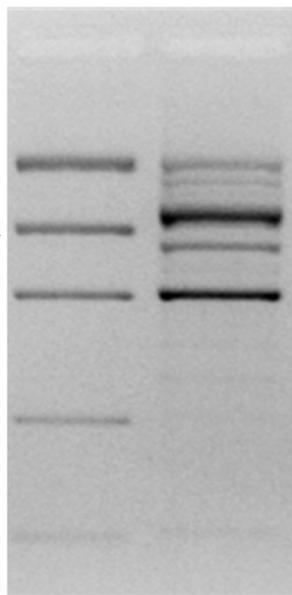
2000 pb
1.200 pb
800 pb
400 pb
200 pb
100 pb



BRM 028491 - *Aspergillus niger*



2000 pb
1.200 pb
800 pb
400 pb
200 pb
100 pb



BRM 028492 - *Aspergillus niger*



2000 pb

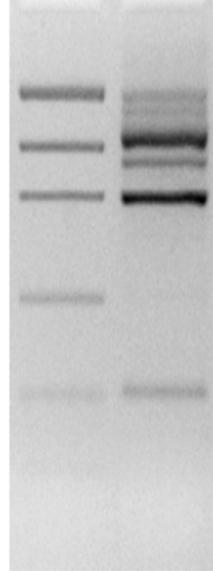
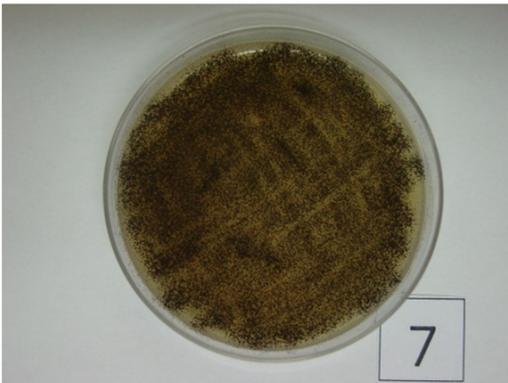
1.200 pb

800 pb

400 pb

200 pb

100 pb

**BRM 028493 - *Aspergillus niger***

2000 pb

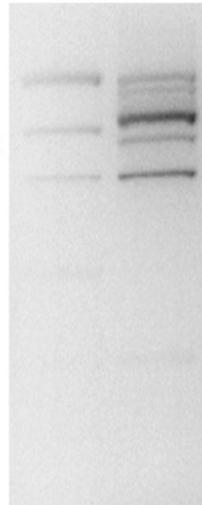
1.200 pb

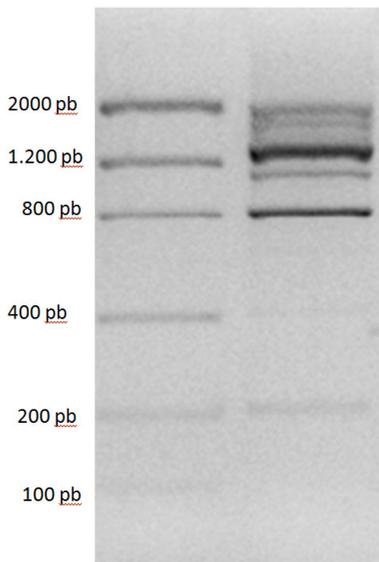
800 pb

400 pb

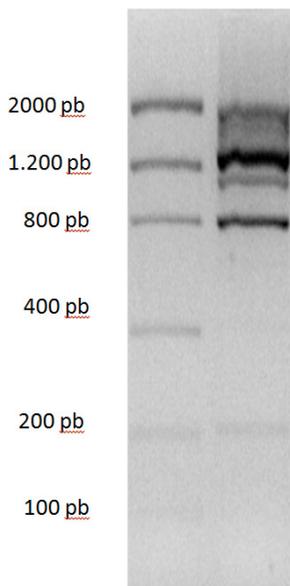
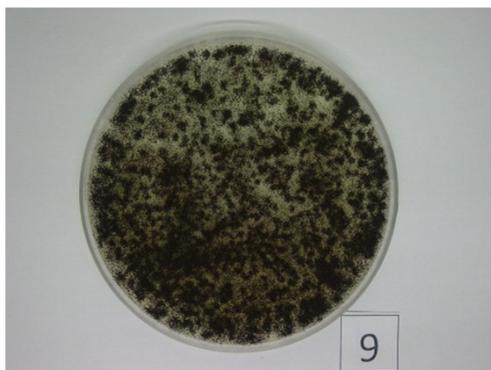
200 pb

100 pb

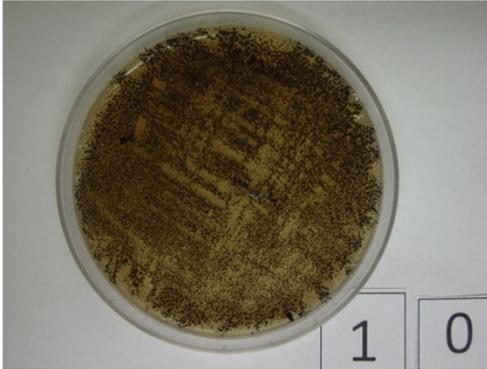
**BRM 028494 - *Aspergillus niger***



BRM 028495 - *Aspergillus sp*



BRM 028496 - *Aspergillus niger*



2000 pb

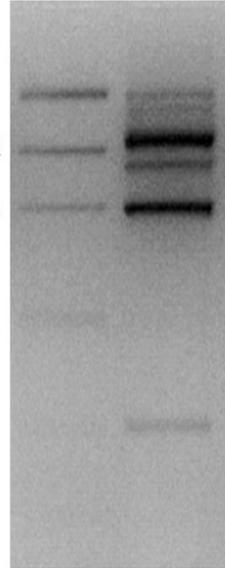
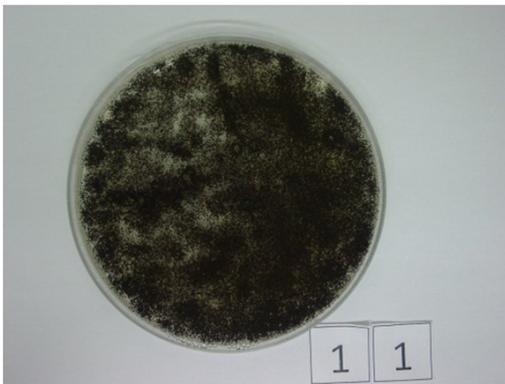
1.200 pb

800 pb

400 pb

200 pb

100 pb

**BRM 028497 - *Aspergillus niger***

2000 pb

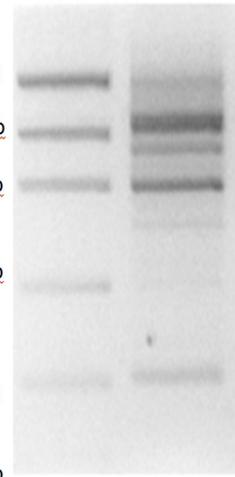
1.200 pb

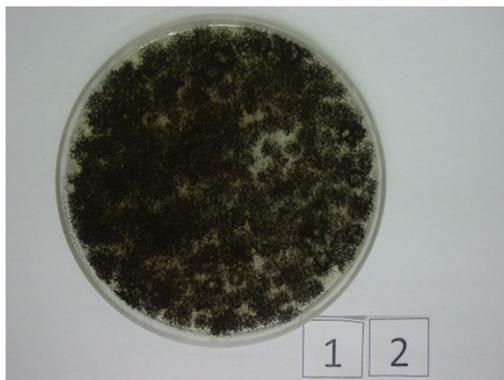
800 pb

400 pb

200 pb

100 pb

**BRM 028498 - *Aspergillus niger***



2000 pb

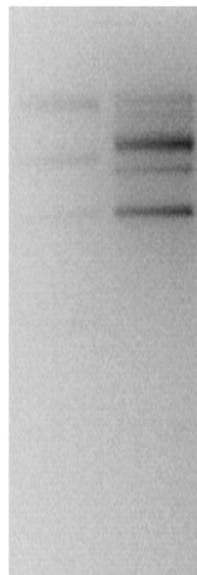
1.200 pb

800 pb

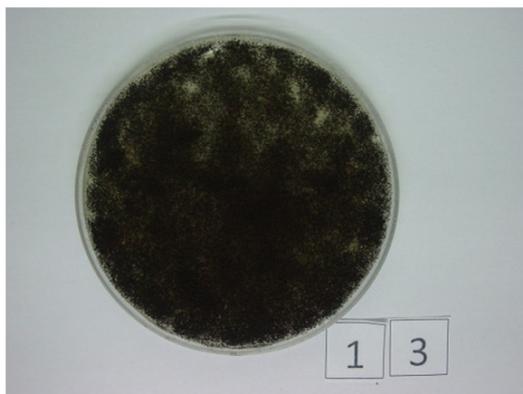
400 pb

200 pb

100 pb



BRM 028499 - *Aspergillus niger*



2000 pb

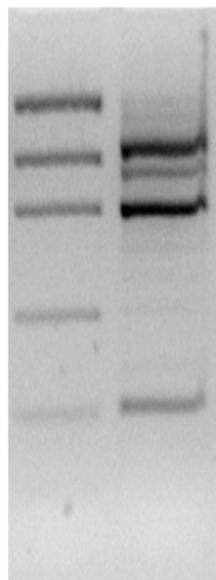
1.200 pb

800 pb

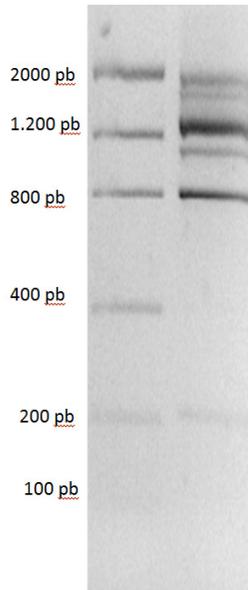
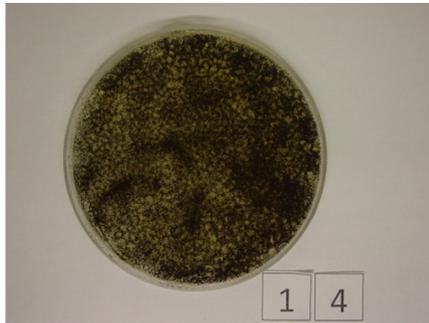
400 pb

200 pb

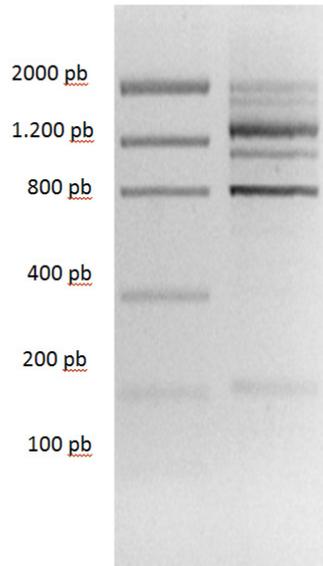
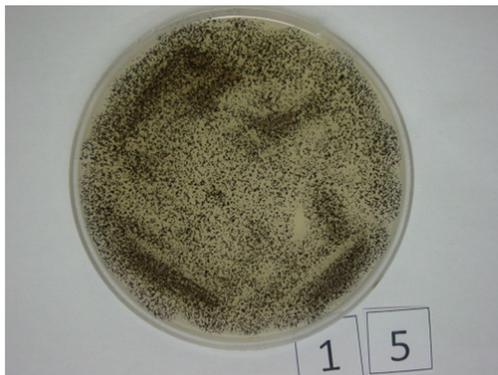
100 pb



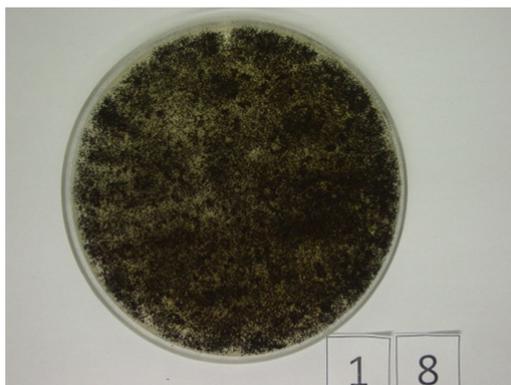
BRM 028500 - *Aspergillus niger*



BRM 028501 - *Aspergillus niger*



BRM 028502 - *Aspergillus niger*



2000 pb

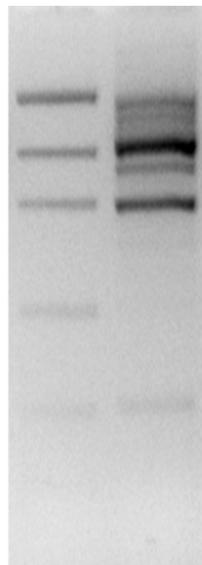
1.200 pb

800 pb

400 pb

200 pb

100 pb



BRM 028647 - *Aspergillus niger*



2000 pb

1.200 pb

800 pb

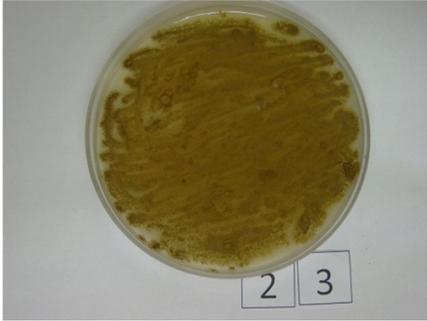
400 pb

200 pb

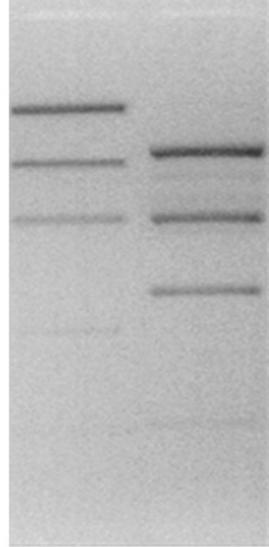
100 pb



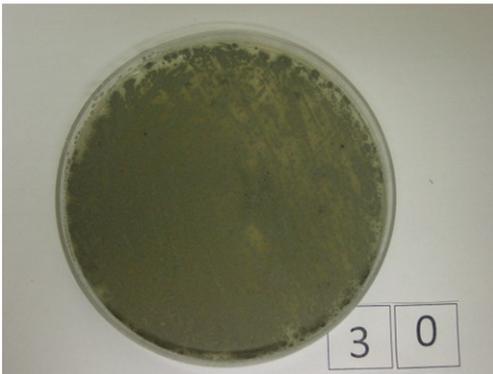
BRM 028650 - *Aspergillus niger*



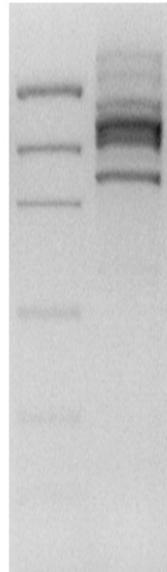
2000 pb
1.200 pb
800 pb
400 pb
200 pb
100 pb



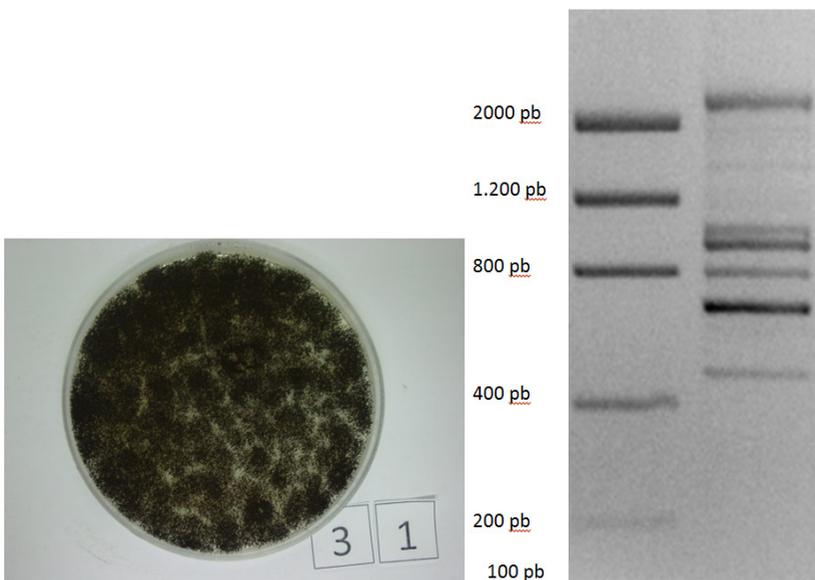
BRM 028653 - *Aspergillus niger*



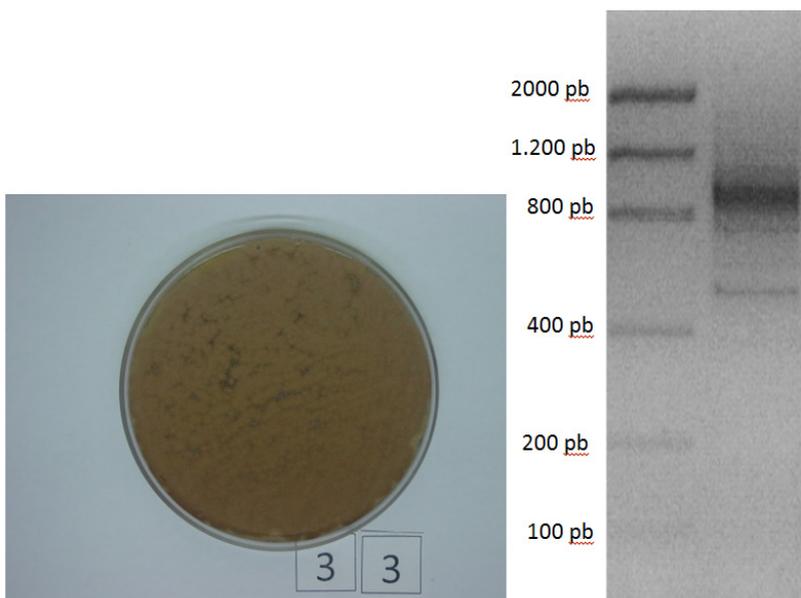
2000 pb
1.200 pb
800 pb
400 pb
200 pb
100 pb



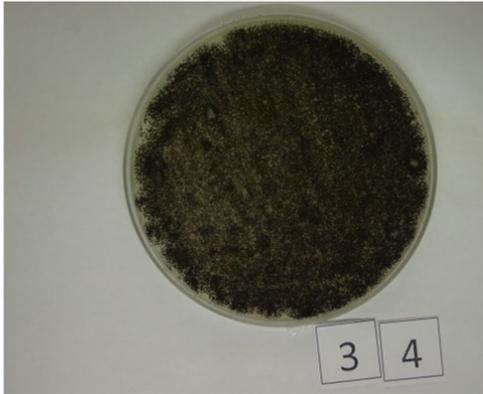
BRM 028882 - *Thermomyces lanuginosus*



BRM 028883 - *Aspergillus niger*



BRM 028885 - *Aspergillus sp.*



2000 pb

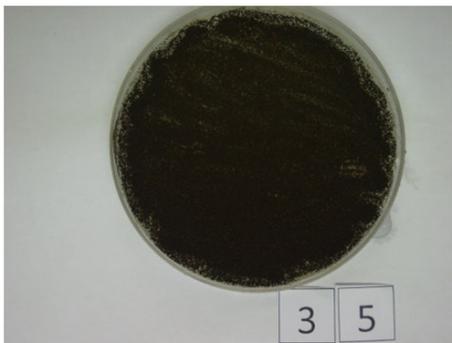
1.200 pb

800 pb

400 pb

200 pb

100 pb

**BRM 028886 - *Aspergillus niger***

2000 pb

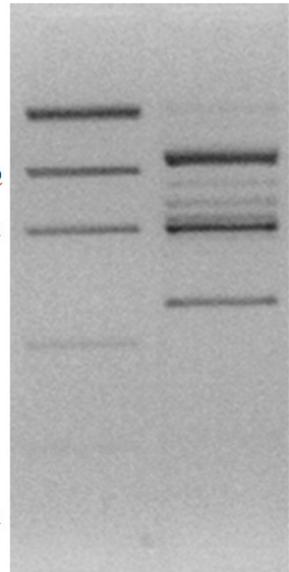
1.200 pb

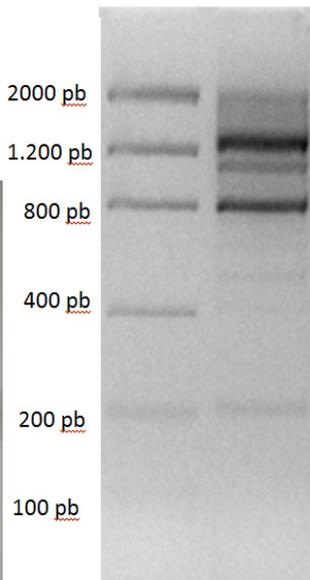
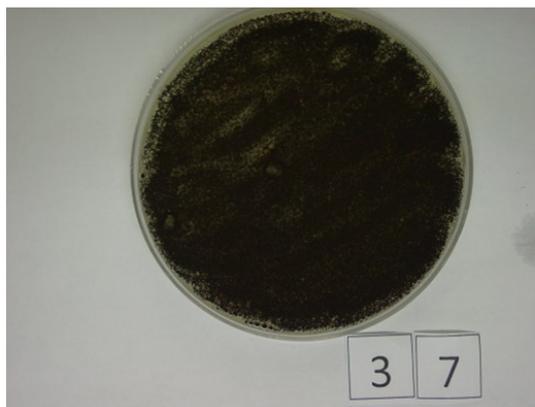
800 pb

400 pb

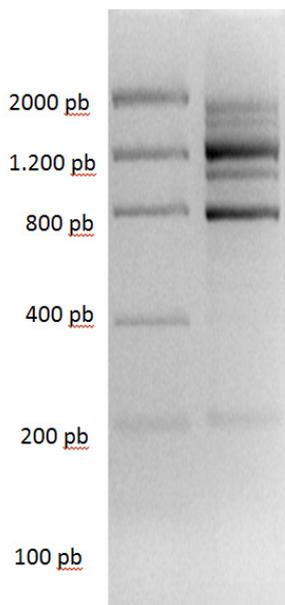
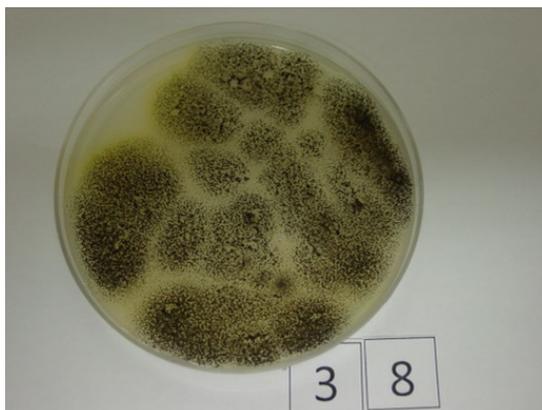
200 pb

100 pb

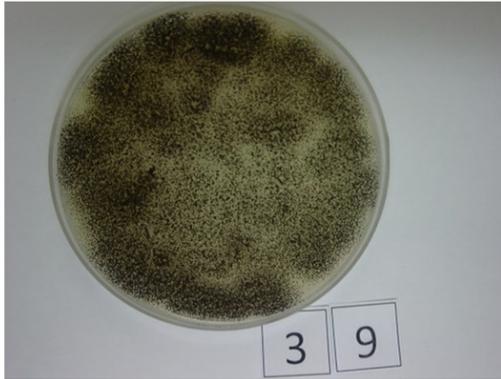
**BRM 028887 - *Aspergillus niger***



BRM 028889 - *Aspergillus niger*



BRM 028890 - *Aspergillus niger*



2000 pb

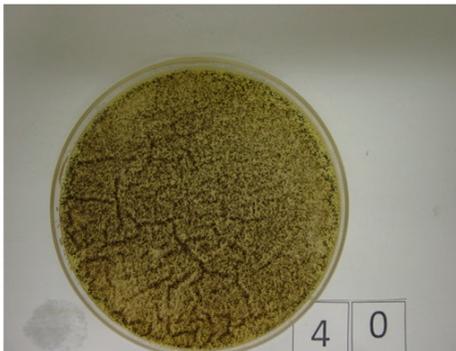
1.200 pb

800 pb

400 pb

200 pb

100 pb

**BRM 028891 - *Aspergillus niger***

2000 pb

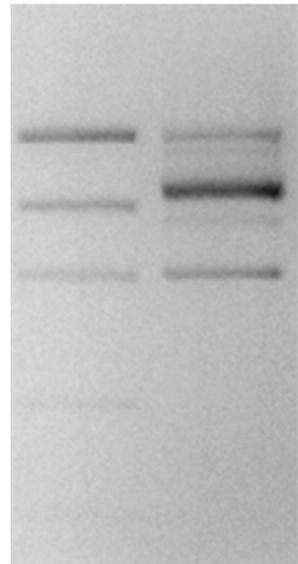
1.200 pb

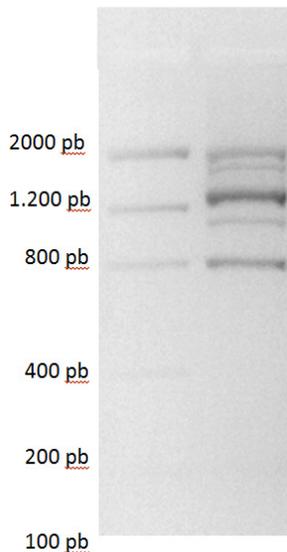
800 pb

400 pb

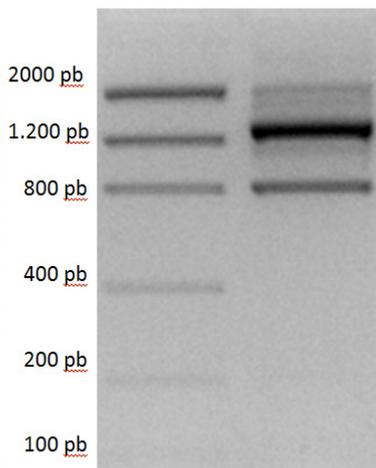
200 pb

100 pb

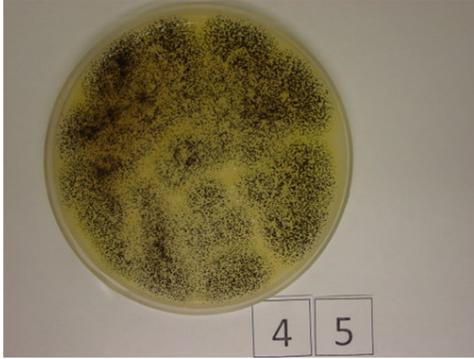
**BRM 028892 - *Aspergillus niger***



BRM 028965 - *Aspergillus brasiliensis*



BRM 028967 - *Aspergillus sp.*



2000 pb

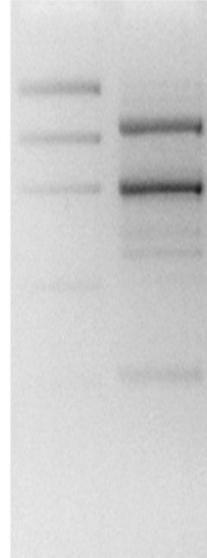
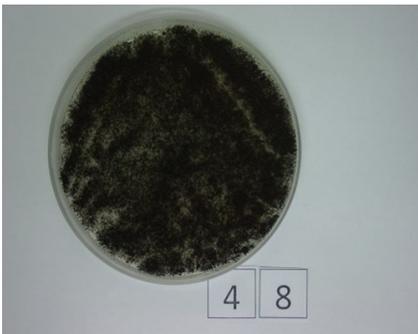
1.200 pb

800 pb

400 pb

200 pb

100 pb

**BRM 028968** - *Aspergillus* sp.

2000 pb

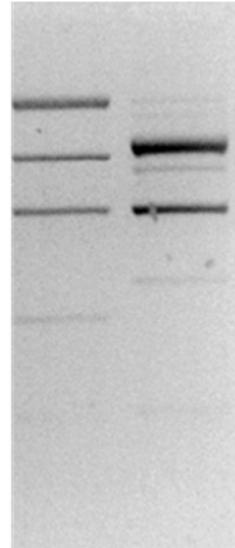
1.200 pb

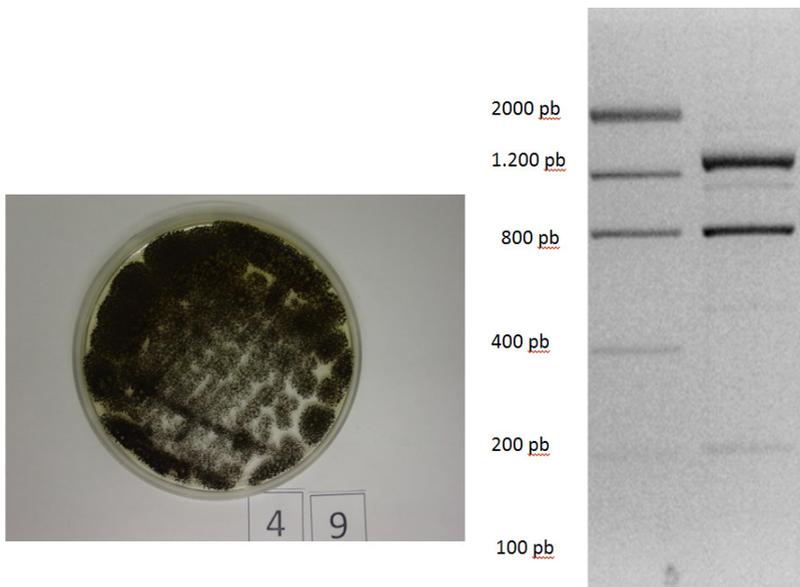
800 pb

400 pb

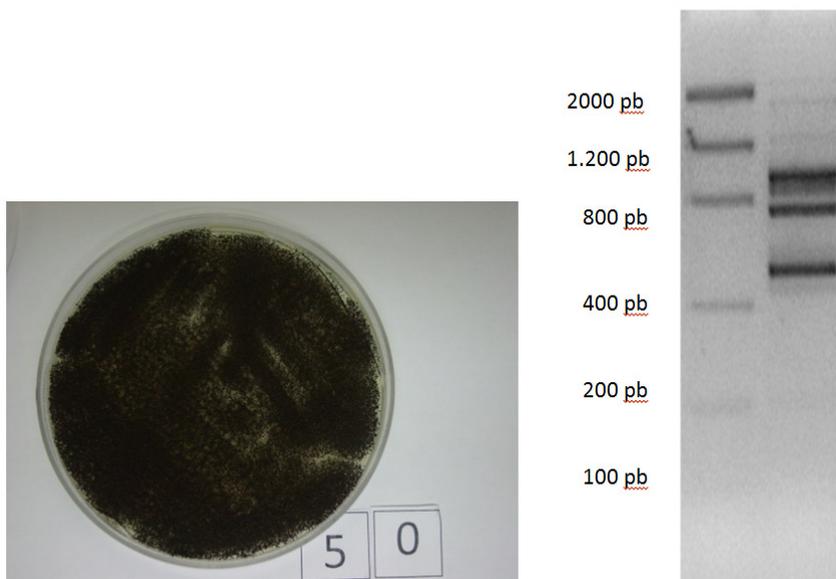
200 pb

100 pb

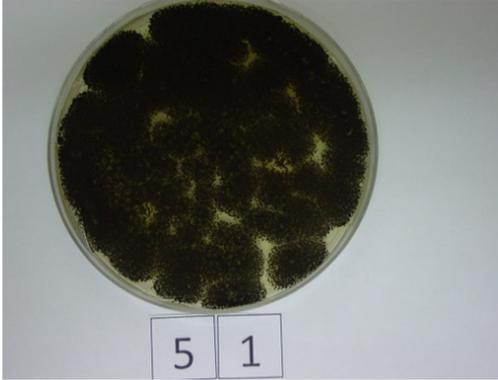
**BRM 028971** - *Aspergillus* sp.



BRM 028972 - *Aspergillus niger*



BRM 028973 - *Aspergillus niger*



2000 pb

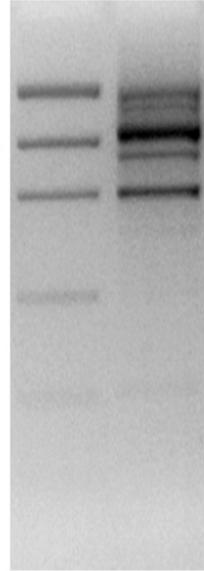
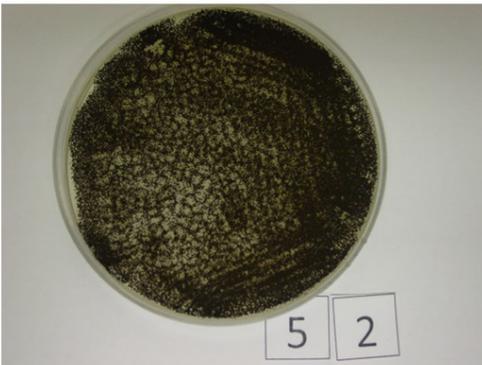
1.200 pb

800 pb

400 pb

200 pb

100 pb

**BRM 028974 - *Aspergillus niger***

2000 pb

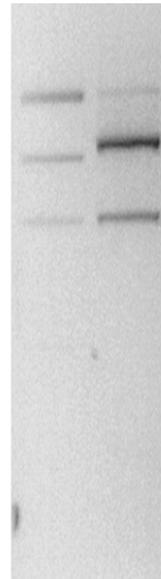
1.200 pb

800 pb

400 pb

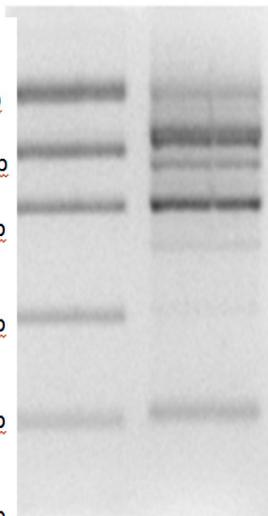
200 pb

100 pb

**BRM 028975 - *Aspergillus niger***



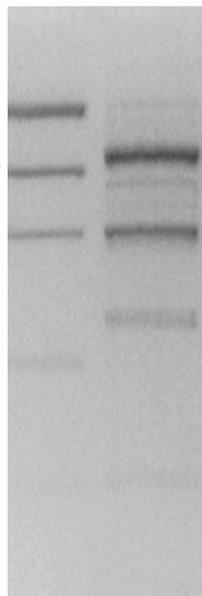
2000 pb
1.200 pb
800 pb
400 pb
200 pb
100 pb



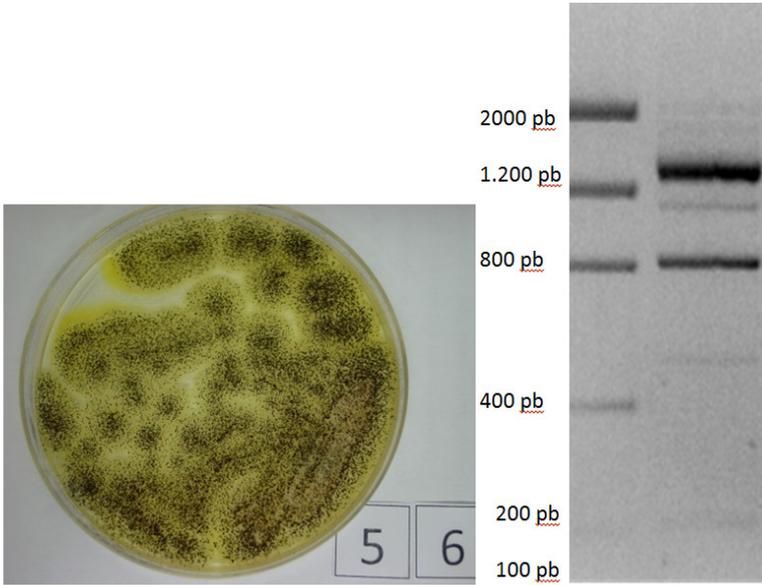
BRM 028977 - *Aspergillus niger*



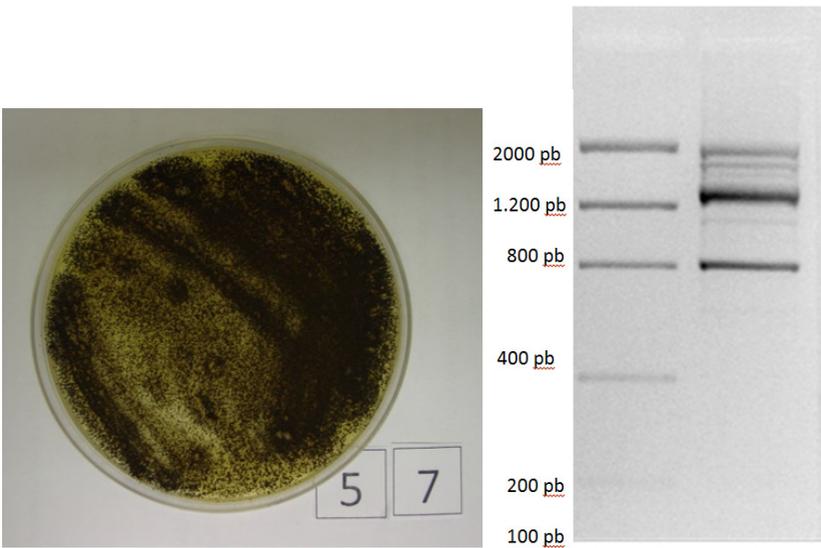
2000 pb
1.200 pb
800 pb
400 pb
200 pb
100 pb



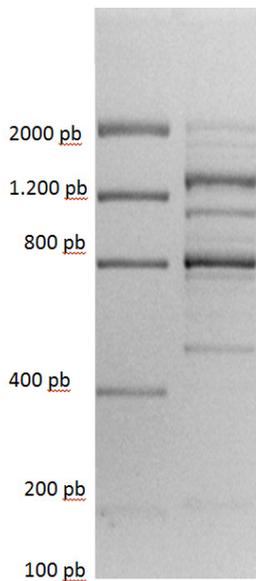
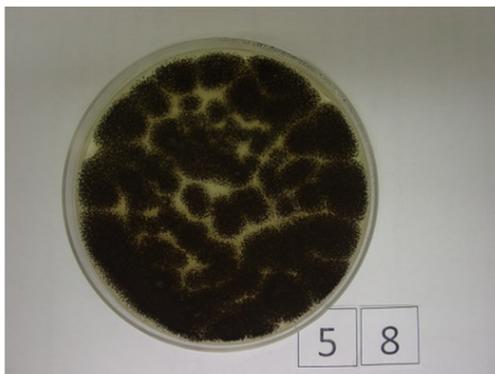
BRM 028978 - *Aspergillus niger*



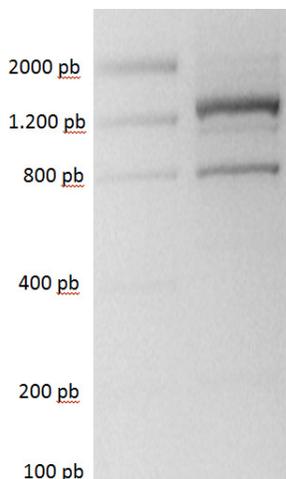
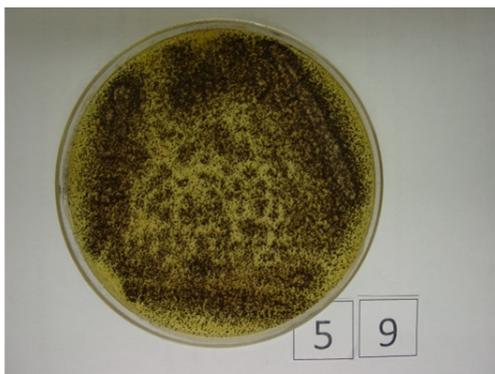
BRM 029090 - *Aspergillus niger*



BRM 029091 - *Aspergillus niger*



BRM 029092 - *Aspergillus niger*



BRM 029093 - *Aspergillus niger*

Referências

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Rep.**, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **J. trop Med. Hyg.**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CASTELLANI, A. The “water cultivation” of pathogenic fungi. **J. trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 283-284, 1963.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectnolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v. 26, n. 4, p.314-317, out./dez. 1995.

DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. J.; STRUELENS, M. **New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data**. Amsterdam: Elsevier, 2001.xi, 357 p.

GIMÉNEZ, M. J.; PISTÓN, F.; MARTÍN A.; ATIENZA, S. G. Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 638-646, 2009.

GOSTIMSKY, S. A.; KOKAEVA, Z. G.; KONOVALOV, F. A. Studying plant genome variation using molecular markers. **Russian Journal of Genetics**, v. 41, n. 4, p. 378-388, 2005.

MARTIN, S. M. Conservation of microorganism. **Annual Review of Microbiology**. v. 18, p. 1-16, 1964.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**, 3rd. ed. NY: editor Nolan, C., Cold Spring Harbor Lab. Press. Plainview, 1989. vol. 1, chapter 5 (5.4 and 5.14).

SEWARD, R. J.; EHRENSTEIN, B.; GRUNDMANN, H. J.; TOWNER, K. J. Direct comparison of two commercially available computer programs for analyzing DNA fingerprint gels. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 314-320, 1997.

WONG, H.; YEOH, H.; LIM, S.; LOOI, K. L. Design of primers for RAPD analyses of cassava, *Manihot esculenta*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 805-810, 1997.



Agroindústria de Alimentos

CGPE 11669



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

