

# SELEÇÃO DE LEVEDURAS ENDÓGENAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO<sup>1</sup>

**Moraes, Diego<sup>2</sup>; Lauxen, Daiana<sup>2</sup>; Martins, Bravo, C.E.C<sup>4</sup>**

**Resumo:** A diversidade de atividades metabólicas e produtos microbianos têm grande aplicação em diversos setores. Dentre os grupos de micro-organismos com grande potencial biotecnológico destacam-se, entre outros, as leveduras. Nos últimos anos, o desenvolvimento das leveduras em queijos elaborados artesanalmente tem proporcionado um especial interesse da comunidade científica, devido à diversidade encontrada e ainda inexplorada. O queijo fabricado de forma artesanal é um produto que se destaca dentre os vários tipos de queijo produzidos no Brasil, em especial na região sudoeste do Estado do Paraná. Neste contexto, este trabalho visa quantificar e isolar a diversidade de leveduras encontradas em queijos produzidos artesanalmente comercializados na cidade de Francisco Beltrão, com o objetivo de criar um banco de culturas para estudar o potencial biotecnológico dessas leveduras.

**PALAVRAS-CHAVE:** leveduras, queijo, biotecnologia.

## INTRODUÇÃO

Os micro-organismos apresentam grande versatilidade metabólica; o que favorece o crescimento e o desenvolvimento em vários substratos encontrados na natureza. Os alimentos têm uma grande quantidade de nutrientes e substratos metabolizáveis reunindo, por isso, as condições ideais para o crescimento dos micro-organismos.

Em alguns alimentos como os queijos, a presença de micro-organismos pode ser benéfica ou não, sendo que a capacidade de sobrevivência depende dos fatores relacionados com as características próprias do alimento (fatores intrínsecos) e os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (fatores extrínsecos) (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Os queijos produzidos de maneira artesanal, nem sempre apresentam a segurança sanitária necessária. Em literatura consultada (PEREIRA *et al*, 1999; BORELLI, 2002; CARMO *et al*, 2003; ARAÚJO *et al*, 2004; PERRY, 2004; PINTO *et al*, 2005; SILVA *et al*, 2005; FILHO *et al*, 2005; MARTINS *et al*, 2005) verificou-se uma alta incidência de micro-organismos indicadores de contaminação.

Estudos atribuem às características sensoriais e físico-químicas do queijo, não só as bactérias lácticas, mas também a leveduras presentes na microbiota endógena destes queijos (GARDINI *et al.*, 2006)., que de uma forma direta podem produzir compostos responsáveis pelo aroma e sabor, e, ou indiretamente ao utilizar o ácido láctico e conseqüentemente aumentar o pH do queijo, possibilitando o crescimento de bactérias lácticas menos tolerantes a acidez como por exemplo os *Micrococcus* sp. (LOPANDIC, *et al.*, 2006). Entretanto, isso vai depender da linhagem de levedura encontrada no processo. A produção do queijo artesanal a partir do leite cru ocorre na fazenda sem qualquer apoio tecnológico, o que provavelmente propicia uma diversidade alta de espécies de leveduras e outros micro-organismos envolvidos no processo fermentativo.

O efeito das leveduras em queijos tem promovido interesse da comunidade científica (BERESFORD *et al.*, 2001; WOUTERS *et al.*, 2002; BORELLI, 2002) e as características de densidade populacional, evolução e espécies dominantes durante a maturação vêm sendo estudadas em alguns tipos de queijos (VAN DEN TEMPEL & JAKOBSEN, 1998; FOX *et al.*, 2000; CROW *et al.*, 2001; BORELLI, 2002). A diversidade de leveduras presentes em queijo, a princípio, pode indicar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, o que aumentaria o processo de degradação do produto e diminuiria sua vida de prateleira. Porém, os resultados dos estudos acima citados, indicam efeitos benéficos que sugerem a possibilidade de sinergismo com as bactérias lácticas.

A seleção e identificação de micro-organismos em qualquer produto colonizado ou presentes na natureza é de fundamental importância para o conhecimento da sua ecologia e biologia. A partir do conhecimento da espécie é possível intervir na incidência do micro-organismo, favorecendo ou impedindo sua colonização. Além disso, pode-se verificar o potencial biotecnológico para uso industrial das espécies envolvidas no processo. Nas últimas décadas observaram-se progressos significativos à identificação, caracterização e utilização de polissacarídeos sintetizados por micro-organismos. Inúmeros biopolímeros têm sido produzidos e utilizados comercialmente entre eles: dextrana, xantana, curdulana, alginato bacteriano, zanflo, gelana, escleroglucana, pululana, celulose bacteriana (SUTHERLAND, 1992; MARTINS e SÁ-CORREIA, 1993; GIAVASIS *et. al.*, 2000; MAUGERI, 2001; GIAVASIS *et. al.*, 2003; KALOGIANNIS *et. al.*, 2003; CAMPBEL *et. Al.*, 2003).

Neste contexto, esta pesquisa visa quantificar e isolar a diversidade de leveduras encontradas em queijos produzidos artesanalmente comercializados na cidade de Francisco Beltrão, com o objetivo de criar um banco de culturas para estudar o potencial biotecnológico dessas leveduras.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Francisco Beltrão. As amostras foram coletadas de queijos coloniais de diferentes marcas (codificadas A, B, C e D) prontos para consumo vendidos em supermercado do município de Francisco Beltrão. Foram transportadas em caixas isotérmicas e levadas diretamente para o Laboratório de Microbiologia onde foram realizadas as análises.

### **CONTAGEM DE LEVEDURAS**

Para a contagem de leveduras utilizou-se a técnica de contagem em placas com meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose contendo cloranfenicol e incubadas a 28°C durante 48 horas.

### **ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS**

Após a contagem dos micro-organismos, colônias de leveduras com características morfológicas distintas foram selecionadas de forma a compor uma amostragem representativa das amostras examinadas. Das placas de Petri com meio de cultura Sabouraud Dextrose foi isolado um número de colônias de leveduras igual ao da raiz

quadrada da contagem, conforme recomendação mencionada no *Bacteriological Analytical Manual for Foods* (FDA, 1972).

## PRESERVAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS

A manutenção das culturas de leveduras isoladas foi feita utilizando-se métodos de preservação e armazenamento a baixas temperaturas, com o objetivo de minimizar perdas de viabilidade das linhagens.

## CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS

O estudo taxonômico das leveduras será efetuado utilizando-se testes fisiológicos, bioquímicos e morfológicos, os quais constituem a base para a classificação das leveduras (KREGER VAN RIJ, 1984; KURTZMAN E FELL, 1998, BARNETT *et al.*, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelaram uma diversidade de leveduras em todos os queijos pesquisados e indicaram uma variação das contagens entre as amostras (Tabela 1).

Tabela 1: Contagem de leveduras (UFC/g) em diferentes amostras de queijos coloniais.

A	B	C	D
$10^{-1}$ - 14	$10^{-1}$ - ND	$10^{-1}$ - 14	$10^{-1}$ - ND
$10^{-2}$ - 12	$10^{-2}$ - 6	$10^{-2}$ - 2	$10^{-2}$ - 12
$10^{-3}$ - 17	$10^{-3}$ - 13	$10^{-3}$ - 5	$10^{-3}$ - 15

ND=Não detectada.

A presença de leveduras em contagens elevadas pode ser atribuída ao processo de fabricação artesanal, que não acompanhou a crescente demanda pela segurança higiênico-sanitária dos alimentos, podendo aumentar o processo de degradação do produto e diminuir sua vida de prateleira. Apesar da inexistência de padrão normativo na legislação vigente (BRASIL 1980, 1997, 1997) o número de bolores e leveduras é um indicador de qualidade dos produtos alimentícios (ARAÚJO & SILVA, 1997/98).

As leveduras são agentes potenciais de deterioração, sendo uma das conseqüências do seu desenvolvimento no produto elevação do pH criando condições para o crescimento de outros micro-organismos, inclusive patógenos, desde que atinja valores de pH acima de 4,5.

Algumas espécies de leveduras são promotoras de processos tecnológicos e pesquisas (VAN DEN TEMPEL & JAKOBSEN, 1998; FOX *et al.*, 2000; CROW *et al.*, 2001; BORELLI, 2002) indicam efeitos benéficos que sugerem a possibilidade de sinergismo com as bactérias lácticas. Nakase & Komagata (1977) investigaram a presença de leveduras em queijos da Europa e América do Norte e encontraram contagens entre  $10^6$  e  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ , sendo as espécies isoladas com mais freqüência *Debaryomyces hansenii* e *Candida lipolytica*. Fleet e Main (1987) estudaram vinte e três amostras de queijo Cheddar da Austrália onde 48% das amostras apresentaram contagens de leveduras em torno de  $10^4$  a  $10^6$   $g^{-1}$  de queijo. Boer & Kuik (1987) e Nooitgedagt & Hartog (1988), pesquisaram duzentas e cinquenta e seis amostras de queijos, entre eles, Blue-veined, Brie, Camembert,

Danablu, Roquefort e Gorgonzola, sendo que 87% das amostras de Gorgonzola e 77% das amostras de Roquefort apresentaram índices considerados elevados para contagens de leveduras  $10^7$  a  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ . Em relação ao isolamento e taxonomia, a espécie *Debaryomyces hansenii* foi isolada com mais frequência.

No Brasil, Borelli *et al.* (2006) quantificaram a diversidade de leveduras em queijos Canastra e os resultados apresentaram uma variação entre  $7,0 \times 10^3$  e superior a  $1,5 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de queijo, onde as espécies de leveduras predominantemente encontradas nas amostras estudadas foram *Torulaspora delbruecki*, *Debaryomyces hansenii* e *Kodamaea ohmeri*.

Analisando os resultados desta pesquisa e comparando-os com os dados apresentados, observou-se que a variação da contagem de leveduras obtidas neste trabalho foi superior àquela encontrada por Borelli *et al.* (2006), inferior as citadas por Nakase & Komagata (1977), Boer & Kuik (1987) e Nooitgedagt & Hartog (1988) e semelhantes à Fleet e Main (1987).

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam a importância de mais estudos sobre a presença e a diversidade de leveduras em queijo artesanal para promover um melhor entendimento do significado da presença de leveduras em diferentes tipos de queijos e suas consequências sobre a qualidade final do produto.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária pela concessão de bolsas de iniciação científica e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Campus* Francisco Beltrão pelo financiamento da pesquisa.

Em especial à professora Dra. Elisete Guimarães pela disponibilidade de material para pesquisa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

FRANCO, Bernadette D. Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, editora Atheneu, 2003.

CAMPBELL, B. S.; McDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. (2003). Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 104-112.

CUNHA, M.A.A.; PAWLAK, M.P.; FABBRIS, E.Z.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H. (2008). **Produção de exopolissacarídeo pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MMPI**. VI Semana de Tecnologia em Alimentos. PontaGrossa, v. 2, n. 20.

DILTZ, S; ZELLER, S. G. (2001). Location of O-acetyl groups in S-657 using the reductive cleavage method. **Carbohydrate Research**, v. 331, p. 265-270.

FIALHO, A. M.; MARTINS, L. O.; DONVAL, M. L.; LEITÃO, J. H.; RIDOUT, M. J. JAY, A.J.; MORRIS, V.J.; SÁ-CORREIA, I. (1999). Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those

produced from glucose and from cheese whey. **Applied and Environmental Microbiology**, 65:6, p. 2485-2491.

GIAVASIS, I.; ROBERTSON, I.; McNEIL, B.; HARVEY, L.M. (2003). Simultaneous and rapid monitoring of biomass and biopolymer production by *Sphingomonas paucimobilis* using Fourier transform-near infrared spectroscopy. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 975-979.

KACHHAWA, D. K.; BHATTACHARJEE, P.; SINGHAL, R. S. (2003). Studies on downstream processing of pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 25-28.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. S.; SKARACIS, G. N. (2003). Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 249-256.

LEATHERS, T. D. (1993). Substrate regulation and specificity of amylases from *Aureobasidium* strain NRRL Y-12974. **FEMS Microbiology Letters**, v. 110, p. 217-222.

MARTINS, L.O.; SÁ-CORREIA, I. (1993). Temperature profiles of gellan gum synthesis and activities of biosynthetic enzymes. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.20, p. 385-395.

MAUGERI F., F. (2001). Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1ª ed., v. 3, p. 593.

PACE, G. W. **Polímeros Microbianos**. (1991). In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. *Biología Básica*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.

SCHLISCHTING, R. (2003). **Influência da adição de poliestireno expandido no processos de polimerização do estireno em suspensão**. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis-SC.

SEVIOUR, R. J.; STASINOPOULOS, S. J.; AUER, D. P. F.; GIBBS, P. A. (1992). Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 279-298.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. L. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. (2004). Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria sp.*, grown on different carbohydrate carbon source, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 480-486.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L.; BERTOCCHI, C. (1999). Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 11-16.

SUTHERLAND, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46.

SUTHERLAND, I. W.; TAIT, M.I. (1992). Biopolymers. **Encyclopedia of Microbiology**. v.1. ARAÚJO, W.N. SILVA, M. H. ; SILVA, A. V. A. F. ; SILVEIRA, V. F. ; BARROS, S. L. B. ; MARTINEZ, T. C. N. Determinação do nível de contaminação por coliformes totais no queijo Minas comercializado na Região Metropolitana de Salvador - Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.2, p.5-9, 2001.

BORELLI, B. M. **Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra – MG.** Belo Horizonte, 2002, 109 p. Dissertação (Mestre em Biologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Química Nova**, Vol. 27, nº. 2, 293-300, 2004.

ROOS, T.B.; SCHEID FILHO, V.B.; TIMM, C.D.; OLIVEIRA, D.S. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 94-96, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.* São Paulo: Livraria Varela, 295p. 2007.