

# AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA A BAIXO PH E A SAIS BILIARES DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA PRODUÇÃO DE UM NOVO PRODUTO PROBIÓTICO

**Soares, Karolyne Nunes<sup>1</sup>; Góes-Neto, Aristóteles<sup>2</sup>; Magalhães-Gadéa, Suzana Ferreira<sup>3</sup>; Uetanabaro, Ana Paula Trovatti<sup>4</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: line3032@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: arigoesneto@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: su\_magalhaes@yahoo.com.br
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, e-mail: aptuetanabaro@gmail.com

Palavras-Chave: *Saccharomyces cerevisiae*, probiótico, sais biliares

## INTRODUÇÃO

A palavra Probiótico, que significa “para a vida” é um termo derivado da língua grega. Probióticos podem ser definidos como suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos, ou componentes microbianos que, quando ingeridos em determinado número, apresentam efeito benéfico sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro. São capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos positivos à saúde do indivíduo (SALMINEN et al., 1999; DUPONT, 2001; ISOULARI, 2001; REID et al., 2001; SANDERS, 2003).

A utilização de leveduras esta relacionada a vários setores a agroindústria, tais como a produção de álcool etílico, bebidas panificação, enriquecimento de alimentos destinados a seres humanos e animais, e probióticos (BELLUCO, 2008). Nas ultimas décadas muita atenção tem sido dada a modulação da microbiota normal por adjuvantes microbianos vivos chamados probióticos. A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes. Os efeitos benéficos desses microrganismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano. Esses organismos vêm sendo propostos como complementos ou alternativas no tratamento de um grande numero de desordens gastrointestinais (MARTINS et al., 2005).

O presente trabalho tem como foco analisar o potencial de leveduras, com características *killer*, pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, para que posteriormente testadas comoprobóticos, proporcionem o equilíbrio da microbiota intestinal, trazendo benefícios à saúde e conseqüentemente permitindo melhor qualidade de vida ao hospedeiro.

## METODOLOGIA

Meios de cultura testados: caldo Sabouraud modificado, caldo extrato de malte, caldo YPG e caldo GYMP.

Reativação dos microrganismos: A reativação dos micro-organismos foi feita com plaqueamento no meio caldo Sabouraud modificado e incubação por 48h a 28° C.

Teste de resistência ao pH e tolerância à bile: A partir dos repiques prévios, foi preparado um cultivo de 40 mL de cada levedura, em caldo Sabouraud modificado, incubado à 28° C,

durante 48h. Cada amostra foi centrifugada a 5000 rpm, por 10 min e lavada 2 vezes com tampão PBS. Depois de lavado, foram resuspendidos em 20 mL de água estéril mais 20 mL de solução salina contendo 0,6% pepsina. Mediu-se o pH para verificar se estava no nível de interesse (entre 1,8 e 2,5). Incubou-se em banho-maria, a 37° C, por 90 minutos. Após esse período, tomou-se uma alíquota de 1,4 mL e tornou-se a centrifugar a amostra, por 10 minutos a 1400 rpm. Cada amostra foi lavada 2 vezes com tampão PBS. Incubou-se em banho-maria, a 37° C, por 10 minutos. Centrifugou-se o conteúdo e lavou-se novamente duas vezes com PBS. O material foi ressuspenseo em uma solução com de 0,3% bÍlis + 0,1% de pancreatina. Após o procedimento, foi retirada uma alÍquota de 100 µL que foi plaqueada com o auxÍlio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 28° C, por 48 horas, para serem observados os resultados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Reativação dos micro-organismos:

Das 51 leveduras com características *killer* do estudo, 16 foram reativadas (D1-1; D1-2; D1-4; D1-5; D1-6; D1-7; D1-9; D1-10; D1-11; D1-12; D1-13; D1-14; D1-16; D1-20; D5-2; D5-8).

### Testes de resistência ao pH e tolerância à bile

A metodologia adotada foi modificada em relação ao projeto original, sendo baseada segundo MORELLI, 2007. Em resumo, foram testados 4 diferentes meio de crescimento para leveduras: caldo Sabouraud modificado, caldo extrato de malte, caldo YPG e caldo GYMP. Todos os meios foram testados com o mesmo micro-organismo para verificarmos em qual deles o micro-organismo cresceria melhor. A amostra escolhida, aleatoriamente, para o teste foi a D1-16. Com os caldos YPG, GYMP e extrato de malte não houve crescimento da levedura, após realização do protocolo. Com o caldo Sabouraud modificado, houve um crescimento de  $178 \times 10^5 \text{UFC.mL}^{-1}$  (Tabela 1).

Tabela 1 – Meios testados para avaliação de melhor crescimento do micro-organismo-

Levedura	Caldo YPG	Caldo GYMP	Caldo extrato de malte	Caldo Sabouraud modificado
D1-16	-	-	-	$178 \times 10^5 \text{UFC.mL}^{-1}$

: Não houve crescimento

Foram testados também dois tipos de bile, a bile porcina e a bile bovina. Os testes foram realizados com a bile porcina, com a amostra D1-16 e com a bile bovina, com as amostras D1-5, D1-14 e D1-20, onde se foi observado um crescimento superior a  $200 \times 10^5 \text{UFC.mL}^{-1}$  (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados dos testes realizados com as bile porcina e a bile bovina, com o meio Caldo Sabouraud modificado

Tipo de bile	D1-5	D1-6	D1-7	D1-16	D1-14	D1-20
Porcina		-	-	178x10 <sup>5</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	-	-
Bovina	> 200x10 <sup>5</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	> 200x10 <sup>9</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	-	-	> 200x10 <sup>5</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>	> 200x10 <sup>5</sup> UFC.mL <sup>-1</sup>

- : Não houve crescimento

Em nosso trabalho, as linhagens estudadas foram crescidas a uma temperatura média de 28° C e observou-se uma considerável resistência ao pH e tolerância a bile, não havendo uma considerável disparidade nos resultados das diferentes linhagens analisadas. Martins et al. (2005), realizaram um estudo com 12 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* na qual foi usada uma metodologia semelhante ao do projeto, onde foi observado que todas as linhagens de leveduras apresentaram resultados diferentes quando submetidas a testes de tolerância a bile e resistência a temperatura, sendo apresentada uma alta viabilidade com relação à resistência ao pH extremamente baixo do conteúdo intestinal. No trabalho de Martins et al. (2005), a maioria das linhagens suportaram as maiores concentrações de sais bilares a 37°C. No entanto a essa temperatura houve uma menor, ou até inibição, do crescimento de algumas linhagens isoladas e outras linhagens só suportaram a toxicidade dos sais bilares a uma temperatura de 30°C.

Muitos trabalhos têm sido realizados com leveduras do gênero *Saccharomyces* e estes têm fornecido resultados positivos quanto ao seu potencial probióticos. Atualmente existem no mercado produtos contendo leveduras como probióticos, que trazem benefícios a saúde de animais e humanos. No entanto, ainda há necessidade de se buscar informações sobre o potencial biotecnológico de leveduras.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a Fapesb.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. A. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus Delbrueckii* UFV H2b20 e de Inulina. 2007. 54 f. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana, parte 1. NUTRIR GERAIS: *Revista Digital de Nutrição Ipatinga/Unileste-MG*, v. 2, n. 3, P.4-5 Ago./Dez. 2008.
- BELLUCO, A.E.S. Obtenção de Leveduras Vivas Enriquecidas Para Suplementação nutricional e probiotico. 2008.96f. Tese ( doutorado em ciências ) –Universidade de São Paulo, Piracicaba,2008
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially

- probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, v.84, p.759-768, 1998.
- DUPONT, C. Probiotiques et prébiotique. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, Paris, v. 14, n. 2, p. 77-81, 2001.
- FOX, S. M. Probiotics: intestinal inoculants for production animals. *Veterinary Medicine*, Lenexa, v. 83, n. 8, p. 806-830, 1988.
- ISOLAURI, E.; SÜTAS, Y.; KANAKAANPÄÄ, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 73, n. 4, p. 44-50, 2001.
- MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, n. 2, 2005a.
- MADSEN, K. L. The use of probiotics in a gastrointestinal disease. *Canadian Journal of Gastroenterology*, Kingston, v. 15, n. 12, p. 817-822, 2001.
- MANNIN, G. T. S.; GIBSON, G. R. Microbial gut interaction in health and disease, prebiotics, best practice and research. *Journal of Clinical Gastroenterology*, New York, v. 18, n. 2, p. 287-298, 2004.
- MATSUMOTO, S.; HARAI, T.; HORI, T.; MITSUYAMA, K.; NAGAOKA, M.; TOMIYASU, N.; SUZUKI, A.; SATA, M. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 140, n. 3, p. 417-426, 2005.
- MORELLI, L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *International Dairy Journal*, v. 17, 1278-1283, 2007.
- NEVES, L. S. Fermentado probiótico de suco de maçã. 2005. 103 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- OLIVEIRA, B. M. Comportamento *killer* em leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto da cana de açúcar de produtores de Cachaça de alambique da Bahia. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- PANT, N.; MARCOTTE, H.; BRÜSSOW, H.; SVENSSON, L.; HAMMARSTRÖM, L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. *Microbiology*, Edinburgh, v. 7, n. 86, p. 1-9, 2007.
- REID, G.; ZALAI, C.; GARDINER, G. Urogenital *Lactobacillus* probiotics, reliability, and regulatory issues. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 84, n. 6, p. 164-169, 2001.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 563-572, 1999.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Review*, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 29, n. 1, p. 84, jan./jun. 2008.