

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES E POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes ATCC 7644*

**GUSTAVO RETZLAF MAAS¹;RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINA^{1,2}; PEDRO
M.M ALBUQUERQUE^{1,2},VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES¹; NEIDA
CONRAD¹; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE¹**

¹Universidade Federal de Pelotas – gustavo.retzlaf@gmail.com, renanbiotec@gmail.com

²Universidade Federal de pelotas - Yeastech Fabricação de Levedura de Cerveja – Pelotas/RS
renanbiotec@gmail.com

¹ Universidade Federal de Pelotas – albuquerque95pedro@gmail.com

¹ Universidade Federal de Pelotas - vitoriasgon@gmail.com

¹ Universidade Federal de Pelotas - conradneida@gmail.com

¹ Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A levedura *S. cerevisiae* tornou-se a mais utilizada mundialmente na produção de cerveja por possuir características essenciais ao processo, como a produção de altos níveis de etanol com eficiência, metabolismo de açúcares por meio de vias fermentativas bem estabelecidas e a capacidade de resistir a inúmeros estresses ambientais (como alterações em temperatura, pH, etanol) (CAPECE et al., 2018). Leveduras são ubíquas no ambiente, sendo frequentemente isoladas de fontes ricas em açúcar, como bagas de frutas e exsudatos de plantas, contudo o solo e alguns insetos também apresentam leveduras associadas (RAO et al., 2008; TIKKA et al., 2013).

Leveduras não convencionais, também chamadas de não-*Saccharomyces*, representam uma alternativa interessante no desenvolvimento de novos produtos, visto que o mercado cervejeiro entende que a produção utilizando apenas o gênero *Saccharomyces* limita as características sensoriais e acaba por reduzir a complexidade do produto final (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). Esses microrganismos fermentadores muitas vezes são utilizados apenas através de fermentações abertas (ou expostas ao ambiente), o que pode se demonstrar como um processo imprevisível e que pode gerar grandes perdas econômicas às cervejarias, pois mudanças no tipo e número de microrganismos presentes na fermentação espontânea podem ter efeito negativo na eficiência da fermentação e na qualidade do produto (LENTZ et al., 2014; STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

Algumas leveduras, entre elas *S. cerevisiae*, possuem a habilidade de produzir compostos antimicrobianos, capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas e outros fungos (YOUNIS et al., 2017). Essa e outras características conferem a algumas leveduras a denominação de “probióticas”, as quais por definição são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, WHO, 2006). É de grande importância conhecer as culturas *starter* nesses bioprocessos, pois além de favorecer a reproduzibilidade, podem ser descobertas outras propriedades, como o potencial probiótico desses microrganismos. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar leveduras selvagens a partir de frutas e flores, e verificar seu potencial inibição do crescimento de um patógeno de grande importância na área alimentar, a bactéria *Listeria monocytogenes*.

A empresa de produção de fermentos para cerveja “Yeastech”, situada em Pelotas/RS, possui mais de 10 cepas de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* em seu banco de leveduras, a qual tem interesse no isolamento de cepas selvagens para aplicação em seu portfólio de produtos, participando assim como empresa parceira na execução deste projeto.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de frutas como pitanga, amora, morango, laranja, butiá, pitaya e plantas como videira e orquídea. As amostras foram coletadas a partir da extração de partes das frutas ou plantas e através de raspagem da superfície com swabs. As amostras foram inoculadas em extrato de malte líquido com densidade 1.044 g/mL e pH 6, então incubadas a 28 °C por 48 h. Após, foi realizado o repique das amostras em meio Wort Agar 2% adicionado do antibiótico ampicilina (1 mg/mL), sendo incubado novamente a 28 °C por 48 h. Com o isolamento de diferentes colônias, essas foram inoculadas em meio YM líquido (*Yeast extract and Malt extract*) para extração do DNA e criopreservação em glicerol 20%. Após quantificação, foi realizada a técnica de PCR utilizando iniciadores para a região ITS (Internal Transcribed Spacer) que compreende o gene nuclear 5.8S rRNA. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e ao sequenciamento, o qual teve seu resultado utilizado na ferramenta online Blastn.

Para testar a capacidade das leveduras isoladas em inibir o crescimento de alguns microrganismos, a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada segundo o protocolo de Acuña-Fontecilla et al. (2017), com adaptações. Para comparação do potencial de inibição, foram utilizadas 3 leveduras do potencial probiótico já descrito, *Pichia pastoris* X-33, *Saccharomyces boulardii* e a levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* YT001. Inicialmente, todas as leveduras foram cultivadas em 10 mL de meio YPD durante 48 h, a 28 °C e sob agitação (150 rpm), quando chegaram a concentração aproximada de 1×10^8 cél/mL. A concentração celular foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer.

Em torno de 20 mL do meio YGSA (0,5% extrato de levedura, 1% triptona, 1% NaCl, 2% glicose, 1,5% agar, 0,003% de azul de metileno, pH 5.0 ajustado com solução 0.9 M de tampão fosfato-citrato) em seu estado líquido (37 a 42 °C) foi misturado com 1 mL de cultura do patógeno *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, sendo aguardado um período de 10 minutos para solidificação. Assim, uma gota de 10 µL de cada suspensão de levedura foi aplicada no meio da placa de cultura, com o objetivo de verificar a formação de halo de inibição ao redor da gota. As placas foram mantidas durante 48 h a 28 °C, sendo diariamente acompanhada a formação do halo de inibição. O diâmetro do halo de inibição ao redor da gota foi utilizado como medida para a atividade inibitória, sendo o valor analisado em milímetros (halo + gota).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo para isolamento de leveduras a partir de seu ambiente natural demonstrou-se eficiente. Utilizando meios de cultivo comuns em laboratórios de microbiologia e antibióticos capazes de inibir o crescimento bacteriano indesejado, foi possível obter uma coleção de leveduras com diferenças morfológicas em suas colônias e/ou células visualizadas em microscópio. O isolamento das leveduras foi beneficiado também por meio de diversas

passagens por esgotamento em meio de cultura sólido. Todas as fontes de isolamento apresentaram leveduras, contudo alguns fungos filamentosos também puderam ser observados (dados não apresentados), havendo a necessidade do cuidado para que esses não mantivessem a contaminação das culturas isoladas.

A extração de DNA a partir do protocolo com micropérolas de vidro foi uma forma eficaz de se obter DNA puro e com grande concentração ($> 1\mu\text{g}/\mu\text{L}$), favorecendo as etapas seguintes de PCR. Os primers ITS1 e ITS4 foram utilizados para amplificar a região repetitiva de rDNA, que inclui o gene 5.8S rRNA e duas regiões não-codificantes designadas como espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), já descritos por White et al. (1990). Os produtos da amplificação por PCR foram utilizados na ferramenta Blast N, a qual possibilitou através da pesquisa com sequências similares em bancos de dados a identificação de mais de 30 isolados de leveduras selvagens, contando com mais de 8 espécies diferentes.

O protocolo empregado para avaliação da atividade antimicrobiana foi eficaz, sendo observada a formação da “gota” de leveduras, bem como o preenchimento da placa com o cultivo de cada patógeno. A formação do halo de inibição foi considerada como a capacidade de cada cepa de levedura em inibir o crescimento microbiano, sendo que quanto maior o diâmetro, maior a atividade antimicrobiana. A figura 1 apresenta o resultado do teste frente a inibição de *L. monocytogenes* ATCC 7644, em que se observa que todas as leveduras analisadas foram responsáveis pela formação de halos em torno de 16 mm, no entanto há o destaque para *P. kluyveri*, a qual demonstrou a formação do maior halo entre as cepas, de aproximadamente 30 mm de diâmetro.

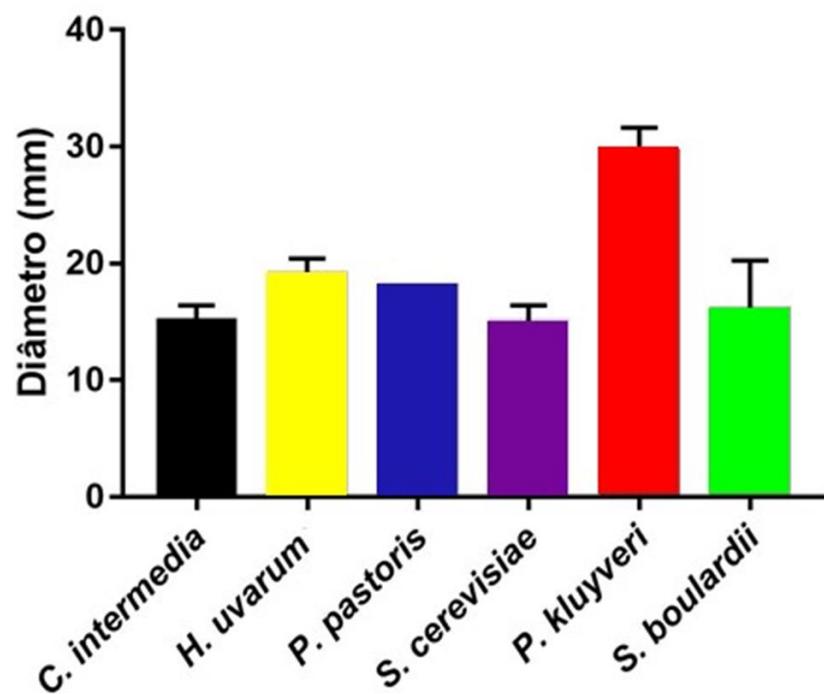


Figura 1. Inibição do crescimento de *L. monocytogenes* ATCC7644 por leveduras.

4. CONCLUSÕES

Os resultados revelam que as 3 leveduras selvagens isoladas *P. kluyveri* (LAR001), *H. uvarum* (PIT001) e *C. intermedia* (ORQ001) demonstram potencial

na inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* similar ao observado para *S. boulardii*, *P. pastoris* e *S. cerevisiae*. Como perspectivas futuras desse trabalho, mais testes quanto a atividade antimicrobiana e fermentação de cervejas devem ser realizados para confirmação das leveduras como culturas *starter* probióticas.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil) e FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pelo suporte financeiro, e também a empresa Yeastech Ltda. pelo fornecimento de cepas e apoio nos ensaios realizados nesse estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA-FONTECILLA, A. et al. Evaluación de la actividad antimicrobiana de levaduras vínicas nativas contra microorganismos patógenos de la industria alimentaria. **CYTA - Journal of Food**, v. 15, n. 3, p. 457–465, 2017.
- CAPECE, A. et al. Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 38, 2018.
- HOLT, S. et al. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55–66, 2018.
- LENTZ, M. et al. Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 559–564, 2014.
- RAO, R. S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 19–24, 2008.
- STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 61–80, 2014.
- TIKKA, C. et al. Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains. **Bioinformation**, v. 9, n. 8, p. 421–425, 30 abr. 2013.
- VAN RIJSWIJCK, I. M. H. et al. Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1591–1602, 2017.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: PCR protocols: **A Guide to Methods and Applications**. [s.l.] Academic Press, Inc, 1990. p. 315–322.
- YOUNIS, G. et al. Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. **Veterinary World**, v. 10, n. 8, p. 979–983, 2017.