

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PURIFICAÇÃO DA TOXINA *KILLER* DE *Aureobasidium pullulans*
VISANDO O BIOCONTROLE DE *Penicillium digitatum* E
Geotrichum citri-aurantii

Flávia Lino Pollettini

Farmacêutica

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

PURIFICAÇÃO DA TOXINA *KILLER* DE *Aureobasidium pullulans*
VISANDO O BIOCONTROLE DE *Penicillium digitatum* E
Geotrichum citri-aurantii

Flávia Lino Pollettini

Orientadora: Profa. Dra. Katia Cristina Kupper

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Ventura Mazzi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2019

P773p

Pollettini, Flávia Lino

Purificação de toxina killer de *Aureobasidium pullulans* visando o biocontrole de *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii* / Flávia Lino Pollettini. -- Jaboticabal, 2019

43 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Katia Cristina Kupper

Coorientadora: Maurício Ventura Mazzi

1. Enzimas hidrolíticas. 2. Ubiquitina-like. 3. Bolor verde. 4. Podridão azeda. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

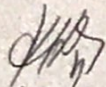
Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

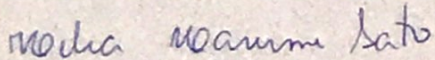
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PURIFICAÇÃO DA TOXINA KILLER DE *Aureobasidium pullulans* VISANDO O BIOCONTROLE DE *Penicillium digitatum* E *Geotrichum citri-aurantii*

AUTORA: FLÁVIA LINO POLLETTINI
ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER
COORDENADOR: MAURÍCIO VENTURA MAZZI

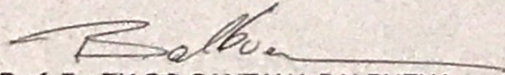
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER
Centro de Citricultura / IAC / Instituto Agronômico de Campinas - Cordeirópolis/SP



Profa. Dra. HELIA HARUMI SATO
Departamento de Ciências de Alimentos-UNICAMP / Campinas/SP



Prof. Dr. TIAGO SANTANA BALBUENA
Departamento de Tecnologia / Unesp/ Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FLÁVIA LINO POLLETTINI – Nascida em 30 de agosto de 1991 em Mogi Mirim, SP. Iniciou sua graduação em Farmácia em Fevereiro de 2011 na Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS, na cidade de Araras, SP, concluindo seu bacharelado em dezembro de 2015. Durante a graduação, estagiou no Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Fundação Hermínio Ometto, Araras, SP, foi bolsista de iniciação científica do CNPq-PIBIC no período de julho de 2013 a julho de 2015, atuando na área de Isolamento e Caracterização Funcional de Proteínas, sob a orientação do Prof. Dr. Maurício Ventura Mazzi. Em março de 2016 ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, Brasil, na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profa. Dra. Katia Cristina Kupper, como bolsista Capes, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP.

Dedico

Aos meus pais **Maria Cristina Lino Pollettini e Paulo Eduardo Pollettini**
por todo o apoio e suporte.

Ofereço

À minha família, pelos momentos de união que foram, e
ainda são, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **DEUS**, pela sua presença constante em minha vida.

A minha mãe **Cristina**, a minha irmã **Lívia** e ao meu pai **Paulo**, que nunca mediram esforços para que meus sonhos fossem alcançados. Vocês fazem parte de cada conquista, sem vocês nada disso teria valor.

Aos meus familiares, principalmente a minha tia **Geni** por fazerem toda a diferença em minha vida. A meu marido **Thiago** pelo carinho, apoio e por estar sempre ao meu lado. E agora também a minha filha **Luiza**, por ter trazido luz e renovação para a minha vida.

Ao **Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, Brasil** e ao coordenador do curso **Roberto Alves de Oliveira**.

A minha Orientadora **Katia Cristina Kupper** por dividir comigo seu conhecimento, por todo o incentivo, dedicação, por acreditar no meu potencial, por todo carinho compartilhado e por me ensinar a ser mais independente nas minhas escolhas.

Ao meu co-orientador **Maurício Ventura Mazzi**, pela paciência, incentivo, pelo tempo e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos meus amigos de Laboratório, **Luriany, Andreia, Aline, Vanessa, Bianca, Tatiane, Mariana, Wesley, Lorena, Lilian e Deborah** por toda ajuda concedida para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, apoio e afeto que nunca me deixaram faltar e a todos que direta e indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, meu obrigada!

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira e a Fundação Hermínio Ometto por disponibilizar o laboratório para que eu pudesse realizar meus experimentos. Aos demais funcionários do Centro de Citricultura, em especial a **Maria, Lourdes, Isabel, Nadji, Vivian, Nidelce e Valéria**, pelo carinho, simpatia e gentileza.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2014/25067-3.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Citricultura	3
2.2. Bolor verde	4
2.3. Podridão azeda	4
2.4. Controle biológico	5
2.5. Atividade <i>killer</i>	7
2.6. <i>Aureobasidium pullulans</i>	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Microrganismos	11
3.2. Detecção de atividade <i>killer</i> da levedura.....	11
3.3. Obtenção de proteínas extracelulares de <i>A. pullulans</i> ACBL-77 por precipitação com etanol, sulfato de amônio e acetona.....	12
3.3.1. Precipitação de proteína com etanol.....	12
3.3.2. Precipitação de proteína com acetona.....	12
3.3.3. Precipitação de proteína com sulfato de amônio.....	13
3.3.4. Dosagem de proteínas	13
3.4. Determinação de atividade de protease, β -1,3-glucanase e quitinase.....	13
3.4.1. Atividade Proteolítica.....	13
3.4.2. Atividade de β -1,3-glucanase.....	14
3.4.3. Atividade de Quitinase.....	14
3.5. Purificação da toxina <i>killer</i> produzida por <i>A. pullulans</i>	15
3.5.1. Purificação da toxina <i>killer</i> de <i>A. pullulans</i> ACBL-77 por cromatografia em coluna de Sephadex G-75.....	15
3.5.2. Purificação da toxina <i>killer</i> (Fração F3) de <i>A. pullulans</i> ACBL-77 em coluna de Cellulose.....	15
3.6. Sequenciamento dos aminoácidos da proteína por espectrometria de massas.....	16

3.6.1. Digestão In-gel de proteínas.....	16
3.6.2. LC-MS ^E	17
3.6.3. Análise dos dados.....	18
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Detecção de atividade <i>killer</i> da levedura.....	18
4.2. Obtenção de proteínas extracelulares de <i>A. pullulans</i> ACBL-77 por precipitação com etanol, sulfato de amônio e acetona	19
4.3. Estudo da produção de protease, β -1,3-glucanase e quitinase pela linhagem <i>A. pullulans</i> ACBL-77.....	19
4.4. Purificação da toxina <i>killer</i> produzida por <i>A. pullulans</i>	20
4.5. Sequenciamento dos aminoácidos da proteína por espectrometria de massas.....	23
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

Purificação da toxina *killer* de *Aureobasidium pullulans* visando o biocontrole de *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii*

RESUMO - O setor citrícola enfrenta vários problemas com doenças que ocorrem na pós-colheita, como o bolor verde e a podridão azeda, causados por *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii*, respectivamente. O surgimento de linhagens resistentes de *P. digitatum* e a falta de produtos registrados no Brasil para o controle da podridão azeda levam produtores e pesquisadores em busca de métodos alternativos de controle como o uso de leveduras, sendo o fator *killer* um dos possíveis mecanismos de ação desses microrganismos. Diante disso, esse trabalho teve por objetivo purificar a toxina *killer* produzida por *Aureobasidium pullulans* e testá-la no controle dos fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*. Inicialmente, foram testados diferentes métodos de precipitação proteica; em seguida, com a finalidade de conhecer a composição do extrato bruto proteico de *A. pullulans* foi determinada a atividade proteolítica e a presença de proteínas que agem sobre receptores da parede celular, β -1,3 glucanase e quitinase. A purificação da toxina foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel Sephadex G-75 em tampão formiato de amônio 0,05M, pH 6,0 e cromatografia em coluna de Cellulose (Medium Fibers) em tampão citrato 0,01M, pH 4,6. Posteriormente, a purificação foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida e realizada a detecção de atividade *killer* em meio sólido YEPD-azul de metileno tamponado com citrato-fosfato (0,1 M pH 4,6). A identificação da toxina foi realizada por meio de espectrometria de massas (LC-MS^E). Pelos resultados obtidos foi verificado que o melhor método de precipitação proteica foi etanol na proporção 2:1 (v/v etanol/sobrenadante). No estudo sobre o extrato bruto proteico da levedura foi possível observar a presença de enzimas com atividade proteolítica, atividade β -1,3-glucanase e quitinase. Durante o processo de purificação foi possível observar que a toxina *killer* produzida pelo isolado de *A. pullulans* é uma proteína de baixa massa molecular pertencente à família das ubiquitinas, que apresenta atividade *killer* contra os fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*.

PALAVRAS- CHAVE: Enzimas hidrolíticas, ubiquitina-like, podridão azeda e bolor verde

Purification of killer toxin from *Aureobasidium pullulans* aimed at biocontrol of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*

ABSTRACT – The citrus sector faces several problems with post-harvest diseases, such as green mold and sour rot, caused by *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*, respectively. The emergence of resistant *P. digitatum* strains and the lack of products registered in Brazil for the control of sour rot lead producers and researchers in search for alternative control methods such as the use of yeasts, being the killer factor one of the possible mechanisms of action of these microorganisms. Therefore, this work aimed at purifying the killer toxin produced by *Aureobasidium pullulans* and testing it in the control of *P. digitatum* and *G. citri-aurantii* phytopathogens. Initially, different methods of protein precipitation were tested; then, in order to know the composition of the protein precipitate from *A. pullulans*, the proteolytic activity and the presence of proteins acting on cell wall receptors, β -1,3 glucanase and chitinase were determined. Toxin purification occurred by Sephadex G-75 gel exclusion chromatography with ammonium formate elution buffer (0.05M, pH 6.0) and Cellulose chromatography (Medium Fibers) and citrate elution buffer (0.01M, pH 4.6). Subsequently, purification was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis and the detection of killer activity was performed in solid YEPD-methylene blue buffered with citrate-phosphate (0.1 M pH 4.6). Toxin identification was performed by mass spectrometry (LC-MS^E). Based on the results obtained, it was verified that the best protein precipitation method was 2: 1 ethanol (v / v ethanol / supernatant). In the study on the yeast protein profile, it was possible to observe the presence of enzymes with proteolytic activity, β -1,3-glucanase and chitinase. During the purification process, it was possible to observe that the killer toxin produced by the *A. pullulans* isolate is a low molecular weight protein belonging to the ubiquitin family, presenting killer activity against *P. digitatum* and *G. citri-aurantii* phytopathogens.

KEYWORDS: hydrolytic enzymes, sour rot, ubiquitin-like, green mold

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Efeito da concentração de extrato proteico de <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 na atividade de quitinase e β -1,3-glucanase.....	19
Tabela 2. Efeito da concentração de extrato proteico de <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77 na atividade de quitinase e β -1,3-glucanase.....	20
Tabela 3. Alinhamento de sequências parciais de fragmentos trípticos do pico P1 purificada de <i>A. pullulans</i> com espectros de massas do banco de dados reverso de <i>A. pullulans</i> UNIPROT.....	24
Tabela 4. Sequência e alinhamento dos fragmentos peptídicos da toxina <i>killer</i> de <i>A. pullulans</i> ACBL-77.....	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Isolado de <i>A. pullulans</i> ACBL-77.....	9
Figura 2: Atividade killer da levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> . (A) Contra <i>S. cerevisiae</i> NCYC 1006. (B) Contra <i>P. digitatum</i> . (C) Contra <i>G. citri-aurantii</i>	18
Figura 3. 100µL de azocaseína (4mg/mL) em Tris 100mM (pH 8,0) incubado com 100µL de solução do extrato proteico em diferentes concentrações (0,25; 0,45; 0,9 mg/mL) durante 1 h a 37°C. Atividade proteolítica determinada por espectrofotometria (λ 442 nm)	20
Figura 4. Etapa 1 da purificação da toxina <i>killer</i> produzida por <i>A. pullulans</i> . (A) Cromatografia em coluna de Sephadex G-75 do extrato proteico de <i>A. pullulans</i> . Tampão de eluição formiato de amônio (0,05M, pH 6,0) em uma coluna cromatográfica contendo gel de Sephadex G-75 (1,6 cm x 100 cm) eluído no mesmo tampão em fluxo contínuo (0,5 mL/min; 2mL/tubo). (B) Eletroforese dos picos (F1, F2 e F3) da cromatografia de exclusão molecular. (MM) padrão de massa molecular; (EBP) extrato bruto proteico de <i>A. pullulans</i> . Gel de poliacrilamida (15%), tampão Tris-glicina 0,1M, pH=8,3, SDS (0,1%). Condições eletroforéticas: 2h, 20mA, 100V. Gel corado com Azul de Coomassie R-350	21
Figura 5. Avaliação dos picos F1, F2 e F3 quanto à atividade de antagonismo. (A) contra <i>S. cerevisiae</i> . (B) contra <i>P. digitatum</i> . (C) contra <i>G. citri-aurantii</i> . Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. (C-) Controle negativo: H ₂ O Milli-Q.....	22
Figura 6. Etapa 2 da purificação da toxina <i>killer</i> produzida por <i>A. pullulans</i> . (A) Cromatografia em coluna de Cellulose (Medium Fibers) da fração F3. Tampão de eluição citrato (0,01M, pH 4,6). Fluxo contínuo (0,5 mL/min; 1,5mL/tubo). (B) Eletroforese dos picos (P1 e P2) da Cromatografia em coluna de Cellulose. (MM) padrão de massa molecular; Gel de poliacrilamida (15%), tampão Tris-glicina 0,1M, pH=8,3, SDS (0,1%). Condições eletroforéticas: 2h, 20mA, 100V. Gel corado com Azul de Coomassie R-350.....	22

Figura 7. Avaliação dos picos P1 e P2 quanto à atividade de antagonismo.

(A) contra *S. cerevisiae*. (B) contra *P. digitatum*. (C) contra

G. citri-aurantii. Atividade visualizada através da difusão e

formação de halos de inibição. (C-) Controle negativo: H₂O

Milli-Q..... 23

1. INTRODUÇÃO

A produção de laranja no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro foi de 398,35 milhões de caixas na safra de 2017/18. O que coloca o Brasil como um dos maiores produtores de frutas, tanto para consumo *in natura*, como para a indústria, quando comparado com a safra da Flórida que atingiu 45 milhões de caixas (FUNDECITRUS, 2018).

Além de impactar na economia brasileira, o setor contribui para o desenvolvimento regional com a geração de empregos, por exigir uma grande quantidade de mão de obra (NEVES; TROMBIN, 2017).

Apesar da importância econômica e social, a citricultura enfrenta problemas de ordem fitossanitária, como é o caso das doenças ocasionadas por fungos que afetam a qualidade e a quantidade dos frutos e, são responsáveis por perdas de 25% a 50% da produção na pós-colheita (PALOU; VALENCIA-CHAMORRO; PÉREZ-GAGO, 2015).

Dentre os patógenos, que ocorrem na pós-colheita de citros, destacam-se os fungos *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) e *Penicillium digitatum* (Pers., Fr.) Sacc., agentes causais da podridão azeda e do bolor verde, respectivamente.

O controle do bolor verde baseia-se no tratamento de frutos com fungicidas, como imazalil (IMZ) e tiabendazol (TBZ). No entanto, o uso excessivo e indiscriminado desses produtos tem gerado preocupações nos produtores e consumidores, pelos efeitos colaterais à saúde humana e contaminação do ambiente, além de acarretar no surgimento de linhagens resistentes do patógeno (D'AQUINO et al., 2013; XU; CHOI, 2014; KIM; LEE, 2015).

Com relação à podridão azeda, a doença é relatada em todos os países produtores, afetando todas as espécies e cultivares de citros (TALIBI et al., 2011). No Brasil, em particular, nenhuma das medidas de controle utilizadas para as podridões de pós-colheita em citros são eficazes contra *G. citri-aurantii*.

Diante deste contexto, buscam-se métodos alternativos de controle, como por exemplo, o uso de leveduras contra patógenos que ocorrem na pós-colheita, uma vez que, as mesmas apresentam características que facilitam o antagonismo, pela capacidade de adaptação e colonização; apresentam taxas reprodutivas elevadas e competem por espaços e nutrientes no local da infecção (SPADARO; DROBY, 2016; ZHIMO; BHUTIA; SAHA, 2016).

Um dos primeiros mecanismos de ação de leveduras contra fitopatógenos foi descoberto por Bevan e Makower (1963), mostrando a habilidade de *Saccharomyces cerevisiae*

em produzir a toxina *killer*, como um composto antimicrobiano, capaz de causar a morte de fungos filamentosos (IZGU; ALTINBAY, 2004).

O fenótipo *killer* encontra-se entre isolados de leveduras (K+) que produzem e excretam proteínas ou glicoproteínas de baixa massa molecular, letais às células microbianas sensíveis, denominadas de "proteínas *killer*" ou "toxinas *killer*" (MAQUEDA et al., 2012; ALOUI et al., 2015).

O fenótipo *killer* não é restrito ao gênero *Saccharomyces*, podendo ser encontrado em outros gêneros de leveduras como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Wickerhamomyces* indicando que o fenômeno *killer* é de fato generalizado entre leveduras (ALLOUI et al., 2015; GRZEGORCZYK et al., 2017).

As leveduras *killer* são originalmente definidas como produtoras de exotoxinas, ou micocinas (BEVAN; MAKOWER, 1963). De maneira geral, a atividade das toxinas *killer* é sensível a fatores como pH, temperatura de incubação das leveduras, composição e propriedades físico-químicas do meio e concentração de células sensíveis. Normalmente, as micocinas expressam a atividade *killer* em valores de pH ácido que variam entre 4 e 5, e temperaturas entre 20 °C a 25 °C (IZGU; ALTINBAY; YUCELIS, 1997). Atualmente aceita-se que em pH 4,5 a maioria das toxinas apresenta máxima atividade e estabilidade tornando-se instáveis e inativas em valores acima de 5,0 (BUZZINI; TURCHETTI; VAUGHANMARTINI, 2007).

Isolados de leveduras *killer* são imunes às suas próprias toxinas, mas podem ser sensíveis às toxinas de outros organismos. Sendo exotoxinas, não necessitam do contato direto célula-célula para atuarem sobre outras leveduras sensíveis, as toxinas *killer* como por exemplo algumas β -lactamases, quitinases e ubiquitinas agem por meio de receptores de parede e membrana celular (SCHMITT; BREINIG, 2006; CHI et al., 2010).

As ubiquitinas, em geral, sinalizam proteínas destinadas à degradação. A primeira ubiquitina foi purificada por Goldstein et al. (1975), a partir de células bovinas, com massa molecular de 8,5 kDa. Ng, Lam e Chan (2002), que por sua vez, purificaram uma ubiquitina-like com 9,5 kDa da espécie de cogumelo *Pleurotus sajor-caju*.

Ferraz et al. (2016) relataram resultados satisfatórios da atividade *killer* de *Aureobasidium pullulans* De Bary (Arnaud) - ACBL-77 contra levedura sensível (*S. cerevisiae* NCYC 1006). Segundo, os autores, o fator *killer* pode ser considerado um dos possíveis mecanismos de ação contra *G. citri-aurantii* durante o biocontrole da podridão azeda em frutos cítricos.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi purificar a toxina *killer* de *A. pullulans* e testá-la no controle dos fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-auranti*, sob condições laboratoriais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citricultura

A citricultura é um setor importante para a economia do Brasil. Segundo Neves e Trombin (2017), o país é responsável por 34% da produção de laranja e 56% do suco produzido no mundo, quando considerada a média das últimas cinco safras. De acordo com os autores, o Brasil detém 76% do comércio mundial de suco de laranja, o que o torna o principal fornecedor global. A citricultura gera um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares em todas as ramificações de sua cadeia produtiva e cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos.

Entretanto, há muitas doenças que causam perdas importantes para esse setor, dentre elas estão as doenças de pós-colheita que podem ser de origem física, fisiológica ou patológica. As infecções ocorrem devido a ferimentos ocasionados nos frutos durante a colheita, transporte e manuseio, que são portas de entrada para patógenos fúngicos. Algumas infecções podem ocorrer nos frutos, ainda no campo, onde permanecem latentes, vindo a se manifestarem durante o beneficiamento dos frutos na pós-colheita (PALOU; VALENCIA-CHAMORRO; PÉREZ-GAGO, 2015).

Das doenças fúngicas, os bolores (*Penicillium digitatum* e *P. italicum*), juntamente com a podridão azeda (*Geotrichum citri-aurantii*), são as doenças mais importantes que ocorrem com mais frequência nos frutos cítricos, embora, existam outras doenças como as podridões pedunculares, causadas por *Lasiodiplodia theobromae* e *Phomopsis citri*; a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e a podridão negra (*Alternaria alternata*), que ocasionalmente, podem ser importantes economicamente (FISCHER et al., 2013; REGNIER et al., 2014).

2.2. Bolor verde

O bolor verde, causado por *Penicillium digitatum*, é uma das doenças fúngicas que ocorre com mais frequência no Brasil. O fungo sobrevive saprofiticamente na forma de conídios nos substratos orgânicos de pomares e outros ambientes, podendo afetar os frutos ainda no campo, na fase final de maturação (FISCHER; LOURENÇO; AMORIM, 2008).

A manifestação da doença depende de condições climáticas adequadas (temperaturas em torno de 24°C) e de como será feita a manipulação dos frutos, desde a colheita até o consumidor, considerando que os ferimentos ocasionados nos frutos favorecem as infecções pelo fitopatógeno. A doença é caracterizada inicialmente por apresentar uma podridão mole nos frutos. As lesões ao atingirem um diâmetro de 2-3cm são recobertas por um micélio branco com massa densa de conídios de cor verde-oliva. Os conídios apresentam um formato ligeiramente cilíndrico a ovalado com dimensões de 4 a 7 µm x 6 a 8 µm, são produzidos em cadeia, denominados assim de esporos catenulados. Essas estrutura são disseminadas pelo vento e atingem a superfície dos frutos. As hifas do fungo são septadas e colonizam o substrato, liberando enzimas, que atuam na decomposição das substâncias mais complexas, tornando-as assimiláveis, provocando assim, a podridão nos frutos. A fase perfeita ou fase sexuada desse fungo é rara na natureza. Após a infecção, os frutos têm o período de armazenamento reduzido, devido à formação de etileno, que acelera o processo de maturação, diminuindo a vida de prateleira (KIMATI et al., 1997; LARANJEIRA et al., 2002).

O controle dessa doença é feito por fungicidas, como imazalil (IMZ) e tiabendazol (TBZ), podendo ser aplicados sozinhos, em misturas, ou aplicados separadamente, em sequência. Embora funcione bem no controle da doença, o uso indiscriminado desses produtos contribui para a proliferação de linhagens do patógeno resistentes aos princípios ativos e deixam resíduos nos frutos, o que pode acarretar em danos à saúde pública (ISMAIL; ZHANG, 2004).

2.3. Podridão Azeda

A podridão azeda ou podridão ácida, causada pelo fungo *Geotrichum citri-aurantii* está difundida em todos os países produtores de citros, afetando todas as variedades, sendo as tangerinas as mais suscetíveis (TALIBI et al., 2011).

Inicialmente, os sintomas nos frutos aparecem como como lesões de coloração marrom-clara e brilhantes (LARANJEIRA et al., 2005), na sequência, o fungo secreta enzimas

extracelulares que degradam a casca e as vesículas de suco, formando, no local, uma massa aquosa, cujo suco se espalha (DAVIS; BAUDOIN, 1986). Em condições de elevada umidade (>80%) e temperaturas acima de 12 °C, surge na superfície do fruto, um mofo de coloração branca e aspecto enrugado, composto por micélio, conidióforos e conídios, originando, assim, uma podridão com forte odor pútrido (TUSET, 2000).

Esse fitopatógeno, em sua fase teleomórfica ou sexual possui a denominação de *Galactomyces citri-aurantii* E. E. Butler e, para a fase anamórfica ou assexual, de *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) Butler (BROWN; ECKERT, 2000). Sendo a fase assexual a mais comum e fácil de ser detectada (LARANJEIRA et al., 2005). Seu habitat natural é o solo e a contaminação dos frutos ocorre por meio de ferimentos causados durante a colheita e manipulação na casca da fruta madura, e quando em condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno como estações úmidas e temperaturas entre 25°C a 30°C, provocam perdas econômicas significativas (ECKERT; BROWN, 1988; COHEN; COGGINS; ECKERT, 1991; TALIBI et al., 2012).

Com relação ao controle da doença, existem dois produtos com ação sobre o patógeno, ortofenilfenato de sódio (OPP) o qual controla parcialmente a doença (LIU et al., 2009; FENG et al., 2011), porém, é considerado um composto cancerígeno (KITAGAWA; KAWADA, 1984) e o Guazatine que é usado para o controle da podridão azeda em países da Europa, África e Austrália (ISMAIL e ZHANG, 2004; McKAY; FOSTER; ADASKAVEG, 2012; KELLERMAN et al., 2018). No Brasil, não existem produtos registrados para controle dessa doença em frutas cítricas (FERRAZ et al., 2016).

2.4. Controle Biológico

O controle das doenças de pós-colheita é feito através da utilização de fungicidas sintéticos eficazes na preservação e qualidade dos frutos (IPPOLITO, 2002), além de contribuir para o aumento da “vida de prateleira” (MARI et al., 2010). O problema do uso destes produtos são os efeitos indesejáveis ao meio ambiente, e com o uso excessivo, acabam promovendo resistência de linhagens de fitopatógenos (PEREZ et al., 2016). Dessa maneira, a utilização do controle biológico vem sendo amplamente estudado como uma alternativa de controle (PASCHOLATI, 1998).

O controle de fitopatógenos por microrganismos pode ocorrer por diversos modos de ação como antibiose, competição por espaço e nutrientes, indução de resistência, inativação de

fatores de germinação, produção de toxinas *killer*, parasitismo e produção de enzimas degradadoras da parede celular do patógeno (WHIPPS, 2001; EL-MEHALAWY et al., 2004; FERRAZ et al., 2016), sendo a estratégia mais efetiva, quando os agentes de biocontrole apresentam múltiplos modos de ação.

A utilização do controle biológico, como alternativa de controle, tem sido considerada a mais natural e socialmente aceita em substituição total ou, na diminuição da dose do produto químico (MORETTO et al., 2014).

Dentre os microrganismos, as leveduras são potencialmente mais efetivas no controle de doenças de pós-colheita, pois são fenotipicamente mais adaptadas a esses nichos e são hábeis na colonização e competição por espaço e nutrientes (FILONOW, 1998; COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003).

Além disso, as leveduras podem apresentar outros mecanismos de ação, podendo induzir resistência em tecidos do hospedeiro a fitopatógenos e produzir antibióticos e enzimas que degradam a parede celular de fungos. Além disso, as leveduras são importantes como agentes de controle biológico por não contaminarem os alimentos, possuírem baixa mico-toxicidade, visando a segurança alimentar no consumo de frutos *in natura* e são tolerantes aos fungicidas frequentemente utilizados no tratamento de frutos na pós-colheita (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2006; LAHLALI et al., 2011; FERRAZ et al., 2016).

Já são comercializados produtos à base de levedura para controle biológico como Shemer® (*Metschnikowia fructicola*) em Israel (DROBY et al., 2009), Candifruit™ (*Candida sake*) na Espanha (USALL et al., 2009); Na Bélgica, Nexy (*Candida oleophila*) (EFSA, 2012) e, na Alemanha, o Boni-Protect®, contendo duas cepas de *A. pullulans*, eficiente contra patógenos de pós-colheita, como *Monilia fructigena*, *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*, em maçãs (WAGNER et al., 2013).

Algumas leveduras antagonistas, dependendo da espécie e do isolado, apresentam a atividade *killer* como um mecanismo contra células sensíveis, onde a toxina afeta diretamente a parede celular do microrganismo alvo, podendo provocar a morte (GOLUBEV; PFEIFFER; GOLUBEVA, 2006).

2.5. Atividade *killer*

Em 1963, Bevan e Makower descobriram a toxina *killer* em *Saccharomyces cerevisiae*, um dos primeiros mecanismos de ação de algumas leveduras capaz de causar a morte de fungos filamentosos (IZGU; ALTINBAY, 2004; SCHMITT; BREINIG, 2006). Segundo alguns autores existem quatro tipos de toxinas *killer* já descritas em *S. cerevisiae*, denominadas K1, K2, K28 e Klus, com base na sua atividade e imunidade (SCHMITT; BREINIG, 2006; RODRIGUEZ-COUSINO et al., 2011). As proteínas *killer* matam células de leveduras sensíveis, enquanto que suas próprias células permanecem imunes à sua toxina *killer* (SCHMITT; BREINIG, 2006; MEINHARDT; KLASSEN, 2009).

As toxinas *killer* podem ser encontradas em diversos gêneros de leveduras, como em *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (CASTORIA et al., 2003; RAU et al., 2005; BAUERMEISTER et al., 2017).

A base genética do fenótipo *killer* pode estar associada com a presença de dsRNA (*S. cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Ustilago maydis*), dsDNA (*Kluyveromyces lactis*, *Pichia acociae*, *Pichia inositovora*) ou genes cromossomais (*Pichia farinosa*, *Williopsis mrakii*) (SUZUKI, 1999; SCHMITT; BREINIG, 2002).

Quanto à massa molecular, já foram descritas toxinas de diversos tamanhos. Estudos estimam a massa molecular em 300 kDa para o isolado de *Hansenula anomala* (KAGIYAMA et al, 1988), 100kDa para *K. lactis* (SUGISAKI et al., 1984), 47kDa para *Pichia anomala* NCYC 432 (IZGU; ALTINBAY; ACUN, 2006), 36 kDa para *Candida* sp. (YOKOMORI; AKIYAMA; SCHIMIZU, 1988), 20 kDa para *S. cerevisiae* (GOTO et al., 1990), 18kDa para *H. uvarum* (RADLER; SCHMITT; MEYER, 1990), 11 kDa para *Williopsis saturnus* WC91-2 (WANG, X. et al., 2012).

Estudos relatam resultados positivos de ação de toxina *killer* contra outros microrganismos, como por exemplo, o controle de *Fusarium oxysporum* pela levedura *killer* *Zygosaccharomyces bailii* (WEILER; SCHMITT, 2003) e de *Botrytis cinerea* pela *Pichia membranifaciens* (SANTOS; SANCHEZ; MARQUINA, 2004). Em 2005, Walker et al. mostraram uma intensa capacidade de inibição do crescimento micelial de *Heterobasidium annosum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti* por leveduras *killer*. Para o controle de *Penicillium expansum* em maçãs, tanto *Candida guilliermondii* quanto *Pichia ohmeri* foram eficazes (COELHO, 2005).

Devido ao caráter *killer* apresentado, as leveduras *killer* possuem diversas aplicações biotecnológicas de caráter científico e comercial, sendo utilizadas na preservação de alimentos como agentes de biocontrole, em indústria alimentícia (PALPACELLI; CIANI; ROSSINI, 1991), na indústria de fermentação para combater contaminantes (IZGÜ; ALTINBAY; SERTKAYA, 2005), e segundo Polonelli et al. (1986), leveduras *killer* foram empregadas no tratamento de infecções humanas e animais.

A habilidade das leveduras em exibir um fenótipo *killer*, no controle de doenças na pós-colheita de frutos, vem despertando um interesse particular. Tais proteínas têm potencial no controle de leveduras, fungos e bactérias patogênicas por meio de diferentes mecanismos, incluindo a hidrólise do principal componente da parede celular β -1,3-glucanos (IZGÜ; ALTINBAY, 2004; MUCCILLI et al., 2013), o vazamento de íons pela formação de canais iônicos na membrana citoplasmática da célula-alvo e a inibição da síntese de DNA (SCHMITT; BREINIG, 2002).

Neste contexto, Kepekçi (2006) observou que a proteína *killer* tipo K5 produzida por *Pichia anomala* é uma exo β -1,3 glucanase que tem atividade antifúngica, sendo efetiva, em patógenos de pós-colheita como *B. cinerea*, *P. digitatum* e *P. italicum*. Entre as espécies *killer*, foi relatado que *Wickerhamomyces anomalus* produz altos níveis de toxinas *killer* com um amplo espectro de atividade e uma estabilidade relativamente alta, comparado com outras leveduras *killer* (WANG et al., 2008). Platania et al. (2012) verificaram a atividade de β -glucanase como mecanismo de ação da levedura *killer* *W. anomalus* contra *P. digitatum*, confirmado pela presença do halo de inibição e pelos danos sobre as hifas do fitopatógeno.

Outra cepa da levedura *P. anomala* (DBVPG 3003), estudada por De Ingeniis et al. (2009), produz uma toxina *killer* chamada Pikt, que possui atividade antifúngica contra leveduras *Brettanomyces/Dekkera* sp.. A toxina *killer* Pikt é uma proteína homogênea com cerca de 8 kDa, que mostrou semelhança com uma ubiquitina em relação a massa molecular e sequências N-terminais. Ela interage com β -1,6-glucana, presente na parede celular de alvos sensíveis, entretanto, diferentemente da toxina K1 (*S. cerevisiae*), a atividade de Pikt não é mediada por um aumento na permeabilidade da membrana.

Dados de literatura mostram que *A. pullulans*, alvo de estudo neste trabalho, tem capacidade de produzir aureobasidina A, um antibiótico depsipeptídico antifúngico, que tem forte atividade *in vitro* contra muitos fungos patogênicos, incluindo *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus spp.* (IKAI et al., 1991; TAKESAKO et al., 1993) *Geotrichum citri-auranti* (CUNHA, et al.,2016).

2.6. *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans (De Bary) G. Arnaud é classificado como um organismo do Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Dothideales, Família Dothioraceae e Gênero *Aureobasidium* (NATURDATA, 2016). Essa levedura apresenta crescimento inicial de coloração clara (roseada) tornando-se roxeada conforme ocorre a melanização das hifas, sendo assim conhecida como "levedura negra", como ilustrado na Figura 1. Essas hifas melanizadas sofrem septação, formando clamidósporos ou artrósporos (ZALAR et al., 2008). A melanina produzida fornece proteção contra a lise do microrganismo, por irradiação solar, luz ultravioleta e, morte por radicais livres (FRANZEN et al., 1999).

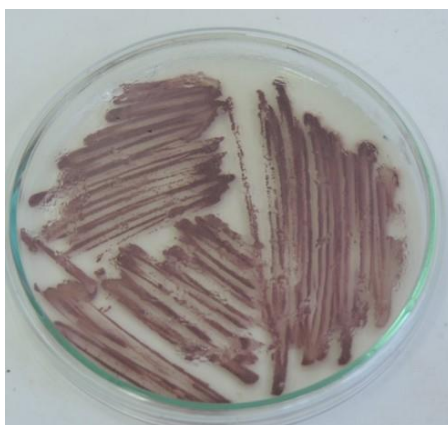


Figura 1. Isolado de *A. pullulans* ACBL-77.

Esta espécie é capaz de crescer em células individuais chamadas *yeast-like*, caracterizada por apresentar hifas largas, policarióticas, conidiação síncrona ou, como hifas septadas apresentando células de brotamento (YURLOVA; HOOG, 1997; SINGH et al., 2015).

É facilmente encontrado em vários nichos ecológicos, incluindo solo, água e tecido vegetal. Por sua fácil propagação, essa espécie é encontrada globalmente, exceto em ambientes muito frios (ZALAR et al., 2008).

Por ser um organismo ubíquo, apresenta características fisiológicas diferentes e alta variabilidade e instabilidade genética possibilitando sua aplicação em muitas áreas biotecnológicas (YURLOVA; MOKROUSOV; DE HOOG, 1995; CHI et al., 2009). *A. pullulans* é tolerante a ambientes contaminados com metais pesados, podendo ser isolada de locais contaminados com cádmio, chumbo, etc. (CERTIK; BREIEROVA; JURSIKOVA, 2005). Há relato do uso deste microrganismo na produção de alimentos, enzimas para fármacos, detergentes e transformações bio-orgânicas. (PARAWIRA, 2008). A análise da morfologia é

insuficiente para avaliar a variabilidade interespecífica e para diferenciar linhagens estreitamente relacionadas. Normalmente é classificada como não patogênica. Entretanto, há relatos raros de cepas que podem ser nocivas às plantas (COOKE, 1959).

Para o sucesso no biocontrole, o microrganismo deve ser tolerante a escassez de nutrientes, radiação ultra-violeta, baixa temperatura e às diversas mudanças climáticas. *A. pullulans* possui alta capacidade de adaptação tanto na filosfera quanto na troposfera, por ser altamente tolerante a dessecação e irradiação (GAUR et al., 2010).

Há relatos que um dos metabólitos de *A. pullulans* apresenta amplo espectro de ação contra diversos patógenos. A aureobasidina A (AbA), um antibiótico fúngico depsipeptídeo cíclico, com atividade antifúngica contra diversos fitopatógenos como o *P. digitatum*, agente causal do bolor verde em citros e o *B. cinerea*, agente causal do mofo cinzento em morango, onde a AbA inibiu a germinação e o crescimento do tubo germinativo (TAKESAKO et al., 1991; LIU et al., 2007). Os autores ainda indicam que AbA age no bloqueio da atividade de inositolfosforilceramida sintase (IPC), enzima presente em fungos, que é essencial para a biossíntese dos esfingolípídios.

A espécie também produz um biopolímero conhecido como pululana, com alta empregabilidade nas diversas áreas biotecnológicas como produção de plásticos biodegradáveis, aditivos alimentícios e para biorremediação de ambientes contaminados (CHENG; DEMIRCI; CATCHMARK, 2011); e apesar da biossíntese da pululana ser desconhecida, sabe-se que é sintetizada intracelularmente e depois excretada (LEATHERS, 2013).

Há algum tempo a *A. pullulans* vem sendo estudada como um agente de controle biológico em diversas culturas, principalmente, no controle de doenças ocorridas na fase de pós-colheita. Estudos anteriores encontraram resultados positivos no controle de *P. expansum*, agente causador do bolor azul em maçã, utilizando uma cepa de *A. pullulans*, obtendo até 97% de frutos sem sintomas da doença (BENCHEQROUN et al., 2007). Também foram relatados estudos de cepas da espécie para controle de *P. expansum* e *B. cinerea* em maçãs, com redução de até 89% na incidência das doenças (IPPOLITO et al., 2000); de *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, causadores do bolor cinzento e da podridão mole, respectivamente, em morango (LIMA et al., 1997); de *B. cinerea* e *Monilinia laxa*, reduzindo a incidência das doenças de 80% em cereja e 64% em uva, quando a levedura foi aplicada de forma curativa (SCHENA et al., 2003).

Castoria et al. em 2001 descreveram o mecanismo de ação de uma cepa de *A. pullulans* contra *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer* e *Aspergillus niger* (patógenos de pós-colheita de maçã), como sendo a competição por nutrientes, porém, os autores relataram a detecção de exoquitinase [N-acetyl- β -D-glucosaminidase (Nagase)] e de β -1-3-glucanase nos estudos *in vitro* e *in vivo*, sugerindo, portanto, que estas enzimas poderiam estar envolvidas na atividade antifúngica.

Ferraz et al. (2016) relataram resultados satisfatórios da atividade *killer* de *A. pullulans* - ACBL-77 contra levedura sensível (*S. cerevisiae* N CYC 1006). Segundo, os autores, o fator *killer* pode ser considerado um dos possíveis mecanismos de ação contra *G. citri-aurantii* durante o biocontrole da podridão azeda em frutos cítricos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Foram utilizados no presente estudo a levedura *killer Aureobasidium pullulans* (ACBL-77), a levedura sensível ao fator *killer* (*Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006) e os fitopatógenos *Geotrichum citri-aurantii* e *Penicillium digitatum* pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil.

3.2. Detecção de atividade *killer* da levedura

O fator *killer* do isolado de *A. pullulans* (ACBL-77), utilizando a metodologia adaptada de Woods e Bevan (1968), foi testado contra a levedura sensível ao fator *killer* (*S. cerevisiae* NCYC 1006) e nos fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*. Uma alíquota de 0,4 mL de uma suspensão (1×10^6 células ou esporos/mL) de cada microrganismo foi repicada para meio YEPD-azul de metileno (1% de extrato de levedura; 2% de glicose; 2% de peptona, 2% de Ágar e 0,002% de Azul de metileno, tamponado com citrato-fosfato 0,1 M pH 4,6) contido em placas de Petri, pela técnica de espalhamento. Em seguida, discos de meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) contendo as células da levedura (previamente espalhada e incubada por 72h) foram transferidos simultaneamente para as placas e as culturas incubadas por 48h. Posteriormente, a atividade *killer* foi determinada pela presença ou ausência do halo de inibição.

3.3. Obtenção de proteínas extracelulares de *A. pullulans* ACBL-77 por precipitação com etanol, sulfato de amônio e acetona

Com o objetivo de determinar a melhor técnica de precipitação das proteínas de *A. pullulans*, uma alçada da levedura foi retirada de uma colônia ativa (48 horas de cultivo) e transferida para frascos de Erlenmeyer, de capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura YEPD (1% de extrato de levedura; 2% de peptona e 2% de glicose), sendo, posteriormente, a cultura incubada sob agitação a 150rpm, na ausência de luz por 24 horas. Em seguida, transferiu-se 1mL da cultura para 100mL de meio YEPD, com posterior incubação sob agitação a 150 rpm, em temperatura ambiente por 72 horas.

Para a obtenção do precipitado proteico, a cultura de *A. pullulans* foi centrifugada a 10000xg por 15 min a 4 °C para a remoção de células e o sobrenadante submetido à precipitação com diferentes agentes precipitantes:

3.3.1. Precipitação de proteína com etanol

Para a precipitação com etanol, foram testadas duas concentrações distintas, 0,8:1 (v/v) (LABBANI et al., 2015) e 2:1 (v/v) etanol/sobrenadante (SOARES; SATO, 2000). O etanol gelado foi adicionado na proporção correta em 450 mL do sobrenadante da cultura, o polissacarídeo pululana formado foi descartado, e o restante foi deixado *overnight* a 4 °C e, submetido à centrifugação a 10.000xg por 15 min e o precipitado proteico foi solubilizado em água destilada e concentrado em liofilizador por 24 h.

3.3.2. Precipitação de proteína com acetona

O sobrenadante do meio de cultura foi testado com acetona numa concentração de 0,8:1 (v/v) segundo a metodologia adaptada de Soares e Sato (2000). O solvente foi adicionado ao sobrenadante da cultura, o polissacarídeo pululana formado foi descartado, e o restante foi deixado *overnight* a 4 °C, em seguida, centrifugado a 10.000xg por 15 min e o precipitado proteico foi solubilizado em água destilada e concentrado em liofilizador por 24 h.

3.3.3. Precipitação de proteína com sulfato de amônio

O sobrenadante do meio de cultura foi precipitado com sulfato de amônio na concentração 0,8:1 (m/v) de saturação (VILLALBA et al., 2016). Para tal, o sal foi macerado em um almofariz e, com o auxílio de um agitador magnético, 343,2g de sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante e deixado *overnight* a 4 °C. O precipitado foi dialisado em Vivaspin® 10 kDa, por 15min a 25°C a 7000xg. O precipitado dialisado foi armazenado em freezer a -80 °C e concentrado em liofilizador por 24 h.

3.3.4. Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas dos extratos proteicos foi determinada pelo Método do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949) adicionando-se na placa de Elisa, 200 µL do reagente biureto e 10µL das soluções de extratos proteicos em água Milli-Q, com posterior incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. A absorbância foi medida a 540 nm ajustando-se o zero de absorbância com solução do branco, preparado com 200 µL do reagente biureto e 10µL de água Milli-Q, ou seja, foi subtraído da absorbância de cada amostra o valor da absorbância do branco. Os resultados obtidos foram plotadas em curva padrão para albumina e a quantidade de proteína foi expressa em mg/mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata (SD=3).

3.4. Determinação de atividade de protease, β -1,3-glucanase e quitinase

3.4.1. Atividade Proteolítica

A avaliação da atividade proteolítica foi realizada utilizando como substrato a azocaseína, como descrito por Benitez, Silva e Finkelstein (2001). Uma alíquota de 100 µL de solução em diferentes concentrações da amostra (0,25; 0,45; 0,9 mg/mL) foi incubada a 37 °C por 1 hora com 100 µL de azocaseína (4mg/mL). Em seguida, a reação foi interrompida com 400µL de solução 10% de ácido tricloroacético e centrifugada a 10000xg, por 15 minutos em temperatura ambiente. No sobrenadante resultante adicionou-se 700 µL de solução de NaOH 525mM. Determinou-se a absorbância a 442nm, contra o branco apropriado e como controle positivo foi utilizado 10 µL de solução 10% de tripsina e azocaseína, seguindo as mesmas especificações. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,01 na absorbância. (*) valor de $p > 0,05$; (***) valor de $p < 0,05$; (C+) controle positivo.

3.4.2. Atividade de β -1,3-glucanase

A atividade de β -1,3-glucanase no extrato proteico foi determinada usando o substrato laminarina de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959). A mistura de 100 μ L de solução 1% de laminarina em água destilada, 100 μ L de solução de extrato proteico em diferentes concentrações (4,5; 10,0; 20,4 mg/mL) e 200 μ L de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 foi incubada a 37°C por 1 h. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 200 μ L de solução de DNS. Os microtubos foram aquecidos em banho-maria em ebulição por 10 minutos. Após resfriamento em gelo, até a temperatura de 25°C, a solução foi diluída com 1 mL de água destilada e homogeneizada. A absorbância foi medida a 540 nm ajustando-se o zero de absorbância com solução do branco. O branco foi preparado substituindo-se a amostra de extrato proteico da mistura de reação, por solução tampão. O valor da absorbância da amostra foi subtraído pelo valor de absorbância do controle negativo. Foi preparada uma curva padrão de glicose e uma unidade de atividade de β -1,3-glucanase foi expressa como $\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.4.3. Atividade de Quitinase

A atividade de quitinase no extrato proteico foi determinada usando o substrato glicol quitina de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959). A mistura de 100 μ L de solução 0,01% de glicol quitina em solução tampão McIlvaine 0,1M, pH 6,0. 100 μ L de solução de extrato proteico em diferentes concentrações (4,5; 10,0; 20,4 mg/mL) e 200 μ L de solução de tampão McIlvaine 0,1M, pH 6,0 foi incubada a 37°C por 60 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 200 μ L de solução de DNS. Os microtubos foram aquecidos em banho-maria em ebulição por 10 minutos. Após resfriamento em gelo, até a temperatura de 25°C, a solução foi diluída com 1 mL de água destilada e homogeneizada. A absorbância foi medida a 540 nm ajustando-se o zero de absorbância com solução do branco. O branco foi preparado substituindo-se a amostra de extrato proteico da mistura de reação, por solução tampão. O valor da absorbância da amostra foi subtraído pelo valor de absorbância do controle negativo. Foi preparada uma curva padrão de glicose e uma unidade de atividade de quitinase foi expressa como $\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.5. Purificação da toxina *killer* produzida por *A. pullulans* ACBL-77

3.5.1. Purificação da toxina *killer* de *A. pullulans* ACBL-77 por cromatografia em coluna de Sephadex G-75

A etapa 1 da purificação de proteínas consistiu na aplicação do precipitado proteico de *A. pullulans* (100mg), obtido segundo a metodologia descrita no item 3.3.1., diluído em tampão formiato de amônio (0,05M, pH 6,0) em uma coluna de cromatográfica de Sephadex G-75 (1,6 cm x 100 cm) eluído no mesmo tampão em fluxo contínuo (0,5 mL/min, 2 mL/tubo).

As frações F1 (tubos 20 ao 24), F2 (tubos 33 ao 42) e F3 (tubos 45 ao 73), obtidas com a cromatografia em coluna, foram concentradas por liofilização e submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), foram aplicados 10 µg/µL das amostras no gel sob condições eletroforéticas de 2 horas, 20mA, 100V. O gel foi corado com Azul de Coomassie R-350, utilizando a metodologia de Laemmli (1970).

As frações dos picos resolvidos nessa etapa foram diluídas em água MiliQ (10 µg/µL) e avaliados quanto ao fator *killer* contra a levedura sensível (*S. cerevisiae*) e os fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*, utilizando a metodologia adaptada de Woods e Bevan (1968) e descrita no item 3.2.

3.5.2. Purificação da toxina *killer* (Fração F3) de *A. pullulans* ACBL-77 em coluna de Cellulose

A etapa 2 da purificação de proteínas consistiu na aplicação da fração F3 obtida na etapa anterior, foi diluído em tampão citrato (0,01M, pH 4,6) em uma coluna cromatográfica de Cellulose (Medium Fibers) (Sigma-Aldrich) (1,0cm x 18cm) eluída no mesmo tampão em fluxo contínuo (0,5 mL/min, 1,5mL/tubo).

As frações referentes aos picos resolvidos foram concentradas por liofilização e submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), como citado anteriormente.

As frações dos picos (P1 e P2) resultantes da cromatografia com Cellulose (Medium Fibers) foram diluídas em água MiliQ (10 µg/µL) e avaliados quanto ao fator *killer* contra a levedura sensível (*S. cerevisiae*) e os fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*, utilizando a metodologia adaptada de Woods e Bevan (1968), descrita em 3.2.

3.6. Sequenciamento dos aminoácidos da proteína por espectrometria de massas

3.6.1. Digestão *In-gel* de proteínas

Para realizar a digestão *In-gel* de proteínas, foi feita uma corrida eletroforética, nas condições supracitadas, com a amostra P1. O *spot*, ou banda, presente no gel, foi cortado em segmentos de aproximadamente 1 mm³, com auxílio de um bisturi e acondicionados em tubos de microcentrífuga. Em seguida, foi adicionada solução de descoloração (50% v/v acetonitrila (ACN) e 25 mM bicarbonato de amônio) até total retirada do corante.

Após desidratação com 100% de ACN, foi realizada redução e alquilação dos *spots*: os fragmentos de gel foram reidratados com 20 mM de ditioneitol (DTT) em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 40 min a 55 °C. O líquido excedente foi removido e substituído por 55 mM de iodoacetamida (IAA) em 50 mM de bicarbonato de amônio. Os fragmentos de gel foram mantidos no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente, o líquido excedente foi novamente removido e os fragmentos lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio. Após serem novamente desidratados com 100 % de ACN, os fragmentos foram reidratados com solução de 20 ng.µL⁻¹ de tripsina (Promega V5111) em 50 mM de bicarbonato de amônio. Após a reidratação total, os fragmentos de gel foram parcialmente cobertos com 25 mM de bicarbonato de amônio e a digestão, realizada a 37 °C por 16 horas.

A ação da tripsina foi bloqueada pela adição de solução bloqueadora (50% ACN, 5% ácido fórmico, Água Milli-Q 45%) e os peptídeos extraídos dos fragmentos por lavagens sucessivas com solução de extração I (60% metanol, 1% ácido fórmico, 39% Água Milli-Q), solução de extração II (50% ACN, 1% ácido fórmico, 49% Água Milli-Q), seguidas da lavagem final com 100% de ACN. O volume foi reduzido em liofilizador.

3.6.2. LC-MS^E

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

As amostras foram ressuspendidas em 20 μL de Formiato de amônio 20 mM pH10. Os peptídeos foram sequenciados no espectrômetro de massas *Synapt G2 HDMS* (Waters), acoplado ao sistema *Acquity UPLC MClass*, com tecnologia 1D Simulado (Waters). Os peptídeos foram capturados por uma coluna Trap 2D Symmetry C18 (5 μm , 180 μm x 20 mm) (Waters). A separação foi realizada com uma coluna de primeira dimensão *Acquity UPLC M-Class peptide BEH C18* (5 μm , 300 μm x 50 mm) (Waters) e uma coluna analítica *Acquity UPLC M-Class peptide CSH C18* (1.7 μm , 75 μm x 150 mm) (Waters). As fases móveis da primeira dimensão foram: solução de formiato de amônio 20 mM pH 10 e 100% acetonitrila. Já na segunda dimensão os dois eluentes foram: A (100% água contendo 0,1% de ácido fórmico) e B (100% acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico).

O gradiente da primeira dimensão foi iniciado com 97% de formiato de amônio e 3% de acetonitrila. Em 4,6 minutos foi atingido 55% de formiato de amônio e 45% de acetonitrila e até completar 10 minutos a condição inicial foi restabelecida. O fluxo foi de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

O gradiente da fase móvel analítico foi iniciado com 93% A e 7% B e por 92 minutos o gradiente foi mudado linearmente para 60% A e 40% B e depois de 2 minutos foi atingido 15% A e 85% B. Em dois minutos a coluna restabeleceu a condição inicial. O fluxo foi de 0,300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Foi injetado 9 μL da amostra.

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) *Synapt G2 MS*, equipado com uma fonte nanolockspray operando no modo positivo (Waters, Manchester, UK), com *ion mobility*. Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo “V”, com poder de resolução típico mínimo de 12500, com a cela de *ion mobility* ativada. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana 1 $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e a mesma solução foi empregada para o "lock mass" utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo HDMS^E (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 kV) e alta (15-50 kV) energia de colisão, aplicadas ao módulo *trap* do ‘*T-wave*’ CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada

modo, no intervalo de m/z entre 50 e 2000.

3.6.3. Análise dos dados

Os espectros de massas foram processados utilizando o *software ProteinLynx GlobalServer (PLGS)* versão 3.1, com o banco de dados reverso de *Aureobasidium pullulans UNIPROT* (data do download: 27 de setembro de 2017; 49700 proteínas). Os parâmetros de processamento incluíram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de três íons-fragmento correspondentes por peptídeo; mínimo de 7 íons-fragmento correspondentes por proteína; mínimo de 2 peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso positivo (FDR) a 4%.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção de atividade *killer* da levedura

A levedura *A. pullulans* se mostrou eficaz quanto à atividade *killer* contra os três microrganismos para os quais foi testada, apresentando halo de morte celular azul para a cepa sensível de *S. cerevisiae* NCYC 1006 e halos de inibição para os fungos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*.

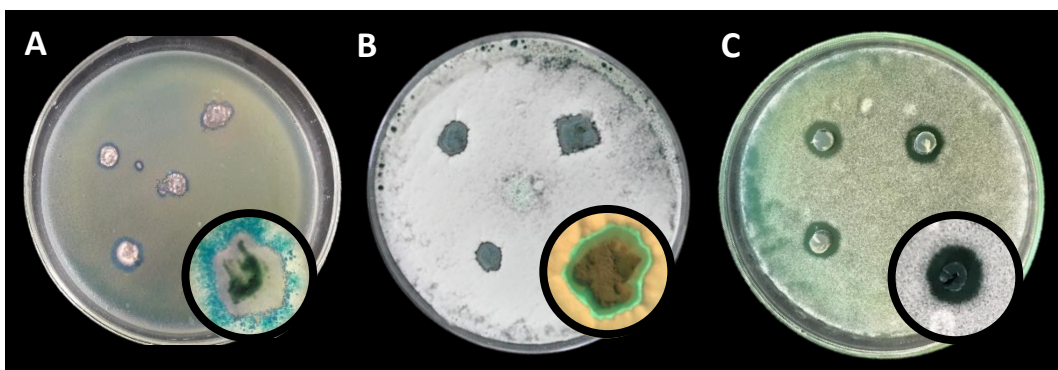


Figura 2: Atividade killer da levedura *Aureobasidium pullulans*. (A) Contra *S. cerevisiae* NCYC 1006. (B) Contra *P. digitatum*. (C) Contra *G. citri-aurantii*.

4.2. Obtenção de proteínas extracelulares de *A. pullulans* ACBL-77 por precipitação com etanol, sulfato de amônio e acetona

A metodologia de precipitação com etanol na proporção 2:1 (v/v etanol/sobrenadante) se mostrou mais eficiente para a obtenção das proteínas totais de *A. pullulans* apresentando uma concentração de 41 mg/mL de proteínas totais (Tabela 1). Essa metodologia também foi mais eficaz na extração do biopolímero pululana.

Tabela 1. Obtenção de proteínas *killer* de *A. pullulans* ACBL-77 por precipitação com etanol, sulfato de amônio e acetona

Agente Precipitante	[] Proteínas totais (mg/mL)
Etanol 2:1(v/v)	41,2
Etanol 0,8:1 (v/v)	22,85
Sulfato de Amônio 0,8:1 (m/v)	20,08
Acetona 0,8:1 (v/v)	18,68

4.3. Estudo da produção de protease, β -1,3-glucanase e quitinase pela linhagem *A. pullulans* ACBL-77

Ao se analisar o extrato proteico de *A. pullulans* obtido anteriormente com o etanol, verificou-se a presença de enzimas com atividade proteolítica (Figura 3), de β -1,3-glucanase e quitinase (Tabela 2), sendo as atividades dessas enzimas dependentes da concentração do extrato proteico.

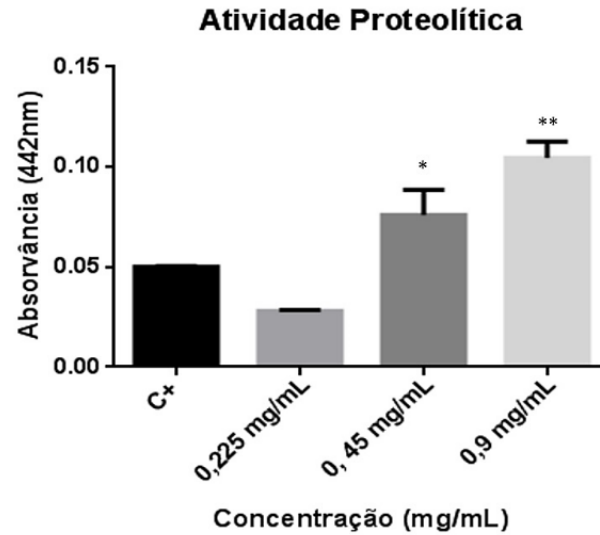


Figura 3. 100 μ L de azocaseína (4mg/mL) em Tris 100mM (pH 8,0) incubado com 100 μ L de solução do extrato proteico em diferentes concentrações (0,25; 0,45; 0,9 mg/mL) durante 1 h a 37°C. Atividade proteolítica determinada por espectrofotometria (λ 442 nm).

Tabela 2. Efeito da concentração de extrato proteico de *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 na atividade de quitinase e β -1,3-glucanase.

Proteínas (mg/mL)	Quitinase (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)	β -1,3 glucanase (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)
4,5	1,02	1,64
10,0	2,04	3,46
20,4	4,51	8,28

4.4. Purificação da toxina *killer* produzida por *A. pullulans*

A primeira etapa da purificação utilizando cromatografia em coluna de Sephadex G-75 resultou na separação parcial das proteínas totais em picos denominados F1, F2 e F3. Dentre os

picos resolvidos, o pico F3 apresentou maior concentração de proteínas com baixa massa molecular e menor número de bandas de proteínas (Figura 4).

Os picos F2 e F3 apresentaram atividade *killer* contra os fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii* e a levedura sensível *S. cerevisiae* NCYC 1006 (Figura 5).

Pela eletroforese dos picos (Figura 4B), foi selecionado o pico F3 para dar continuidade à segunda etapa de purificação, pois o mesmo apresentou o menor número de bandas e atividade *killer* contra os microrganismos.

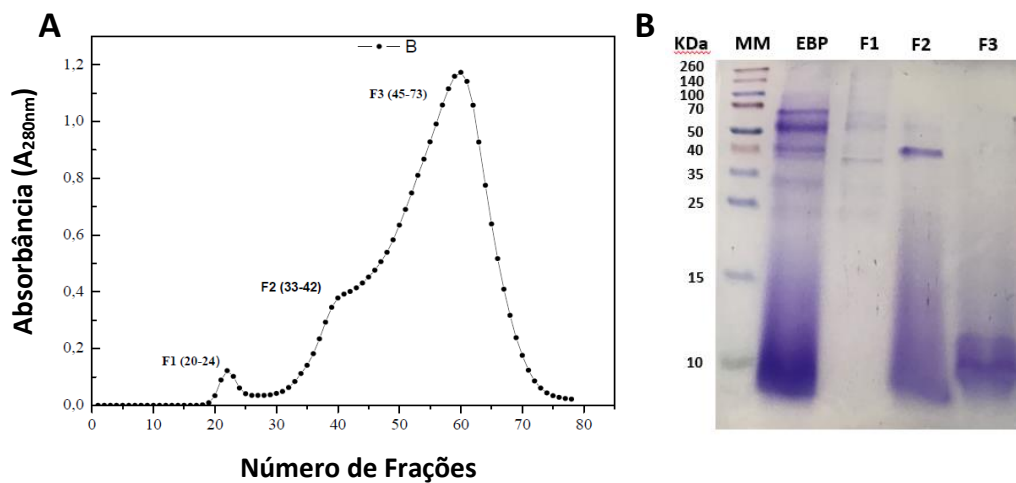


Figura 4. Etapa 1 da purificação da toxina *killer* produzida por *A. pullulans*. **(A)** Cromatografia em coluna de Sephadex G-75 do extrato proteico de *A. pullulans*. Tampão de eluição formiato de amônio (0,05M, pH 6,0) em uma coluna cromatográfica contendo gel de Sephadex G-75 (1,6 cm x 100 cm) eluído no mesmo tampão em fluxo contínuo (0,5 mL/min; 2mL/tubo). **(B)** Eletroforese dos picos (F1, F2 e F3) da cromatografia de exclusão molecular. **(MM)** padrão de massa molecular; **(EBP)** extrato bruto proteico de *A. pullulans*. Gel de poliacrilamida (15%), tampão Tris-glicina 0,1M, pH=8,3, SDS (0,1%). Condições eletroforéticas: 2h, 20mA, 100V. Gel corado com Azul de Coomassie R-350.

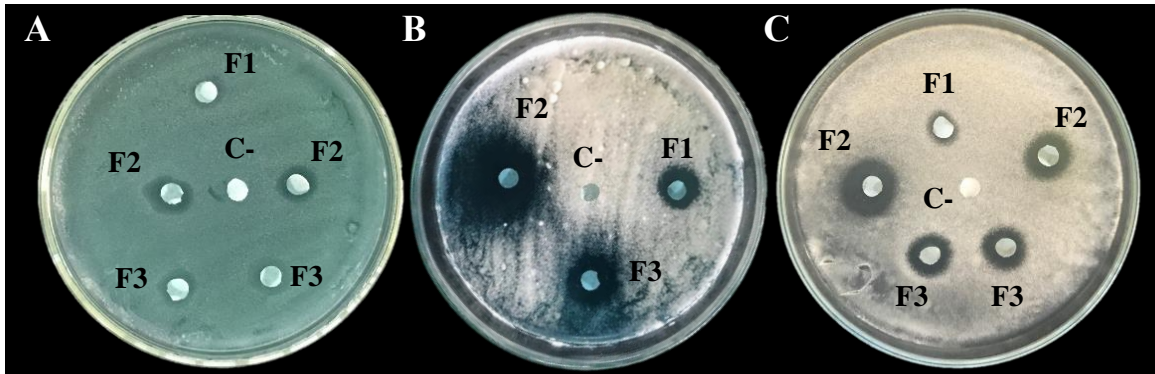


Figura 5. Avaliação dos picos F1, F2 e F3 quanto à atividade de antagonismo. (A) contra *S. cerevisiae* NCYC 1006 (B) contra *P. digitatum*. (C) contra *G. citri-aurantii*. Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. (C-) Controle negativo: H₂O Milli-Q.

A segunda etapa de purificação em coluna de Cellulose (Medium Fibers) resultou na separação de dois picos, denominados de P1 e P2, com tamanhos de bandas em torno de 10 kDa e entre 50 e 70 kDa, respectivamente (Figura 6).

Apenas o pico P1 apresentou atividade *killer* contra os microrganismos (Figura 7).

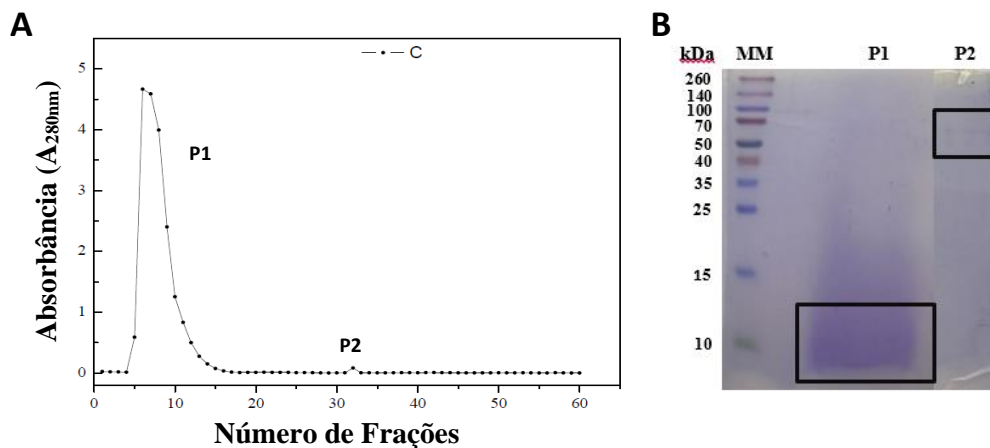


Figura 6. Etapa 2 da purificação da toxina *killer* produzida por *A. pullulans*. (A) Cromatografia em coluna de Cellulose (Medium Fibers) da fração F3. Tampão de eluição citrato (0,01M, pH 4,6). Fluxo contínuo (0,5 mL/min; 1,5mL/tubo). (B) Eletroforese dos picos (P1 e P2) da Cromatografia em coluna de Cellulose. (MM) padrão de massa molecular; Gel de poliacrilamida (15%), tampão Tris-glicina 0,1M, pH=8,3, SDS (0,1%). Condições eletroforéticas: 2h, 20mA, 100V. Gel corado com Azul de Coomassie R-350

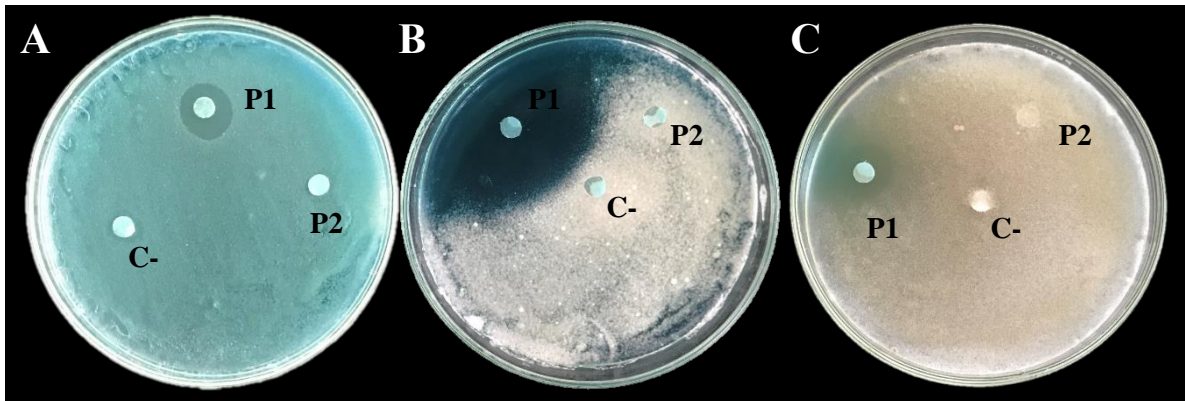


Figura 7. Avaliação dos picos P1 e P2 quanto à atividade de antagonismo. **(A)** contra *S. cerevisiae* NCYC 1006. **(B)** contra *P. digitatum*. **(C)** contra *G. citri-aurantii*. Atividade visualizada através da difusão e formação de halos de inibição. **(C-)** Controle negativo: H₂O Milli-Q.

4.5. Sequenciamento dos fragmentos peptídicos da proteína *killer* por espectrometria de massas

Após o processamento dos dados e a comparação com o banco de dados reverso de *A. pullulans* UNIPROT (49700 proteínas) com taxa de falso positivo da análise igual a 0%, o espectro de massas da proteína isolada nesse estudo se mostrou comum entre ubiquitinas produzidas pelo gênero *Aureobasidium* (Tabela 3). No entanto, não foi possível identificar a massa molecular exata da proteína purificada neste estudo, o que se sabe é que possui pequenas dimensões, em torno de 10 kDa.

Tabela 3. Alinhamento de sequências parciais de fragmentos trópticos do pico P1 purificada de *A. pullulans* com espectros de massas do banco de dados reverso de *A. pullulans* UNIPROT.

Sequência Peptídica do isolado de <i>A. pullulans</i> ACBL-77	Espécies	Código/Base de Dados	Proteína	Massa Molecular (kDa)	Escore
ESTLHLVLR TLSDYNIQK TITLEVESSDTIDNVK LIFAGKQLEDGR SDYNIQK	<i>Aureobasidium melanogenum</i> CBS 110374	A0A074W8H3_9 PEZI	Ubiquitin-domain-containing protein	17,673	1,75
		A0A074W8B5_9 PEZI	Ubiquitina	25,762	1,75
	<i>Aureobasidium namibiae</i> CBS 147.97	A0A074WJN3_9P EZI	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	17,686	1,75
		A0A074X6R1_9P EZI	Ubiquitina	25,762	1,75
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	A0A1A7MPC9_A URPU	Proteína sem nome	17,686	1,75
		A0A1A7MHP2_A URPU	Proteína sem nome	95,991	1,75
	<i>Aureobasidium pullulans</i> EXF-150	A0A074XW09_A URPU	Ubiquitin	25,762	1,75
		A0A074Y4T3_A URPU	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	17,686	1,75
	<i>Aureobasidium subglaciale</i> EXF-2481	A0A074YUM0_9 PEZI	Proteína sem nome	17,673	1,75
		A0A074Z3D8_9P EZI	Proteína sem nome	25,762	1,75

Tabela 4. Sequência e alinhamento dos fragmentos peptídicos da toxina *killer* de *A. pullulans* ACBL-77.

Fragmentação Peptídica do isolado de <i>A. pullulans</i> ACBL-77	Código/Base de Dados	Sequência Peptídica das Proteínas Encontradas no UniProt																																																		
	A0A074W8H3_9PEZI	<table border="0"> <tr> <td>10</td> <td>20</td> <td>30</td> <td>40</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>MQIFVKTLTG</td> <td>KTITLEVESS</td> <td>DTIDNVKSKI</td> <td>QDKEGIPPDQ</td> <td>QRLIFAGKQL</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>70</td> <td>80</td> <td>90</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>EDGRTLSDYN</td> <td>IQKESTLHLV</td> <td>LRLRGGGKKR</td> <td>KKKVYTPPK</td> <td>IKHKRKKTKL</td> </tr> <tr> <td>110</td> <td>120</td> <td>130</td> <td>140</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>AVLKYYKVDG</td> <td>DGKIERLRRE</td> <td>CPSDTCGAGI</td> <td>FMAAMHNRQY</td> <td>CGRCHLTYVF</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>DDPK</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	10	20	30	40	50	MQIFVKTLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	60	70	80	90	100	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGGGKKR	KKKVYTPPK	IKHKRKKTKL	110	120	130	140	150	AVLKYYKVDG	DGKIERLRRE	CPSDTCGAGI	FMAAMHNRQY	CGRCHLTYVF			DDPK																	
10	20	30	40	50																																																
MQIFVKTLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL																																																
60	70	80	90	100																																																
EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGGGKKR	KKKVYTPPK	IKHKRKKTKL																																																
110	120	130	140	150																																																
AVLKYYKVDG	DGKIERLRRE	CPSDTCGAGI	FMAAMHNRQY	CGRCHLTYVF																																																
		DDPK																																																		
<p>ESTLHLVLR TLSDYNIQK TITLEVESSDTIDNVK LIFAGKQLEDGR SDYNIQK</p>	A0A074W8B5_9PEZI	<table border="0"> <tr> <td>10</td> <td>20</td> <td>30</td> <td>40</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>MQIFVKTLTG</td> <td>KTITLEVESS</td> <td>DTIDNVKSKI</td> <td>QDKEGIPPDQ</td> <td>QRLIFAGKQL</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>70</td> <td>80</td> <td>90</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>EDGRTLSDYN</td> <td>IQKESTLHLV</td> <td>LRLRGGMQIF</td> <td>VKTLTGKTIT</td> <td>LEVESSDTID</td> </tr> <tr> <td>110</td> <td>120</td> <td>130</td> <td>140</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>NVKSKIQDKE</td> <td>GIPPDQRLI</td> <td>FAGKQLEDGR</td> <td>TLSDYNIQKE</td> <td>STLHLVLR</td> </tr> <tr> <td>160</td> <td>170</td> <td>180</td> <td>190</td> <td>200</td> </tr> <tr> <td>GGMQIFVKTL</td> <td>TGKTITLEVE</td> <td>SSDTIDNVKS</td> <td>KIQDKEGIPP</td> <td>DQQRLIFAGK</td> </tr> <tr> <td>210</td> <td>220</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>QLEDGRTLSD</td> <td>YNIQESTLH</td> <td>LVLRLRGGQ</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	10	20	30	40	50	MQIFVKTLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	60	70	80	90	100	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGGMQIF	VKTLTGK TIT	LEVESSDTID	110	120	130	140	150	NVKSKIQDKE	GIPPDQ RLI	FAGKQLEDGR	TLSDYNIQKE	STLHLVLR	160	170	180	190	200	GGMQIFVKTL	TGK TITLEVE	SSDTIDNVKS	KIQDKEGIPP	DQ QRLIFAGK	210	220				QLEDGRTLSD	YNIQESTLH	LVLRLRGGQ		
10	20	30	40	50																																																
MQIFVKTLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL																																																
60	70	80	90	100																																																
EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGGMQIF	VKTLTGK TIT	LEVESSDTID																																																
110	120	130	140	150																																																
NVKSKIQDKE	GIPPDQ RLI	FAGKQLEDGR	TLSDYNIQKE	STLHLVLR																																																
160	170	180	190	200																																																
GGMQIFVKTL	TGK TITLEVE	SSDTIDNVKS	KIQDKEGIPP	DQ QRLIFAGK																																																
210	220																																																			
QLEDGRTLSD	YNIQESTLH	LVLRLRGGQ																																																		
	A0A074WJN3_9PEZI	<table border="0"> <tr> <td>10</td> <td>20</td> <td>30</td> <td>40</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>MQIFVKTLTG</td> <td>KTITLEVESS</td> <td>DTIDNVKSKI</td> <td>QDKEGIPPDQ</td> <td>QRLIFAGKQL</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>70</td> <td>80</td> <td>90</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>EDGRTLSDYN</td> <td>IQKESTLHLV</td> <td>LRLRGGGKKR</td> <td>KKKVYTPPK</td> <td>IKHKRKKNKL</td> </tr> <tr> <td>110</td> <td>120</td> <td>130</td> <td>140</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>AVLKYYKVDG</td> <td>DGKIERLRRE</td> <td>CPSDTCGAGI</td> <td>FMAAMHNRQY</td> <td>CGRCHLTYVF</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>DDPK</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	10	20	30	40	50	MQIFVKTLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	60	70	80	90	100	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGGGKKR	KKKVYTPPK	IKHKRKKNKL	110	120	130	140	150	AVLKYYKVDG	DGKIERLRRE	CPSDTCGAGI	FMAAMHNRQY	CGRCHLTYVF			DDPK																	
10	20	30	40	50																																																
MQIFVKTLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL																																																
60	70	80	90	100																																																
EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGGGKKR	KKKVYTPPK	IKHKRKKNKL																																																
110	120	130	140	150																																																
AVLKYYKVDG	DGKIERLRRE	CPSDTCGAGI	FMAAMHNRQY	CGRCHLTYVF																																																
		DDPK																																																		

<p>ESTLHLVLR TLSDYNIQK TITLEVESSDTIDNVK</p>	<p>A0A074X6R1_9PEZI</p>	<p>10 20 30 40 50 MQIFVKTLTG KTITLEVESS DTIDNVKSKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL 60 70 80 90 100 EDGRTLSDYN IQKESTLHLV LRLRGGMQIF VKTLTGKTTIT LEVESSDTID 110 120 130 140 150 NVKSQIQDKE GIPPDQORLI FAGKQLEDGR TLSDYNIQKE STLHLVLR 160 170 180 190 200 GGMQIFVKTL TGKTITLEVE SSDTIDNVKS KIQDKEGIPP DQQRLIFAGK 210 220 QLEDGRTLSD YNIQESTLH LVLRLRGGQ</p>
<p>LIFAGKQLEDGR SDYNIQK</p>	<p>A0A1A7MPC9_AURPU</p>	<p>10 20 30 40 50 MQIFVKTLTG KTITLEVESS DTIDNVKSKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL 60 70 80 90 100 EDGRTLSDYN IQKESTLHLV LRLRGGGKKR KKKVYTTPKK IKHKRKKKNL 110 120 130 140 150 AVLKYYKVDG DGKIERLRRE CPSDTCGAGI FMAAMHNRQY CGRCHLTYVF DDPK</p>

<p style="text-align: center;">ESTLHLVLR TLSDYNIQK TITLEVESSDTIDNVK LIFAGKQLEDGR SDYNIQK</p>	<p style="text-align: center;">A0A1A7MHP2_AURPU</p>	<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; text-align: right;">10</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">20</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">30</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">40</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">50</td> </tr> <tr> <td>MQIFVKTLTG</td> <td>KTITLEVESS</td> <td>DTIDNVKSKI</td> <td>QDKEGIPPDQ</td> <td>QRLIFAGKQL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">60</td> <td style="text-align: right;">70</td> <td style="text-align: right;">80</td> <td style="text-align: right;">90</td> <td style="text-align: right;">100</td> </tr> <tr> <td>EDGRTLSDYN</td> <td>IQESTLHLV</td> <td>LRLRGGMQIF</td> <td>VKTLTGKTTIT</td> <td>LEVESSDTID</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">110</td> <td style="text-align: right;">120</td> <td style="text-align: right;">130</td> <td style="text-align: right;">140</td> <td style="text-align: right;">150</td> </tr> <tr> <td>NVKSQIQDKE</td> <td>GIPPDQORLI</td> <td>FAGKQLEDGR</td> <td>TLSDYNIQKE</td> <td>STLHLVLR</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">160</td> <td style="text-align: right;">170</td> <td style="text-align: right;">180</td> <td style="text-align: right;">190</td> <td style="text-align: right;">200</td> </tr> <tr> <td>GGMQIFVKTL</td> <td>TGKTITLEVE</td> <td>SSDTIDNVKS</td> <td>KIQDKEGIPP</td> <td>DQORLIFAGK</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">210</td> <td style="text-align: right;">220</td> <td style="text-align: right;">230</td> <td style="text-align: right;">240</td> <td style="text-align: right;">250</td> </tr> <tr> <td>QLEDGRTLSD</td> <td>YNIQESTLH</td> <td>LVLRLRGDST</td> <td>TDIFKSAFPA</td> <td>HRTSKNITHD</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">260</td> <td style="text-align: right;">270</td> <td style="text-align: right;">280</td> <td style="text-align: right;">290</td> <td style="text-align: right;">300</td> </tr> <tr> <td>LRHKHSPRTS</td> <td>LDDSAAAKSR</td> <td>PPSAHGNALL</td> <td>LPERNLALKE</td> <td>PASPTIPPHK</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">310</td> <td style="text-align: right;">320</td> <td style="text-align: right;">330</td> <td style="text-align: right;">340</td> <td style="text-align: right;">350</td> </tr> <tr> <td>ASSEATRDRW</td> <td>RYGPVTVESI</td> <td>DMEANKTPSS</td> <td>GLHTKAVYVP</td> <td>SAPKATDVGW</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">360</td> <td style="text-align: right;">370</td> <td style="text-align: right;">380</td> <td style="text-align: right;">390</td> <td style="text-align: right;">400</td> </tr> <tr> <td>GVVHLYRDSQ</td> <td>ETAALHSLA</td> <td>KEDVDFDPQQ</td> <td>CNTLCILAVP</td> <td>SWMMPSDLLG</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">410</td> <td style="text-align: right;">420</td> <td style="text-align: right;">430</td> <td style="text-align: right;">440</td> <td style="text-align: right;">450</td> </tr> <tr> <td>FVGDQAREDV</td> <td>SHFRLIRTGR</td> <td>ANKYMLMKF</td> <td>RQAKKAREWQ</td> <td>KLWNGKLFSA</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">460</td> <td style="text-align: right;">470</td> <td style="text-align: right;">480</td> <td style="text-align: right;">490</td> <td style="text-align: right;">500</td> </tr> <tr> <td>MEPENCHVVF</td> <td>IKSVEFLTPD</td> <td>SDISDPSAFP</td> <td>QNTQDPFTKT</td> <td>STTLAKPHA</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">510</td> <td style="text-align: right;">520</td> <td style="text-align: right;">530</td> <td style="text-align: right;">540</td> <td style="text-align: right;">550</td> </tr> <tr> <td>PPTPSLVLP</td> <td>TCPVCLERMD</td> <td>ETTGLLTILC</td> <td>QHVFHCACLE</td> <td>KWRGSGCPVC</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">560</td> <td style="text-align: right;">570</td> <td style="text-align: right;">580</td> <td style="text-align: right;">590</td> <td style="text-align: right;">600</td> </tr> <tr> <td>RYTQSPSFTF</td> <td>PYPRPGHNGV</td> <td>EADVEPACTI</td> <td>CAATTNLWIC</td> <td>LICGNTGCGR</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">610</td> <td style="text-align: right;">620</td> <td style="text-align: right;">630</td> <td style="text-align: right;">640</td> <td style="text-align: right;">650</td> </tr> <tr> <td>YDSAHAFAHW</td> <td>ESTSHCYAMD</td> <td>INSQHVWDYA</td> <td>GDGYVHRLIQ</td> <td>NKPDSKLIDL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">660</td> <td style="text-align: right;">670</td> <td style="text-align: right;">680</td> <td style="text-align: right;">690</td> <td style="text-align: right;">700</td> </tr> <tr> <td>PARRHPNAAF</td> <td>RAEAEDSVPR</td> <td>EKMENMANEY</td> <td>TYLLTSQLDS</td> <td>QRRYEDQLE</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">710</td> <td style="text-align: right;">720</td> <td style="text-align: right;">730</td> <td style="text-align: right;">740</td> <td style="text-align: right;">750</td> </tr> <tr> <td>RAVDKASTAS</td> <td>ARAEASRAA</td> <td>TTLANEMAAL</td> <td>RVENKEYAAA</td> <td>MARIEKSIEK</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">760</td> <td style="text-align: right;">770</td> <td style="text-align: right;">780</td> <td style="text-align: right;">790</td> <td style="text-align: right;">800</td> </tr> <tr> <td>AANRADKFEK</td> <td>MARDMSSQLR</td> <td>EKTMNEGLL</td> <td>QRIHAAEAKA</td> <td>KESQHEAEKM</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">810</td> <td style="text-align: right;">820</td> <td style="text-align: right;">830</td> <td style="text-align: right;">840</td> <td style="text-align: right;">850</td> </tr> <tr> <td>KAEKADLEEM</td> <td>NHDLTMFISS</td> <td>QEKVKELQAQ</td> <td>GEEVIDGSAF</td> <td>APEQQPQQGR</td> </tr> <tr> <td colspan="5" style="text-align: center;">KKGKGGKK</td> </tr> </table>	10	20	30	40	50	MQIFVKTLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	60	70	80	90	100	EDGRTLSDYN	IQESTLHLV	LRLRGGMQIF	VKTLTGKTTIT	LEVESSDTID	110	120	130	140	150	NVKSQIQDKE	GIPPDQORLI	FAGKQLEDGR	TLSDYNIQKE	STLHLVLR	160	170	180	190	200	GGMQIFVKTL	TGKTITLEVE	SSDTIDNVKS	KIQDKEGIPP	DQORLIFAGK	210	220	230	240	250	QLEDGRTLSD	YNIQESTLH	LVLRLRGDST	TDIFKSAFPA	HRTSKNITHD	260	270	280	290	300	LRHKHSPRTS	LDDSAAAKSR	PPSAHGNALL	LPERNLALKE	PASPTIPPHK	310	320	330	340	350	ASSEATRDRW	RYGPVTVESI	DMEANKTPSS	GLHTKAVYVP	SAPKATDVGW	360	370	380	390	400	GVVHLYRDSQ	ETAALHSLA	KEDVDFDPQQ	CNTLCILAVP	SWMMPSDLLG	410	420	430	440	450	FVGDQAREDV	SHFRLIRTGR	ANKYMLMKF	RQAKKAREWQ	KLWNGKLFSA	460	470	480	490	500	MEPENCHVVF	IKSVEFLTPD	SDISDPSAFP	QNTQDPFTKT	STTLAKPHA	510	520	530	540	550	PPTPSLVLP	TCPVCLERMD	ETTGLLTILC	QHVFHCACLE	KWRGSGCPVC	560	570	580	590	600	RYTQSPSFTF	PYPRPGHNGV	EADVEPACTI	CAATTNLWIC	LICGNTGCGR	610	620	630	640	650	YDSAHAFAHW	ESTSHCYAMD	INSQHVWDYA	GDGYVHRLIQ	NKPDSKLIDL	660	670	680	690	700	PARRHPNAAF	RAEAEDSVPR	EKMENMANEY	TYLLTSQLDS	QRRYEDQLE	710	720	730	740	750	RAVDKASTAS	ARAEASRAA	TTLANEMAAL	RVENKEYAAA	MARIEKSIEK	760	770	780	790	800	AANRADKFEK	MARDMSSQLR	EKTMNEGLL	QRIHAAEAKA	KESQHEAEKM	810	820	830	840	850	KAEKADLEEM	NHDLTMFISS	QEKVKELQAQ	GEEVIDGSAF	APEQQPQQGR	KKGKGGKK				
		10	20	30	40	50																																																																																																																																																																											
		MQIFVKTLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL																																																																																																																																																																											
		60	70	80	90	100																																																																																																																																																																											
		EDGRTLSDYN	IQESTLHLV	LRLRGGMQIF	VKTLTGKTTIT	LEVESSDTID																																																																																																																																																																											
		110	120	130	140	150																																																																																																																																																																											
		NVKSQIQDKE	GIPPDQORLI	FAGKQLEDGR	TLSDYNIQKE	STLHLVLR																																																																																																																																																																											
		160	170	180	190	200																																																																																																																																																																											
		GGMQIFVKTL	TGKTITLEVE	SSDTIDNVKS	KIQDKEGIPP	DQORLIFAGK																																																																																																																																																																											
		210	220	230	240	250																																																																																																																																																																											
		QLEDGRTLSD	YNIQESTLH	LVLRLRGDST	TDIFKSAFPA	HRTSKNITHD																																																																																																																																																																											
		260	270	280	290	300																																																																																																																																																																											
		LRHKHSPRTS	LDDSAAAKSR	PPSAHGNALL	LPERNLALKE	PASPTIPPHK																																																																																																																																																																											
		310	320	330	340	350																																																																																																																																																																											
		ASSEATRDRW	RYGPVTVESI	DMEANKTPSS	GLHTKAVYVP	SAPKATDVGW																																																																																																																																																																											
		360	370	380	390	400																																																																																																																																																																											
		GVVHLYRDSQ	ETAALHSLA	KEDVDFDPQQ	CNTLCILAVP	SWMMPSDLLG																																																																																																																																																																											
		410	420	430	440	450																																																																																																																																																																											
		FVGDQAREDV	SHFRLIRTGR	ANKYMLMKF	RQAKKAREWQ	KLWNGKLFSA																																																																																																																																																																											
		460	470	480	490	500																																																																																																																																																																											
MEPENCHVVF	IKSVEFLTPD	SDISDPSAFP	QNTQDPFTKT	STTLAKPHA																																																																																																																																																																													
510	520	530	540	550																																																																																																																																																																													
PPTPSLVLP	TCPVCLERMD	ETTGLLTILC	QHVFHCACLE	KWRGSGCPVC																																																																																																																																																																													
560	570	580	590	600																																																																																																																																																																													
RYTQSPSFTF	PYPRPGHNGV	EADVEPACTI	CAATTNLWIC	LICGNTGCGR																																																																																																																																																																													
610	620	630	640	650																																																																																																																																																																													
YDSAHAFAHW	ESTSHCYAMD	INSQHVWDYA	GDGYVHRLIQ	NKPDSKLIDL																																																																																																																																																																													
660	670	680	690	700																																																																																																																																																																													
PARRHPNAAF	RAEAEDSVPR	EKMENMANEY	TYLLTSQLDS	QRRYEDQLE																																																																																																																																																																													
710	720	730	740	750																																																																																																																																																																													
RAVDKASTAS	ARAEASRAA	TTLANEMAAL	RVENKEYAAA	MARIEKSIEK																																																																																																																																																																													
760	770	780	790	800																																																																																																																																																																													
AANRADKFEK	MARDMSSQLR	EKTMNEGLL	QRIHAAEAKA	KESQHEAEKM																																																																																																																																																																													
810	820	830	840	850																																																																																																																																																																													
KAEKADLEEM	NHDLTMFISS	QEKVKELQAQ	GEEVIDGSAF	APEQQPQQGR																																																																																																																																																																													
KKGKGGKK																																																																																																																																																																																	

<p>ESTLHLVLR TLSDYNIQK TITLEVESSDTIDNVK LIFAGKQLEDGR SDYNIQK</p>	A0A074XW09_AURPU	<p>10 20 30 40 50</p> <p>MQIFVKTLTG KTITLEVESS DTIDNVKSKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL 60 70 80 90 100</p> <p>EDGRTLSDYN IQESTLHLV LRLRGGMQIF VKTLTGKTTIT LEVESSDTID 110 120 130 140 150</p> <p>NVSKIQDKE GIPPDQORLI FAGKQLEDGR TLSDYNIQKE STLHLVLRLR 160 170 180 190 200</p> <p>GGMQIFVKTL TGKTITLEVE SSDTIDNVKS KIQDKEGIPP DQORLIFAGK 210 220</p> <p>QLEDGRTLSD YNIQESTLH LVLRLRGGQ</p>
	A0A074Y4T3_AURPU	<p>10 20 30 40 50</p> <p>MQIFVKTLTG KTITLEVESS DTIDNVKSKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL 60 70 80 90 100</p> <p>EDGRTLSDYN IQESTLHLV LRLRGGGKKR KKKVYTTPKK IKHKRKKKTKL 110 120 130 140 150</p> <p>AVLKYYKVDG DGKIERLRRE CPSDTCGAGI FMAAMHNRQY CGRCHLTYVF DDPK</p>
	A0A074YUM0_9PEZI	<p>10 20 30 40 50</p> <p>MQIFVKTLTG KTITLEVESS DTIDNVKSKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL 60 70 80 90 100</p> <p>EDGRTLSDYN IQESTLHLV LRLRGGGKKR KKKVYTTPKK IKHKRKKTKL 110 120 130 140 150</p> <p>AVLKYYKVDG DGKIERLRRE CPSDTCGAGI FMAAMHNRQY CGRCHLTYVF DDPK</p>
	A0A074Z3D8_9PEZI	<p>10 20 30 40 50</p> <p>MQIFVKTLTG KTITLEVESS DTIDNVKSKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL 60 70 80 90 100</p> <p>EDGRTLSDYN IQESTLHLV LRLRGGMQIF VKTLTGKTTIT LEVESSDTID 110 120 130 140 150</p> <p>NVSKIQDKE GIPPDQORLI FAGKQLEDGR TLSDYNIQKE STLHLVLRLR 160 170 180 190 200</p> <p>GGMQIFVKTL TGKTITLEVE SSDTIDNVKS KIQDKEGIPP DQORLIFAGK 210 220</p> <p>QLEDGRTLSD YNIQESTLH LVLRLRGGQ</p>

DISCUSSÃO

A busca por espécies de microrganismos antagonistas que fazem parte da microbiota superficial de frutas e vegetais tem aumentado devido a sua eficácia no biocontrole de doenças de pós-colheita de frutos. Um desses microrganismos é a levedura *A. pullulans*, um saprófito difundido e bem adaptado, considerado como um possível agente de controle biológico (MARI et al., 2012).

Em estudos recentes, Ferraz et al. (2016) isolaram diversas leveduras de folhas, flores e frutos cítricos, dentre essas, a cepa de *A. pullulans* ACBL-77, a qual foi isolada de folhas de Tangor Murcott, em pomar localizado no município de Colina/São Paulo. Tal isolado de levedura se mostrou eficaz para o biocontrole da podridão azeda em laranjas 'Pera', com uma porcentagem de controle de 91%. Segundo os autores, um dos possíveis mecanismos de ação desse microrganismo seria a produção de toxina *killer* que mata células sensíveis à toxina.

Dando início aos estudos do perfil proteico de *A. pullulans* procurou-se saber sobre atividade proteolítica, de β -1,3-glucanase e quitinase, por estarem essas enzimas relacionadas ao fator *killer*.

A produção de enzimas proteolíticas foi identificada em diversos tipos de microrganismos como *Thermomyces lanuginosus* (JENSEN et al., 2002), *Aspergillus* sp. (CORAL et al., 2003; TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2003), *Penicillium* sp. (GERMANO et al., 2003; HASHEM, 2000), *Mucor* spp. (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000) e *Rhizopus oryzae* (KUMAR et al., 2005). Buzzini e Martini (2002) verificaram a atividade enzimática proteolítica extracelular de microrganismos leveduriformes, como exemplo, a *Pseudozyma antarctica*.

Estudos demonstraram atividade antifúngica de enzimas proteolíticas no biocontrole de patógenos de pós-colheitas de maçãs e pêssegos (ZHANG et al., 2012)

Em um estudo de Gostincar et al. (2014), tanto peptidases como proteases foram identificadas bioquímica e funcionalmente como sendo produzidas por *A. pullulans*. Num estudo *in silico*, pode-se observar no secretoma de diferentes subespécies de *A. pullulans* a presença de diferentes peptidases, como serina-peptidases, metalo-proteases, cisteína-proteases e treonina-proteases caracterizadas com massa molecular relativa de, aproximadamente, 30 kDa. Pode-se observar pelo perfil eletroforético do extrato proteico de *A. pullulans* ACBL-77, a presença de bandas com massa molecular semelhante.

As β -glucanases são enzimas multifuncionais que hidrolisam polissacarídeos como a celulose, podendo também degradar as β -glucanas, participando assim, diretamente do processo de controle biológico, uma vez que, hidrolisam β -1,3 e β -1,6-glucanas, constituintes da parede celular de alguns patógenos (FLEURI; SATO, 2008; IORIO et al., 2008). Muitos fungos filamentosos e leveduriformes são produtores de β -1,3-glucanases extracelulares, produzindo-as constitutivamente ou indutivamente, como a *A. pullulans* 1WA1 (BAUERMEISTER et al., 2017) podendo também ser encontradas associadas à parede celular ou, somente no interior da célula.

Assim como as quitinases e outras hidrolases, as β -glucanases também estão associadas com a quebra de ligações intra e inter poliméricas dos constituintes da parede celular de microrganismos, bem como com o alongamento destes polímeros através de reações de síntese reversa (RAST et al., 2003).

Em um estudo realizado por Bauermeister et al. (2015), os autores identificaram (na microbiota de uvas) leveduras com potencial para a produção das enzimas β -1,3-glucanase e β -glicosidase, sendo *A. pullulans* a cepa que mais produziu tais enzimas. A cepa de *A. pullulans* ACBL-77 estudada neste trabalho também é capaz de produzir β -1,3-glucanase, como observado nos dados da tabela 2.

Com relação às quitinases, tais enzimas hidrolisam ligações β -1,4-N-acetilglicosamina, degradando a quitina, componente presente na parede celular de fungos filamentosos (SEIDL, 2008). Segundo alguns autores, dentre as proteínas secretadas por *A. pullulans*, encontram-se as quitinases e, essas podem estar relacionadas com atividade antagônica (ZHANG et al., 2012; GOSTINCAR et al., 2014).

No respectivo estudo, a atividade quitinolítica no precipitado proteico (Tabela 2) apresentou valores menores, com menor expressão ou, secreção pelo microrganismo, quando comparado com a atividade de β -1,3-glucanase. A baixa atividade pode ser atribuída à baixa capacidade de secreção, ao direcionamento da produção ao metabolismo intracelular ou à insuficiência dos métodos de detecção (MACCHERONI JR. et al., 2004).

Após o estudo sobre o perfil proteico da levedura, foi realizado o processo de purificação da toxina *killer* em duas etapas, resultando na primeira etapa de 3 picos (F1, F2 e F3) que apresentaram atividade *killer* contra os três microrganismos testados, onde o pico F3, apresentou uma menor quantidade de bandas de proteína e foi escolhido como amostra para a segunda etapa que, resultou, portanto, em mais dois picos, onde apenas um deles (P1)

apresentou atividade *killer*, seguindo, portanto, para a identificação da proteína por espectrometria de massas.

Pela espectrometria de massas, foi identificada uma sequência de peptídeos com similaridade com ubiquitina, que segundo o banco de dados reverso de *Aureobasidium pullulans* UNIPROT pode ser produzida por esse gênero de levedura. Entretanto, as identificações parecem ser *borderline hits*, quando compara-se o escore da análise com os limites de confiança citados por Cantú et al. (2008), sendo $Xcorr > 3,75$ para peptídeos com carga +3; $Xcorr > 2,2$ para peptídeos com carga +2 e $Xcorr > 1,9$ para peptídeos com carga +1, merecendo assim, uma confirmação futura (Tabelas 3 e 4).

A ubiquitina não é tão comumente descrita como toxina *killer*, como a protease, β -1,3-glucanase ou quitinase. Segundo Pickart e Eddins (2004), as ubiquitinas são proteínas produzidas por organismos eucariotos, possuindo estruturas com pequenas dimensões, porém, com seqüências variáveis.

A forma com que a ubiquitina-like isolada neste trabalho age no controle dos fitopatógenos ainda não foi elucidada, entretanto De Ingeniis et al. (2009) descobriram uma toxina *killer* que denominaram “Pikt”, uma ubiquitina produzida pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) DBVPG 3003, com atividade antifúngica contra *Dekkera/Brettanomyces* sp. que interage com o receptor β -1,6-D-glucano constituinte da parede celular de seus alvos sensíveis.

Embora não tenham sido purificadas β -1,3-glucanases ou quitinases neste trabalho, elas estão presentes entre as proteínas produzidas pela levedura estudada. O que pode sugerir que todas as proteínas, inclusive as ubiquitinas, possam estar agindo de maneira sinérgica, uma vez que, proteínas de alto e baixo peso molecular apresentaram atividade *killer* contra os microrganismos testados, proporcionando, assim, um biocontrole mais efetivo.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que;

- a) No estudo de obtenção de proteína *killer* e enzimas extracelulares da levedura *A. pullulans* ACBL-77, fermentada em meio de cultura YEPD, o melhor resultado (41 mg/mL) foi obtido quando se utilizou como agente precipitante o etanol na proporção 2:1 (v/v),
- b) A levedura *A. pullulans* ACBL-77 produz protease, β -1,3-glucanase e quitinase extracelulares;
- c) A toxina *killer* de *A. pullulans* ACBL-77 purificada por cromatografia em coluna de Sephadex G75 e Cellulose (Medium Fibers) e analisada por espectrometria de massa (LC-MS^E) molecular é uma proteína de baixa massa molecular pertencente à família das ubiquitinas, com ação significativa no controle dos fitopatógenos de pós-colheita de citros, *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALOUÏ, H.; LICCIARDELLO, F.; KHWALDIA, K.; HAMDI, M.; RESTUCCIA, C. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **International Journal Food Microbiology**, v. 200, p. 22–30, 2015.
- BAUERMEISTER A.; AMADOR, I.R.; PRETTI, C.P.; GIESE, E.C.; OLIVEIRA, A.L. β -(1 \rightarrow 3)-glucanolytic yeasts from Brazilian grape microbiota: production and characterization of β -glucanolytic enzymes by *Aureobasidium pullulans* 1WA1 cultivated on fungal mycelium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 63, p. 269-278, 2015.
- BAUERMEISTER, A.; GIESE, E.C.; BORSATO, D.; REZENDE, M.I.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Filamentous fungal biomass as inducer of extracellular β -1,3-glucanases and β -glucosidases by *Aureobasidium pullulans* 1WA1. **EC Microbiology**, v. 54, p. 138-147, 2017.
- BENCHEQROUN, S. K.; BAJJI, M.; MASSART, S.; LABHILILI, M.; JAAFARI, S. E.; JIJAKLI, M. H. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. **Postharvest Biology and Technology**, v.46, p.128–135, 2007.
- BENITEZ, J.A.; SILVA, A.J.; FINKELSTEIN, R.A. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholera*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6549–6553, 2001.
- BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **International Conference on Genetics**, v.1, p. 202-212, 1963.
- BROWN, G.E.; ECKERT, J.W. Diplodia stem-end rot. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.) **Compendium of citrus diseases**. 2 ed. Saint Paul: APS Press, p. 43-44, 2000.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 1020-1025, 2002.
- BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; VAUGHANMARTINI, A. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. **FEMS Yeast Research**, v.7, p.749-760, 2007.
- CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
- CASTORIA, R.; CAPUTO, L.; DE CURTIS, F.; DE CICCO, V. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. **Phytopathology**, v. 93, p. 564-572, 2003.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonistic of postharvest pathogens of 78 fruits: study on its mode of action. **Postharvest Biology and Technology**, v. 22, p. 7-17, 2001.

CERTIK, M.; BREIEROVA, E.; JURSIKOVA, P. Effect of cadmium on lipid composition of *Aureobasidium pullulans* grown with added extracellular polysaccharides. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, p. 195–202, 2005.

CHENG, K. C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J. M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 29–44, 2011

CHI, Z.; WANG, F.; CHI, Z.; YUE, L.; LIU, G.; ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 793–804, 2009.

CHI, Z.; LIU, G.; ZHAO, S.; LI, J.; PENG, Y. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1227–1241, 2010.

COELHO, A. R.; HOFFMANN, F. L.; HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 37-358, 2003.

COHEN, E.; COGGINS, C.W.; ECKERT, J.W. Predisposition of citrus fruits to sour rot when submerged in water. **Plant Disease**, v. 75, p. 166-168, 1991.

COOKE, W. B. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. **Mycopathology and Mycology Applied**, v. 12, p. 1–45, 1959.

CORAL, G.; ARIKAN, B.; UNALDI, M.N.; GUVENMEZ, H. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. **Annals of Microbiology**, v. 53, p. 491-498, 2003.

CUNHA, T.; FERRAZ, L.P.; WEHR, P.P.; KUPPER, K.C. Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 276, p. 20-27, 2018.

D'AQUINO, S.; ANGIONI, A.; SUMING, D.; PALMA, A.; SCHIRRA, M. Residue levels, persistence and effectiveness of imazalil against a resistant strain of *Penicillium digitatum* when applied in combination with heat and sodium bicarbonate. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 78, p. 139-49, 2013.

DAVIS, L. L.; BAUDOIN, A. B. A. M. Effect of osmotic potential on *Geotrichum candidum*: growth, polygalacturonase production, and polygalacturonase action. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 28, p. 53-60, 1986.

DE INGENIIS, J.; RAFFAELLI, N.; CIANI, M.; MANNAZZU, I. *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1129–1134, 2009.

- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D.; WILSON, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, p.137–145, 2009.
- ECKERT, J.W.; BROWN, G.E. Sour rot. In: Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (Eds.), **Compendium of Citrus Diseases**. APS Press, St Paul MN, p. 37-38, 1988.
- EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Candida oleophila* strain O. **European Food Safety Authority Journal**, v. 10, p. 2944, 2012.
- EL-MEHALAWY, A.A. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*, **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 6, p. 310–316, 2004.
- EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **The Mycological Society of Japan and Springer**, v. 47, p. 25-35, 2006.
- FENG, L.; WU, F.; LI, J.; JIANG, Y.; DUAN, X. Antifungal activities of *Polyhexamethylene biguanide* and *Polyhexamethylene guanide* against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 61, p. 160–164, 2011.
- FERRAZ, L.P.; CUNHA, T.; SILVA, A.L.; KUPPER, K.C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v. 188, p. 72–79, 2016.
- FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, p. 243-256, 1998.
- FISCHER, I.H.; LOURENÇO, A.S.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p. 219-226, 2008.
- FISCHER, I.H.; PALHARINI, M.C.A.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em laranja ‘Pêra’ produzida em sistema orgânico e convencional e resistência de *Penicillium digitatum* a fungicidas. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 28-34, 2013.
- FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1224-1231, 2008.
- FRANZEN, A. J.; SOUZA, W.; FARINA, M.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S. Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, p. 395-402, 1999.
- FUNDECITRUS. Citricultor. 2018. Disponível em:<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/revista/revista-45/54#page/12> (Acesso em 20 November 2018).

GAUR, R.; SINGH, R.; GUPTA, M.; GAUR, M. K. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. **African Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 7989-7997, 2010.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C.A.; ROCHA, S.N.; SOCCOL, C.R. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003.

GOLDSTEIN, G.; SCHEID, M.; HAMMERLING, U.; SCHLESINGER, D. H.; NIALL, H. D.; BOYSE, E. A. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 11–15, 1975.

GOLUBEV, W. I.; PFEIFFER, I.; GOLUBEVA, E. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. **Fems Microbiology Ecology**, v. 40, p. 151-157, 2002.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GOSTINCAR, C.; OHM, R. A.; KOGEJ, T.; SONJAK, S.; TURK, M.; ZAJC, J.; ZALAR, P.; GRUBE, M.; SUN, H.; HAN, J.; SHARMA, A.; CHINIQUY, J.; NGAN, C. Y.; LIPZEN, A.; BARRY, K.; GRIGORIEV, I. V.; GUNDE-CIMERMAN, N. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. **BMC Genomics**, v.15, p. 549, 2014.

GOTO, K.; IWASE, T.; KICHISE, K.; KITANO, K.; TOTSUKA, A.; OBATA, T.; HARA, S. Isolation and properties of a chromosome dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 505-509, 1990.

GRZEGORCZYK, M.; ZAROWSKA, B.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. **Food Microbiology**, v. 61, p. 93-101, 2017.

HASHEM, A.M. Purification and properties of a milk-clotting enzymes produced by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 75, p.219-222, 2000.

IKAI, K.; TAKESAKO, K.; SHIOMI, K.; MORIGUCHI, M.; UMEDA, Y.; YAMAMOTO, J.; KATO, I.; NAGANAWA, H. Structure of Aureobasidin A. **The Journal of Antibiotics**, v. 44, p. 925-933, 1991.

IORIO, E.; TOROSANTUCCI, A.; BROMURO, C.; CHIANI, P.; FERRETTI, A.; GIANNINI, M.; CASSONE, A.; PODO, F. *Candida albicans* cell wall comprises a branched β -D-(1,6)-glucan with β -D-(1,3)-side chains. **Carbohydrate Research**. v. 343, p. 105-1061, 2008.

ISMAIL, M.; ZHANG, J. Post-harvest citrus diseases and their control. **Outlooks on Pest Management**, v. 15, p. 29–35, 2004.

IPPOLITO, A.; GHAOUTH, A.E.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p. 265–272, 2000.

IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; PENTIMONE, I.; NIGRO, F. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, p. 245–252, 2005.

ISMAIL, M.; ZHANG, J. Postharvest citrus diseases and their control. **Outlooks on pest management**, p. 29-35, 2004.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; YUCELIS, A. Identification and killer activity of yeasts contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. **Food Microbiology**, v.14, p. 125-131, 1997.

İZGÜ, F.; ALTINBAY, D. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo- β -1,3-glucanase. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 68, p. 685-693. 2004.

IZGU, F.; ALTINBAY, D.; ACUN, T. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its β -1,3,-glucanase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 669-676, 2006.

IZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; SERTKAYA, A. Enzymic activity of the K5-Type yeast killer toxin and its characterization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 2200-2206, 2005.

JENSEN, B.; NEBELONG, P.; OLSEN, J.; REELEY, M. Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnology Letters**. v. 1, p. 41–45, 2002.

KAGIYAMA, S.; AIBA, T.; KADOWAKI, K.; MOGI, K. New killer toxins of halophilic *Hansenula anomala*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 52, p. 1-7, 1988.

KELLERMAN, M.; LIEBENBERGET, E.; NJOMBOLWANA, N.; ERASMUS, A.; FOURIE, P.H. Postharvest dip, drench and wax coating application of pyrimethanil on citrus fruit: Residue loading and green mould control. **Crop Protection**, v. 103, p. 115-129, 2018.

KEPEKÇI, R.A. **Antifungal spectrum determination of the K5 type yeast killer protein of fungi causing spoilage in citrus fruits**. Dissertação de mestrado. Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University (METU), Ankara, Turkey, 2006.

KIM, B. S.; LEE, D. W. Antimicrobial Cyclic Peptides for Plant Disease Control. **Plant Pathology Journal**, v. 31, p. 1-11, 2015.

KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. v.2: Doenças das Plantas Cultivadas. 3ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 774.

KITAGAWA, H.; KAWADA, K. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. Proceedings of the **Florida State Horticultural Society**, v. 97, p. 133-135, 1984.

KUMAR, S.; SHARMA, N.S.; SAHARAM, M.R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, p. 5-15, 2005.

LABBANI, F. Z. K.; TURCHETTI, B.; BENNAMOUN, L.; DAKHMOUCHE, S.; ROBERTI, R.; CORAZZI, L.; MERAIHI, Z.; BUZZINI, P. A novel *killer* protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts. **Ant van Leeuwenhoek**. v. 107, p. 961-970, 2015.

LAHLALI, R.; HAMADI, Y. E.L.; GUILLI, M.; JIJAKLI, M.H. Efficacy assessment of *Pichia guilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in Morocco under the influence of temperature and relative humidity. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 56, p. 217–224, 2011.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias em citros. In: ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F.X.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas frutíferas**, Viçosa, v. 2, p. 141-214, 2002.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLLETA FILHO, H.D. Fungos, procaríotos e doença abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, cap. 18, p. 509-566, 2005.

LEATHERS, T. D.; RICH, J.O.; ANDERSON, M.A.; MANITCHOTIPISIT, P. Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 1701-1706, 2013.

LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERMO, M. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 10, p. 169-178, 1997.

LIU, X.; WANG, J.; GOU, P.; MAO, C.; ZHU, Z.-R.; LI, H. In vitro inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p.223-229, 2007.

LIU, X.; WANG, L.P.; LI, Y.C.; LI, H.Y.; YU, T.; ZHENG, X.D. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo. **Journal Applied of Microbiology**, v.107, p.1450–1456, 2009.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. Thermophilic Fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, p. 461-488. 2000.

MAQUEDA, M.; ZAMORA, E.; RODRÍGUEZ-COUSIÑO, N.; RAMÍREZ, M. Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. **Food Microbiology**, v. 27, p. 205–209, 2010.

MARI, M.; GRIFFITH, J.; RIETER, E.; KRISHNAPPA, L.; KLIONSKY, D.J.; REGGIORI, F. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. **Journal of Cell Biology**, v. 190, p. 1005-1022, 2010.

MARI, M.; MARTINI, C.; SPADONI, A.; ROUISSI, W.; BERTOLINI, P. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 73, p. 56–62, 2012.

McKAY, A.H.; FOSTER, H.; ADASKAVEG, J. Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. **Plant Disease**, v. 96, p. 235-242, 2012.

MEINHARDT, F.; KLASSEN, F. Yeast killer toxins: fundamentals and applications *In* ANKE T, WEBER D (ed), Physiology and Genetics, 1st Edition, The Mycota XV. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, v. 549, p. 107-130, 2009.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MORETTO, C.; CERVANTES, A.L.L.; FILHO, A.B.; KUPPER, K.C. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 165, p. 433–438, 2014.

MUCCILLI, S.; WEMHOFF, S.; RESTUCCIA, C.; MEINHARDT, F. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. **Yeast**, v. 30, p. 33–43, 2013.

NATURDATA, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud (1918) <http://naturdata.com/Aureobasidium-pullulans-38082.htm>, acessado em 14/01/2016.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G. **Anuário da citricultura**, 1ª Ed. Citrus BR, São Paulo, 2017.

NG, T. B.; LAM, S. K.; CHAN, S. Y. A ubiquitin-like peptide from the mushroom *Pleurotus sajor-caju* exhibits relatively potent translation-inhibitory and ribonuclease activities. **Peptides**, v. 23, p. 1361–1365, 2002.

PALOU, L.; VALENCIA-CHAMORRO, S.A.; PÉREZ-GAGO, M.B. Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit: a review. **Coatings**, v. 5, p. 962-986, 2015.

PALPACELLI, V.; CIANI, V.; ROSSINI, G. Activity of different *killer* yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. **FEMS Microbiology Letters**, v. 8, p. 68-75, 1991.

PARAWIRA, W. The status and trends in food, industrial and environmental biotechnology research in Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1377-1384, 2008.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

PEREZ, M.F.; CONTRERAS, L.; GARNICA, N.M.; FERNÁNDEZ-ZENOFF, M.V.; FARIÁS, M.E.; SEPULVEDA, M.; RAMALLO, J.; DIB, J.R. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. **Plos One**, p. 1-21.

PICKART, C. M.; EDDINS, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1695, p. 55– 72, 2004.

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S.; CIRVILLERI, G. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiology**, v. 30, p. 219-225, 2012.

POLONELLI, L.; LORENZINI, R.; DE BERNARDIS, F.; MORACE, G. Potential therapeutic effect of yeast *Killer* toxin. **Mycopathologia**, v. 96, p. 103-107, 1986.

RADLER, F.; SCHMITT, M.J.; MEYER, B. *Killer* toxin of *Hanseniaspora uvarum*. **Archives of Microbiology**, v. 154, p. 175-178, 1990.

RAST, D.M.; BAUMGARTNER, D.; MAYER, C.; HOLLENSTEINA, G.O. Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry**, v. 64, p. 339-366, 2003.

RAU, U.; NGUYEN, L. A.; SCHULZ, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; ROEPER, H. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 551-559, 2005.

REGNIER, T.; COMBRINCK, S.; VELDMAN, W.; DU PLOOY, W. Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 151–159, 2014.

RODRIGUEZ-COUSINO, N.; MAQUEDA, M.; AMBRONA, J.; ZAMORA, E.; ESTEBAN, R.; RAMIREZ, M. A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded rna virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p. 1822-1832, 2011.

SANTOS, A.; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, v. 159, p. 331-338, 2004.

SCHENA, L.; NIGRO, F.; PENTIMONE, I.; LIGORIO, A.; IPPOLITO, A. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 30, p. 209-220, 2003.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral *killer* system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 257-276, 2002.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. Yeast viral *killer* toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 212-221, 2006.

SINGH, R.; GAUR, R.; BANSAL, S.; BISWAS, P.; PANDEY, P.K.; JAMAL, F.; TIWARI, S.; GAUR, M.K. *Aureobasidium pullulans* - An industrially important pullulan producing black

yeast. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v.4, p. 605-622, 2015

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology**. v. 22, p. 36-42, 2008.

SOARES, G. A. M.; SATO, H. H. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L *killer* toxin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 291-297, 2000.

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science and Technology**. v. 47, p. 39–49, 2016.

SUGISAKI, Y; GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K.; YAMASAKI, M.; TAMURA, G. Characterization of a novel *killer* toxin encoded by a double-stranded linear DNA plasmid of *Kluyveromyces lactis*. **European Journal Biochemistry**, v. 141, p. 241-245, 1984.

SUZUKI C. Secretion of a protoxin post-translationally controlled by NaCl in a halo tolerant yeast, *Pichia farinosa*. **Yeast**, v.15, p.123–31, 1999.

TAKESAKO, K.; IKAI, K.; HARUNA, F.; ENDO, M.; SHIMANAKA, K.; SONO, E.; NAKAMURA, T.; KATO, I.; YAMAGUCHI, H. Aureobasidins, new antifungal antibiotics: taxonomy, fermentation, isolation, and properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 44, p. 919–924, 1991.

TAKESAKO, K.; KURODA, H.; INOUE, T.; HARUNA, F.; YOSHIKAWA, Y.; KATO, I.; UCHIDA, K.; HIRATANI, T.; YAMAGUCHI, H. Biological properties of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, p. 1414-1420, 1993.

TALIBI, I.; ASKARNE, L.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E. H.; AOUMAR, A.A.B. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of organic and inorganic salts against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. **Plant Pathology Journal**, v. 10, p. 138-145, 2011.

TALIBI, I.; ASKARNE, L.; BOUBAKER, H.; BOUDYACH, E. H.; MSANDA, F.; SAADI, B.; AOUMAR, A. A. B. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. **Crop Protection**, v. 35, p. 41-46, 2012.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, vol.38, p.1553-1558, 2003.

TUSET, T.T. Enfermedade durante la conservación. In: DURAN-VILA, N.; MORENO, P. **Enfermedades de los cítricos**. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 2000. p. 99-114.

USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; ABADIAS, M.; TORRES, R.; CAÑAMAS, T.; VIÑAS, I. Improving formulation of biocontrol agents manipulating production process. In: Prusky, D.,

Gullino, M. L. (Eds) **Postharvest Pathology**. Plant Pathology in the 21st century. v. 2. Springer Science + Business Media, p. 149-170, 2009.

VILLALBA, M. L.; SÁEZ, J. S.; MONACO, S.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M. P. TDKT. A new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 94-100, 2016.

WAGNER, A.; HETMAN, B.; KOPACKI, M.; JAMIOLKOWSKA, A.; KRAWIEC, P.; LIPA, T. Laboratory effect of Boni Protect containing *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnoud in the control of some fungal diseases of apple fruit. **Acta Agrobotanica**, v. 66, p. 77–88, 2013.
WALKER, G.; HOUTHOOFD, K.; VANFLETEREN, J. R.; GEMS, D. Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. **Mechanisms of Ageing and Development**, p. 126, 2005.

WANG, X.X.; CHI, Z.; PENG, Y.; WANG, X. H.; RU, S.G.; CHI, Z. M. Purification, characterization and gene cloning of the *killer* toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. **Microbiological Research**, v. 167, p. 558– 563, 2012.

WANG, Y.F.; BAO, Y.H.; SHEN, D.H.; FENG, W.; YU, T.; ZHANG, J.; ZHENG, X.D. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospodium paludigenum* Fell & Tallman. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 234–239, 2008.

WEILER, F.; SCHMITT, M.J. Zygoicin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 69-76, 2003.

WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.51, p.115-126, 1968.

XU, S. J.; CHOI, W. Antifungal activity of *Paenibacillus ribbensis* strain T-9 isolated from soils against several plant pathogenic fungi. **Plant Pathology Journal**, v. 30, p.102-108, 2014.

YOKOMORI, Y.; AKIYAMA, H.; SCHIMIZU, K. Toxins of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer propertie. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p.2797-2801, 1988.

YURLOVA, N. A.; HOOG, G. S. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 72, p. 141-147, 1997.

YURLOVA, N. A.; MOKROUSOV, I. V.; DE HOOG, G. S. Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, p. 57–63, 1995.

ZALAR, P.; GOSTINCAR, C.; HOOG, G.S.; URŠIČ, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 21–38, 2008.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; VALENTE, S.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of

Aureobasidium pullulans PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 453-464, 2012.

ZHIMO, V.Y.; BHUTIA, D.D.; SAHA, J. Biological control of post harvest fruit diseases using antagonistic yeasts in India. **Journal of Plant Pathology**. v. 98, p. 275-283, 2016.