

## EXPRESSÃO DO FENÓTIPO *KILLER* EM LEVEDURAS ISOLADAS DE DESTILARIAS DA BAHIA

**Rafaela Moreira Falcão da Silva<sup>1</sup>; Ana Paula Trovatti Uetanabaro<sup>2</sup>; Carla Santos Ribeiro Pinheiro<sup>3</sup> e Marcielle dos Santos Silva<sup>4</sup>**

1. Bolsista UNDEC/ UEFS, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: rafaelamfalcao@yahoo.com.br
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia Agroindustrial, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), e-mail: uetanabaro@yahoo.com
3. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UEFS/FIOCRUZ), Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: crlribeiro@gmail.com
4. Mestre pelo PPGBIOTEC-UEFS/FIOCRUZ, e-mail: marcielles@yahoo.com.br

**PALAVRAS-CHAVE:** Leveduras *killer*, cachaça artesanal, fermentação

### INTRODUÇÃO

O Brasil produz aproximadamente 1,3 bilhão de litros de cachaça por ano (Associação Brasileira de Bebidas- ABRABE, 2010), sendo a bebida destilada mais consumida no país (Silveira, 2007). Sua produção ocorre através da fermentação espontânea do caldo de cana de açúcar, com o uso do chamado “fermento caipira”, no caso da bebida artesanal, ou pelo uso de fermentos industriais, como os utilizados na panificação ou produção de álcool (etanol), para a produção industrial. No Brasil, a fermentação espontânea é a prática mais usada (Rosa et al. 2007). A qualidade da cachaça depende da linhagem da levedura que predomina nas dornas em cada fase do processo fermentativo. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é predominante na indústria de bebidas, pois é capaz de tolerar as condições de fermentação, com variações na temperatura, alta acidez, elevada concentração inicial de açúcar e teores crescentes de etanol (Rosa et al., 2007). Apesar de todas as cepas de *S. cerevisiae* realizarem a transformação de carboidratos em etanol e gás carbônico, o sabor da bebida varia de uma cepa para outra, sendo resultado das discretas diferenças bioquímicas de metabolismo e consequente formação dos compostos secundários que conferem aroma e sabor (Carvalho et al., 2006). Dessa forma, a fermentação é uma das etapas críticas da fermentação da cachaça e a seleção do fermento pode melhorar o processo de fabricação da bebida (Rosa et al., 2007). A característica *killer* é considerada um aspecto importante para o fermento iniciador, assim como a tolerância ao álcool e a taxa de fermentação (Vagnoli et al, 1993). As leveduras *killer* são fungos produtores de exotoxinas (proteínas ou glicoproteínas de baixo peso molecular) que são capazes de matar células suscetíveis pertencentes ao mesmo gênero ou a gêneros relacionados (Schmitt & Breinig, 2002). Leveduras com esse fenótipo são importantes agentes de biocontrole da fermentação, pois o uso de leveduras *killer* selecionadas como fermento iniciador na produção da cachaça pode eliminar do meio as leveduras sensíveis que produzem características indesejáveis na bebida, contribuindo assim para uma maior qualidade do produto (Magliani, 1997; Maturano et al., 2009).

### METODOLOGIA

Foram testadas 29 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* quanto à produção de toxinas *killer*. As leveduras foram isoladas de seis destilarias pertencentes aos municípios de Ibirataia, Jaguaripe, Ilhéus, Condeúba, Caculé e Rio de Contas, todas localizadas no estado da Bahia e depositadas na Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB/UEFS). As linhagens de referência padrão de sensibilidade *killer*, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1006 e *Candida glabrata* Y55 ATCC90525, foram utilizadas para a determinação da atividade *killer* das leveduras escolhidas. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* NCYC232, produtora da toxina K1, foi utilizada como levedura *killer* padrão, servindo como controle

positivo para os testes. Inicialmente, todas as leveduras foram reativadas em meio ágar-YEPD (1,0% extrato de levedura; 2,0% glicose; 2,0% peptona; 2,0% ágar) e incubadas a 28°C por 48 horas. O teste para a característica *killer* foi realizado em meio ágar-YEPD-MB (meio YEPD adicionado de 0,003% de azul de metileno). Para cada linhagem padrão de sensibilidade foi feita uma suspensão em solução salina 0,45% correspondente à concentração de  $10^5$  células. mL<sup>-1</sup> obtida através de um turbidímetro, segundo as instruções do fabricante (Biomérieux). Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão dessas linhagens sensíveis foi espalhada com uma alça de Drigalski sobre o Agar-YEPD-MB contido em placas de Petri. Após secagem da suspensão, as leveduras a serem testadas e a linhagem *killer* padrão foram inoculadas em forma de ponto sobre cada placa correspondente a uma linhagem padrão de sensibilidade. As placas ficaram incubadas, em triplicata, a 25° C e em pH 4,5 e 5,0. A produção de toxina *killer* é indicada pela presença de um halo de inibição de crescimento ao redor do ponto de inoculação, acompanhado de uma região azul adjacente, que representa as células mortas coradas pelo azul de metileno. Para ser considerada *killer*, a levedura deve apresentar essa característica contra, pelo menos, uma das linhagens sensíveis de referência (OLIVEIRA, 2009).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de leveduras testadas, 13 linhagens (45%) expressaram o fenótipo *killer*, somente em relação à linhagem *Candida glabrata* Y55 sensível. Em pH 4,5, houve resultados positivos para alguns dos isolados (Figura 1), sendo que, para algumas linhagens, foi observada a formação de um halo ao redor do ponto de inoculação, porém sem uma região azul adjacente, o que indica que não houve morte celular, apenas inibição do crescimento (Ceccato-Antonini et al., 1999). Quando o pH do meio foi 5,0; nenhum dos isolados apresentou a capacidade de produzir a toxina, independente da temperatura. De acordo com Marquina et al. (2002), o pH ótimo para a produção e estabilidade da toxina K1 varia entre 4,6 e 4,8. Segundo Lima et al. (2007), no início da fermentação da cachaça, a temperatura encontra-se em torno de 25°C e o pH do caldo, na faixa entre 4,5 e 5,0. Dessa forma, algumas linhagens testadas demonstram potencial para serem utilizadas como fermento iniciador, controlando o crescimento de leveduras contaminantes presentes nessa fase.



Figura 1: Atividade killer positiva para as linhagens (da esquerda para a direita): 178, K1, 132, 23, 191, 115, 114 e 127 a 25°C.

## CONCLUSÃO

Treze linhagens testadas (45%) expressaram o fenótipo *killer*, o que as tornam potenciais micro-organismos para serem utilizados como fermento iniciador na fabricação da cachaça. No entanto, outros aspectos também devem ser observados, como o potencial fermentativo e a tolerância ao etanol.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS – ABRABE. *A cachaça*. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/cachaca.php>> Acesso em: 18 set. 2010.
- CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V.; SILVA, J.B.A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. *Revista Analytica*, nº25, p.36-42, Outubro/Novembro 2006.
- CECCATO-ANTONINI, S.R., CREMONINI, L.C.M., REGENFUSS, C. Killer character of yeasts isolated from ethanolic fermentations. *Scientia Agricola*, v.56, n.3, p.631 – 635, 1999.
- LIMA, J.R.; BRUNO, L.M.; SILVA, J.L.A.; CASIMIRO, A.R.S.; Potencial de utilização de leveduras “killer” para produção de cachaça. *Rev. Ciên. Agron.*, Fortaleza, v.38, n.4, p.366-371, Out.- Dez., 2007.
- MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 10, No. 3 p. 369-400, Jul 1997.
- MARQUINA, D., SANTOS, A; PEINADO, J.M.. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol* 5: 65–71, 2002.
- MATURANO, P.Y.; NALLY, M.C.; TORO, E.M.; CASTELLANOS, L.F.; VASQUEZ, F. Estudio cualitativo de actividades enzimáticas y fenómeno killer em leveduras vnicas. *Revista Enología*, nº1, ano VI, p. 1-11, jan- fev 2009.
- ROSA, Carlos A.; GOMES, Fátima C.O.; SILVA, Carol L.C.; BADOTTI, Fernanda; VIANA, Cristina R.; ARAÚJO, Roberta A.C. Cachaça: os segredos da fermentação. *Ciência Hoje*. Ed. 243, p. 67 – 69, nov. 2007.
- SILVEIRA, E. Brinde a cachaça. *Problemas brasileiros*, São Paulo, n. 380, mar./abr. 2007. Disponível em: <[http://www.sescsp.org.br/sesc/revistas\\_sesc/pb/artigo.cfm?Edicao\\_Id=271&Artigo\\_ID=4261&IDCategoria=4846&reftype=1](http://www.sescsp.org.br/sesc/revistas_sesc/pb/artigo.cfm?Edicao_Id=271&Artigo_ID=4261&IDCategoria=4846&reftype=1)> Acesso em: 19 set. 2010
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*.p. 257-276, 2002.
- VAGNOLI, P.; MUSMANNO, R.A.; CRESTI,S.; DI MAGGIO, T.; CORATZA, G. Occurrence of Killer Yeasts in Spontaneous Wine Fermentations from the Tuscany Region of Italy. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, No. 12, p. 4037-4043, Dez. 1993
- WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. Microbiol.* (1968), 51, 115-126. 1968