ISOLAMENTO, SELEÇÃO E DIVERSIDADE DE CEPAS DE LEVEDURAS A PARTIR DE FRUTAS ORGÂNICAS PARA UTILIZAÇÃO EM FERMENTAÇÃO CERVEJEIRA

Mariana K. Vinticinco (PIBIC/CNPq), Jesiane Stefania Batista (co-orientadora), Luiz Gustavo Lacerda (Orientador), luizgustavo75@gmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos

2.12.00.00-9 Microbiologia / 2.12.01.00-5 Biologia e Fisiologia dos Microorganismos
Palavras-chave: biodiversidade, bioprospecção, não-*Saccharomyces*.

Resumo
Leveduras são microrganismos de extrema importância industrial e biotecnológica. Nesse contexto, apesar da histórica importância do gênero *Saccharomyces*, há uma grande diversidade de leveduras não-convencionais que podem contribuir para melhoria de produtos biotecnológicos. Esse estudo descreve o isolamento de leveduras epifíticas de morangos orgânicos, avaliando-se a eficiência de três meios de cultivo e três técnicas de isolamento. A técnica de enriquecimento associada à utilização de meio altamente seletivo foi a mais eficiente. Os treze isolados obtidos apresentaram variadas características morfológicas macroscópica. O sequenciamento da região ITS1- 5,8S do rDNA de seis isolados revelou que todos se tratavam de leveduras não-convencionais. Não foi observada atividade fermentativa alcoólica de suco de uva integral. No presente estudo, foi demonstrado que a escolha de procedimentos e meios de cultivo adequados pode permitir o acesso a leveduras selvagens não-convencionais, em especial dos gêneros *Pichia* e *Hanseniaspora*, que são recursos genéticos da biodiversidade nacional com amplo potencial biotecnológico.

Introdução

As leveduras são fungos eucarióticos unicelulares, anaeróbios facultativos e quimio-heterotróficos. Há relatos de bebidas fermentadas na China em 7000 a.C. (MCGOVERN *et al.* 2004). Com o decorrer dos anos, as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* foram domesticadas e hoje sua aplicação na indústria é imprescindível para diversos bioprocessos. Apesar das leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* já terem seu metabolismo bem elucidado, pouco sabe-se sobre as demais leveduras, coletivamente denominadas não-convencionais ou não-*Saccharomyces*.. Em razão de sua elevada capacidade de fermentação e versatilidade metabólica, baixo risco ambiental e à saúde humana e animal, as leveduras são altamente apropriadas para diversos processos biotecnológicos (NANDY e SRIVASTAVA, 2018).
Para isso diversos meios de cultivo são testados e avaliados quanto a sua capacidade de propiciar o crescimento *in vitro* de tais leveduras. Deve-se utilizar estratégias que favoreçam o desenvolvimento das leveduras e dificultem o dos demais microrganismos. Para isso os meios de cultivo devem apresentar pH reduzido e uma baixa atividade de água, e quando julgar-se necessário pode haver a adição de antibióticos ou fungicidas (KURZTMAN *et al.,* 2011). Visto que a maioria das leveduras são microrganismos mesofílicos, as temperaturas de incubação mais utilizadas variam entre 20 a 30 °C, de acordo com a espécie a ser isolada (VIANA, 2017). Dessa forma o presente estudo apresenta etapas iniciais da bioprospecção

de leveduras, que consistem no isolamento e caracterização da diversidade, utilizando como material biológico morangos orgânicos.

Material e Métodos

- *Coleta do material*

Para o isolamento de leveduras epifíticas, foram coletados morangos orgânicos em uma plantação localizada na cidade de Castro-PR (24°52'24.7"S 49°54'12.2"W). As frutas colhidas foram armazenadas em caixas térmicas e levadas até o Laboratório de Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde foram processadas imediatamente.

- *Isolamento de leveduras*

As leveduras foram isoladas da superfície dos frutos, com o auxílio de *swabs* e solução salina (NaCl 0,85%) estéreis. Três meios de cultivos foram utilizados: YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium:* 2% glicose; 2% de peptona; 1% de extrato de levedura; ágar 1,4%), o qual foi acidificado até pH 5.0 com ácido clorídrico; meio de cultivo desenvolvido por WRIGHT & PARLE (1974) (M.W.P 20%) (20% sacarose; 0,7% (NH4)2HPO4; 0,4% (NH4)2SO4; 0,4% K2SO4; 0,3% extrato de levedura; 2,5% ágar), o qual foi acidificado até pH 4.0 com ácido tartárico; e por último realizou-se uma modificação no meio desenvolvido por WRIGHT & PARLE (1974) (M.W.P 4%), onde alterou-se a concentração de sacarose de 20% para 4%. Além disso, foram utilizadas três estratégias de isolamento. Na estratégia 1, o *swab* foi umedecido com solução salina e em seguida realizou-se o esfregaço do *swab* em toda superfície do morango e em seguida transferido para as placas de Petri contendo os meios de cultivo. Já a estratégia 2, após o esfregaço do *swab* na superfície do morango, o mesmo foi umedecido na salina novamente e então transferido para as placas de Petri.

Por fim, na estratégia 3 realizou-se o enriquecimento da microbiota presente na superfície do morango. Para isso o fruto íntegro foi inserido em um frasco contendo o meio líquido. O sistema de enriquecimento foi incubado à 28°C sob agitação até que ocorresse a turvação do meio. Após, realizou-se a transferência de 100 µL e 500 µL desse material para as placas de Petri contendo o mesmo meio, porém sólido. As placas resultantes de todas as estratégias foram incubadas à 28°C até observação do crescimento das colônias de leveduras. As colônias com diferentes características morfológicas foram novamente isoladas.

- *Caracterização morfológica*

A descrição dos aspectos morfológicos de colônias isoladas das leveduras nas placas de Petri foi realizada segundo Kurztman *et al.* (2011).

- *Identificação molecular dos isolados*

Leveduras com características morfológicas mais distintas foram selecionadas, crescidas em caldo YEPD e utilizadas identificação molecular. Para a extração do DNA total foram transferidos 1.5 mL de cultivos das leveduras em caldo YEPD para microtubos, os quais foram centrifugados por 90 s a 4000 rpm. O precipitado foi utilizado para a extração, utilizando o kit *GenElute™ Bacterial Genomic* (Sigma Aldrich), seguindo instruções do fabricante. Uma etapa adiciona de lise mecânica foi empregada, onde foram adicionadas microesferas de vidro aos microtubos e seguidos por agitação por 45 s e com velocidade de 3000 rpm (L-Beader 6, Loccus Biotecnologia). A integridade e concentração do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1.0%.

A identificação molecular baseou-se na região ITS1-5,8S do rDNA que foi amplificada utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e

ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (LEITÃO et al., 2012). A reação de PCR consistiu em 1X tampão de reação, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl2, 10pmol de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerase, 20ng de DNA total e água Milli-Q estéril (quantidade suficiente para volume final de 50µL). A amplificou ocorreu com as seguintes condições de PCR: 95 °C por cinco min, seguido de 35 ciclos de um min à 94 °C, um min à 56 °C, um min a 72 °C e cinco min a 72 °C. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1.0%. As amostras amplificadas foram purificadas (*GenElute™ PCR Cleanup Kit*, Sigma Aldrich) e submetidas a sequenciamento (ABI 3500XL, *Applied Biosystems*). As sequências obtidas foram corrigidas com o programa Geneious (*Biomatters Ltda.*) e utilizadas para busca no banco de dados de sequencias de nucleotídeos Genbank/NCBI utilizando a ferramenta BlastN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Resultados e Discussão

- *Isolamento das leveduras em diferentes meios de cultivo e estratégias aplicadas*

Foram obtidos treze isolados epifíticos, sendo que sete foram provenientes do meio de cultivo YEPD, cinco com o meio M.W.P 20% e um com o meio M.W.P 4%. O aparecimento de colônias foi rapidamente observado no meio YEPD, visto que com 24 h de incubação todas as placas apresentaram crescimento microbiano. Notou-se que dois dos nove isolados eram contaminantes bacterianos, sendo que as estratégias 1 e 3 sem diluição foram as que mais favoreceram o crescimento bacteriano; nesse contexto, verifica-se que o meio de cultivo YEPD não foi altamente seletivo para leveduras.

O meio de cultivo M.W.P 20% se mostrou mais seletivo. O meio M.W.P 4% apresentou intenso desenvolvimento de fungos filamentosos com micélio abundante. Dessa forma, conseguiu-se um único isolado leveduriforme através desse meio. Sugere-se que a ocorrência de fungos filamentosos deve-se a menor concentração de sacarose, visto que o meio M.W.P 20% e M.W.P 4% possuem a mesma composição e pH.

- *Caracterização morfológica e molecular dos isolados*

Do total observado, 38,46% apresentaram textura friável; tanto a cor branca quanto a creme representam 46,15% dos isolados; 38,46% possuem superfície fosca/áspera; elevação plana e levemente cúpula apresentaram a mesma incidência de 46,15%; e por fim 53,85% de borda inteira.

Através dos resultados do sequenciamento molecular da região ITS dos pré-selecionados, foram encontrados os gêneros *Hanseniaspora* e *Pichia* (tabela 1). Portanto observou-se que o meio YEPD através da estratégia 1 permitiu o isolamento do gênero *Hanseniaspora* e quando aplicou-se a estratégia de enriquecimento foram isoladas da espécie *Pichia terricola*. Já no meio M.W.P 20%, proposto por Wright & Parle (1974) para isolamento do gênero *Brettanomyces*, foram obtidas leveduras da espécie *Pichia kluyveri*.

Tabela 1: Resultado do sequenciamento de DNA da região ITS rDNA leveduras isoladas de morangos orgânicos.

Isolado	Identificação (Blastn/NCBI)	Número de acesso	Cobertura	Identidade	Tamanho (pb)
M.1.3	*Hanseniaspora uvarum* CBS:279	KY103553.1	100%	99%	816
M.1.7	*Hanseniaspora sp.* CDA227Y	MG813546.1	100%	99%	593
M.3.16-1	*Pichia kluyveri* CBS:7908	KY104556.1	100%	99%	512
M.3.16-2	*Pichia kluyveri* CBS:7908	KY104556.1	100%	99%	512
M.3.22	*Pichia terricola* AUMC 10796	KY495764.1	100%	100%	422
M.3.25	*Pichia kluyveri* CBS:6859	KY104561.1	100%	99%	440

A caracterização a nível molecular permite uma identificação mais rápida com maior precisão (KURTZMAN *et al.,* 2011). Para fungos, a região ITS foi denominada recentemente como o "código de barras (*barcode*)" (SCHOCH *et al.*, 2012). Para uma inferência taxonômica segura, sugere-se que as sequencias tenham uma cobertura maior que 80% e uma identidade igual ou superior a 98% quando analisadas pela ferramenta Blastn/GenBank (HUGHES *et al.*, 2009), o que foi obtido nesse estudo.

Conclusão

Os meios de cultivo YEPD e M.W.P 20% são aplicáveis para o isolamento de leveduras, sendo que o segundo se mostrou mais seletivo para esse fim, pois o YEPD apresentou contaminações. A técnica de enriquecimento favoreceu os microrganismos em meios mais seletivos, sendo M.W.P 20%. Ainda, relatou-se o isolamento de leveduras não-convencionais epifíticas de morangos orgânicos, pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hanseniaspora*, as quais apresentam potencial para aplicação industrial. Para comprovação desse potencial, são necessárias futuras pesquisas aplicadas ao perfil fermentativo e a produção de metabólitos desejáveis, sendo eles de aroma e/ou de sabor, para alimentos como cervejas e outros fermentados.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo suporte financeiro, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva da UEPG e à Embrapa Soja – Londrina pelo suporte técnico.

Referências

1. HUGHES, K. W.; PETERSEN, R. H.; LICKEY, E. B. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. **New Phytologist.** v. 182, n.4, p. 795-798. 2009.
2. KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: a taxonomic study.** 5º ed. Elsevier Science. Londres. 2011.
3. LEITÃO, A. L.; GARCÍA-ESTRADA, C.; ULLÁN, R. V.; *et al. Penicillium chrysogenum* var. *halophenolicum,* a new halotolerant strain with potential in the remediation of aromatic compounds in high salt environments. **Microbiological Research**, v. 167, p. 79-89, 2012.
4. MCGOVERN, P. E.; ZHANG, J.; TANG J. et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 2004, v. 101, n. 51, p. 17593-17598.
5. NANDY, S. K.; SRIVASTAVA, R. K. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. **Microbiological Research,** v. 2017, p. 83-90, 2018.
6. SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 109, n.16, p. 6241-6246. 2012.
7. VIANA, N. C. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcóolica.** 2017. 68 f. Dissertação (mestrado em ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba.
8. WRIGHT, J. M.; PARLE, J. N. *Brettanomyces* in the New Zealand wine industry. **New Zealand Journal of Agricultural Research,** Wellington, New Zealand, v. 17, p. 273-278, 1974.