

GILZEANE DOS SANTOS SANT'ANA

**LEVEDURAS COM ATIVIDADE *KILLER* POTENCIALMENTE
PROBIÓTICAS PARA SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

GILZEANE DOS SANTOS SANT'ANA

**LEVEDURAS COM ATIVIDADE *KILLER* POTENCIALMENTE
PROBIÓTICAS PARA SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 31 de outubro de 2002

Prof^a Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Dra. Virgínia Maria Chaves Alves
(Conselheira)

Prof^o Cláudio Furtado Soares

Prof^a Míriam Teresinha dos Santos

Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

Ao meu orgulho de pai, Haroldo

A minha mãe mana, Gilzete

Aos meus irmãos, Jorge Fernando e Leandro.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força de vida.

À Flávia Maria Lopes Passos pela oportunidade, confiança e amizade.

Às Conselheiras Célia Alencar de Moraes e Virgínia Maria Chaves Alves pelo apoio e sugestões.

A todos do Departamento de Microbiologia Agrícola que auxiliaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos pela cooperação.

Aos grandes amigos Klédna, Zeca e em especial meu anjinho Ian pelos momentos maravilhosos e pelo grande apoio neste trabalho.

Às companheiras de república Fabrícia e Joseane pela ótima convivência e harmonia familiar que sempre dividimos.

Aos amigos Deoclides, Júnior, Alan, Vitor, Anselmo, Cláudio, Bira, Rogério e Andrezão pela dedicação que fizeram da nossa amizade uma rica família.

A todos da Pelada da Violeira pelos finais de semana inesquecíveis.

Em especial ao meu amigo Jeferson que depois de TUDO será sempre meu irmão.

BIOGRAFIA

GILZEANE DOS SANTOS SANT'ANA, filha de Haroldo Teixeira Sant'Ana e Gilzete dos Santos Sant'Ana, nasceu no Rio de Janeiro, em 18 de setembro de 1977, filha de coração de Guarapari, Espírito Santo,

Em março de 1996, iniciou o Curso de Tecnologia de Laticínios, na Universidade Federal de Viçosa, vindo a graduar-se em outubro de 2000.

No período de março de 1997 a março de 1998, desenvolveu trabalhos de iniciação científica no Departamento de Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

Em outubro de 2000, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, defendendo a tese em outubro de 2002.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Microbiota do trato intestinal de suínos.....	3
2.2 Probióticos e prebióticos como adjuntos dietéticos.....	6
2.3. Leveduras como probióticos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Microrganismos utilizados neste trabalho.....	16
3.2. Isolamento de leveduras de suínos recém-nascidos.....	16
3.3. Seleção das leveduras com atividade <i>killer</i>	16
3.3.1 Determinação de atividade <i>killer</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> sobre os isolados <i>killer</i> positivos selecionados.....	
3.4. Determinação do potencial probiótico <i>in vitro</i>	17
3.4.1. Determinação do crescimento populacional em diferentes temperaturas..	18
3.4.2. Avaliação do efeito de pH sobre o crescimento e sobrevivência das leveduras selecionadas.....	18
3.4.3. Determinação do efeito de sais biliares sobre o crescimento e sobrevivência das leveduras selecionadas.....	19
3.5. Avaliação da capacidade de utilização de lactose como única fonte de	

carbono pelas leveduras selecionadas.....	19
3.7. Preparo e biotransformação do soro de queijo.....	19
3.8. Avaliação do potencial prebiótico do soro de queijo biotransformado.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1. Leveduras isoladas de fezes de leitões.....	20
4.2. Leveduras com atividade <i>killer</i> selecionadas.....	20
4.2.1. Atividade <i>killer</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>	21
4.3. Características probióticas de leveduras com atividade <i>killer</i> selecionadas....	23
4.3.1. Capacidade de crescimento em diferentes temperaturas.....	23
4.3.2. Crescimento na presença de sais biliares.....	25
4.3.3. Crescimento e sobrevivência na presença de diferentes concentrações de pH dos isolados <i>killer</i>	28
4.4. Capacidade de fermentação de lactose.....	32
4.5. Potencial prebiótico do soro biotransformado.....	33
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
APÊNDICE.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porcentagem dos isolados <i>killer</i>	22
Figura 2 - Velocidade de crescimento específica (μ) dos isolados <i>killer</i> em diferentes temperaturas.....	24
Figura 3 - Crescimento relativo dos isolados com 0,3% de sais biliares.....	26
Figura 4 - Velocidade específica de crescimento (μ) dos isolados <i>killer</i> com 0,3% de sais biliares.....	27
Figura 5 - Velocidade de crescimento específico (μ) dos isolados <i>killer</i> em diferentes valores de pH.....	30
Figura 6 - - Sobrevivência das leveduras <i>killer</i> em pH 2.....	31
Figura 7 - Crescimento relativo dos isolados <i>killer</i> em meio suplementado com SUF fermentado por <i>Kluyveromyces lactis</i>	35
Figura 8 - Velocidade de crescimento específico (μ) dos isolados <i>killer</i> em meio suplementado com SUF fermentado por <i>Kluyveromyces lactis</i>	36

RESUMO

SANT'ANA, Gilzeane dos Santos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2002. **Leveduras com atividade *killer* potencialmente probióticas para suínos.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiras: Célia Alencar de Moraes e Virgínia Maria Chaves Alves.

Foram isoladas 20 leveduras de fezes de leitões recém-nascidos com o objetivo de selecionar espécies com atividade *killer* e potencial probiótico para serem utilizadas como suplemento na alimentação de suínos. Dentre as leveduras analisadas quanto à atividade *killer*, incluiu-se 234 leveduras da micoteca do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do BIOAGRO, isoladas de vários laticínios na região da Zona da Mata. Dos 254 isolados, 9 apresentaram atividade *killer* positiva contra *Cryptococcus laurentii*. Esses isolados *killer* foram selecionados quanto a resistência a 0,3% de sais biliares e ao ácido clorídrico em pH 2,0 e crescimento à temperatura próxima da retal de suínos (39°C). Três isolados (7, P2 e P3) apresentaram melhor desempenho quanto ao teste de resistência a esses obstáculos fisiológicos e seriam os mais indicados para utilização em probióticos para suínos. O soro de queijo ultrafiltrado fermentado por *Kluyveromyces lactis* apresentou potencial prebiótico no crescimento dos isolados em concentrações de 6% (v/v). Os isolados *killer* P2 e P3 associados a 6% (v/v) de soro ultrafiltrado fermentado por *Kluyveromyces lactis*

constituem uma possível estratégia dietética para aumento do desempenho de leitões recém-nascidos.

ABSTRACT

SANT'ANA, Gilzeane dos Santos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, October of 2002. **Killer yeasts with probiotic potential for swine.** Major advisor: Flávia Maria Lopes Passos. Committes members: Célia Alencar de Moraes and Virgínia Maria Chaves Alves.

Yeasts were isolated from three days old piglets faeces in order to select species with killer activity and with probiotic potential for their use as supplement in the swine feeding. Amongst the analyzed yeasts as the killer activity, there were yeasts of the Yeast Collection of the Laboratory of Physiology of Microorganisms of BIOAGRO, isolated from several industries of dairy products. Killer activity against *Cryptococcus laurentii* was screened in 254 yeasts isolate, and nine were selected. Those killer yeasts were then selected by their capacity growth at 0,3% of bile salts, hydrochloric acid (pH 2,0) and at swine rectal temperature. The killer yeast 7, P2 and P3 can be considered as the best among the different strains tested which might be able to tolerate the adverse conditions of the gastrointestinal tract of the pigs and serve as a good agent for use as a microbial feed supplement for swine. The ultra filtered whey fermented by *Kluyveromyces lactis* presented prebiotic potential in the growth of the killer yeast in concentrations of 6% (v/v). The killer yeasts P2 and P3 associated to 6% (v/v) of whey ultra filtered fermented by *Kluyveromyces lactis* constitute a possible dietary strategy for increasing the performance of young pigs.

1. INTRODUÇÃO

Na suinocultura as fases de aleitamento e creche são etapas básicas para a produção economicamente viável. Dentre os problemas dos criadores, destaca-se a redução nos índices de mortalidade dos leitões. Estima-se que esteja entre 10 e 20% a taxa de mortalidade de leitões nas criações brasileiras. A redução da mortalidade depende da aplicação de técnicas adequadas de manejo, higiene e alimentação. O Brasil é o oitavo maior produtor de suínos do mundo, onde 6,86 milhões são produzidos na região Sudeste o que equivale a 18,8% da produção total do país. A região Sudeste é a terceira maior produtora e a segunda maior consumidora de suínos do país, sendo que no estado de Minas Gerais, a região da Zona da Mata concentra a produção do estado e tem se destacado em investimentos com pesquisa e desenvolvimento da suinocultura.

O controle biológico, a partir de microrganismos que venham competir com as bactérias entéricas causadoras de diarreias na microbiota intestinal poderá diminuir a mortalidade dos leitões recém-nascidos. Esse princípio fundamenta-se no uso de probióticos – formulação alimentar que contém microrganismos viáveis administrados na ração com a finalidade de contribuir para o balanceamento microbiano intestinal.

A administração de leveduras na alimentação de leitões na fase de creche tem resultado em melhor adaptação do filhote diminuído a incidência de doenças na fase

seguinte de crescimento. O efeito favorável neste caso pode ser a capacidade de algumas espécies de leveduras apresentarem de secretar a zimocina, glicoproteína tóxica ou toxina *killer* que é tóxica para várias linhagens de leveduras, inclusive patogênicas.

Entre as várias características desejáveis na escolha de uma levedura probiótica, destaca-se a de ser habitante normal do trato intestinal do hospedeiro em potencial. Além disso, as leveduras destinadas a funcionar como probiótico devem sobreviver às barreiras encontradas ao longo do trato gastrointestinal, para que possam colonizar e manter sua atividade.

Outra estratégia para aumentar os microrganismos benéficos da microbiota intestinal é aumentar a população já residente no trato intestinal pelo consumo de uma substância prebiótica. Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento ou da atividade de um ou de um número limitado de espécies benéficas residentes no cólon. Essas substâncias são, em geral, oligossacarídeos como inulina e frutooligossacarídeos. A associação de probióticos e prebióticos parece contribuir para aumentar e estabilizar os efeitos benéficos da ingestão de probióticos. A utilização do soro de queijo como substrato na produção de prebióticos é uma opção ao aproveitamento do seu alto valor funcional e nutricional. Além disso, pode diminuir o impacto ambiental ocasionado pelo descarte indiscriminado na natureza deste resíduo da indústria de laticínios. O soro de queijo ultrafiltrado (SUF) fermentado por *Kluyveromyces lactis* gera oligossacarídeos que podem estimular o crescimento de microrganismos benéficos no intestino grosso.

Este é um trabalho inicial realizado com o objetivo de desenvolver o isolamento de leveduras com atividade *killer* de fezes de leitões, probiótico para alimentação de suínos recém-nascidos com a seleção das melhores culturas para utilização como adjunto dietético e a avaliação do efeito da adição de soro ultrafiltrado fermentado por *Kluyveromyces lactis* no crescimento das culturas selecionadas.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota do Trato Intestinal de Suínos

Em geral, a colonização microbiana ocorre em todas as áreas do trato digestivo dos animais. O papel desta microbiota residente é não somente auxiliar a digestão alimentar (GILLILAND, 1988) como excluir competitivamente patógenos. No trato digestivo existe uma interação entre os microrganismos e entre os microrganismos e seu hospedeiro. As bactérias normalmente encontradas no trato digestivo de suínos são *Bacteroides rumnicola*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrilans*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Eubacterium aerofaciens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* var. *galactosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Peptostreptococcus productis*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus salivarius*, *Veillonellas* sp. e leveduras como, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida* sp. (RUSSEL,1979). A manutenção do equilíbrio ecológico, no trato intestinal, entre esses microrganismos depende das espécies e da concentração dos microrganismos benéficos. De acordo com SAVAGE (1977), muitas estirpes microbianas encontradas no trato gastrointestinal residem em habitats específicos (em áreas fisiológicas definidas). Devido ao fato de o canal alimentar estar aberto para o ambiente externo, algumas estirpes encontradas nele, em dado momento, são transientes e encontram-se no alimento ou em outro elemento

de ingestão. Tais organismos normalmente passam para o trato intestinal e são eliminados sem colonizar uma área particular (SAVAGE e WAYNE, 1987).

O estômago e parte inicial do intestino delgado são isentos de bactérias, contudo, durante as refeições, os alimentos e a saliva entram no estômago, neutralizando o suco gástrico, fazendo com que bactérias veiculadas pelos alimentos sobrevivam por algum tempo. Logo, passam para o intestino delgado e finalmente vão se alojar no intestino grosso (DRASAR, 1969). ROBINSON (1984) isolou do epitélio colínico de suínos normais bactérias gram-positivas, constituindo 71% da microbiota, incluindo *Streptococcus* sp. (54,5%), *L. acidophilus* (8,1%), *L. fermentum* (3,7%). *Bifidobacterium adolescentes* (1,5%), *Eubacterium aerofasciens*, *Peptococcus asacharolyticus* e *Peptostreptococcus productus* (menos de 1% cada). Os organismos gram-negativos compreenderam 29% dos isolados, incluindo *Bacteroides* sp. (18,4%), *S. ruminantium* (4,4%), *Fusobacterium prausnitzii* (2,2%), *Geemiger formicilis* (1,5%), *E. coli* e *Leptotrichia buccalis* (menos de 1% cada).

A microbiota intestinal constitui um sistema ecológico complexo. Nos indivíduos sadios, é estável quanto às características quantitativas e qualitativas e qualquer alteração nessas características ocorre por modificação na dieta alimentar, estresses e pela administração oral de antibióticos, causando um distúrbio intestinal (KORNACKI e MARTH, 1982; TAYLOR, 1980).

A utilização de antibióticos em doses terapêuticas na alimentação animal, visando cura ou a prevenção de doenças, como também a administração de doses mínimas como estímulo à melhoria do rendimento de ganho de peso, tem sido prática de rotina pelos suinocultores.

SMITH (1970) relatou que na Grã-Bretanha permitia-se usar como dieta complementar de suínos, quantidades inferiores a 100 ppm de tetraciclina e penicilina, visando promover o crescimento animal. Existem críticas de higienistas e veterinários contra o emprego de antibióticos na alimentação animal (CROMWELL, 1987; OLIVER *et al.*, 1990). A presença dos antibióticos ocasiona uma seleção rigorosa, que resulta na remoção das estirpes sensíveis do ambiente e na sua substituição pelas estirpes resistentes. O efeito da dieta alimentar contendo tetraciclina em níveis de 4-30 ppm sobre a população de *E. coli* não patogênica, isolada do trato alimentar de 370 leitões provenientes de 37 fazendas, foi comprovado para todas as estirpes de *E. coli*, na maioria dos animais envolvidos na

experimentação, levando à seleção de tetraciclina-resistentes. Estas estirpes foram encontradas em animais do mesmo rebanho, porém sem este antibiótico na dieta alimentar. O autor concluiu que existe transmissão de resistência para estirpes sensíveis (SMITH, 1970).

Nas interações entre a microbiota entérica normal e a patogênica, a microbiota normal atua como mecanismo protetor impedindo o estabelecimento da infecção entérica (HAMDAN e MIKOLAJEIK, 1974). A presença da microbiota intestinal normal tem sido considerada fator significativo na resistência natural a infecções entéricas no homem e em outros animais.

Os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal normal controla a invasão de patógenos no trato intestinal têm sido descritos: produção de bacteriocinas e outras substâncias inibitórias (VINCENT *et al.*, 1959), competição pelo substrato na utilização de fontes energéticas (HAMDAN e MIKOLAJEIK, 1974) e competição pelo sítio de aderência ao epitélio intestinal (KLEEMAN e KLAENHAMMER, 1982).

Os microrganismos benéficos e maléficos competem por espaço no trato digestivo. A mudança de uma unidade no valor de pH intestinal, favorece o crescimento de patógenos reduzindo as bactérias benéficas.

As doenças entéricas em suínos representam um problema complexo, principalmente pela diversidade dos agentes etiológicos envolvidos (BARCELLOS, 1983). KYRIAKIS (1983) relatou que a importância econômica destas doenças tem sido documentada em diversos levantamentos, nos quais *E. coli* apresenta-se com percentual elevado. A diarreia pós-desmame tem sido indicada como fator econômico da criação de suínos em todo mundo. A idade de desmame nestes animais varia geralmente entre a terceira e a quarta semana. A mudança na dieta pode ser a causa direta da diarreia, devido à ocorrência do desbalanceamento da população microbiana intestinal. *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais favorecidos por esta alteração (TAYLOR, 1980). Porém, segundo BAYER (1975), das 160 ou mais estirpes de *E. coli*, apenas algumas causam diarreias em leitões.

SMITH (1963), citado por SAVAGE (1977), relatou que a maioria de estirpes de *E. coli* causadoras de diarreia em suínos produzem β -hemólise, lisando totalmente as hemácias. Cada uma destas linhagens causadoras de diarreia pode ser tipificada e

reconhecida como enteropatogênica e enterotoxigênica (BINDER e POWELL, 1970; WILSON, 1985).

Uma forma possível de se realizar controle da diarreia pós-desmame em suínos é por meio da utilização de culturas lácticas, bactérias bífidas e até mesmo algumas espécies de leveduras (MATHEW *et al.*, 1998).

2.2. Probióticos e prebióticos como adjuntos dietéticos

A introdução de grupos microbianos no hospedeiro é feita por meio da administração de probiótico, definido como suplemento alimentar contendo microrganismos viáveis que afetam benéficamente o hospedeiro pela melhora do balanço da microbiota intestinal (FULLER, 1989).

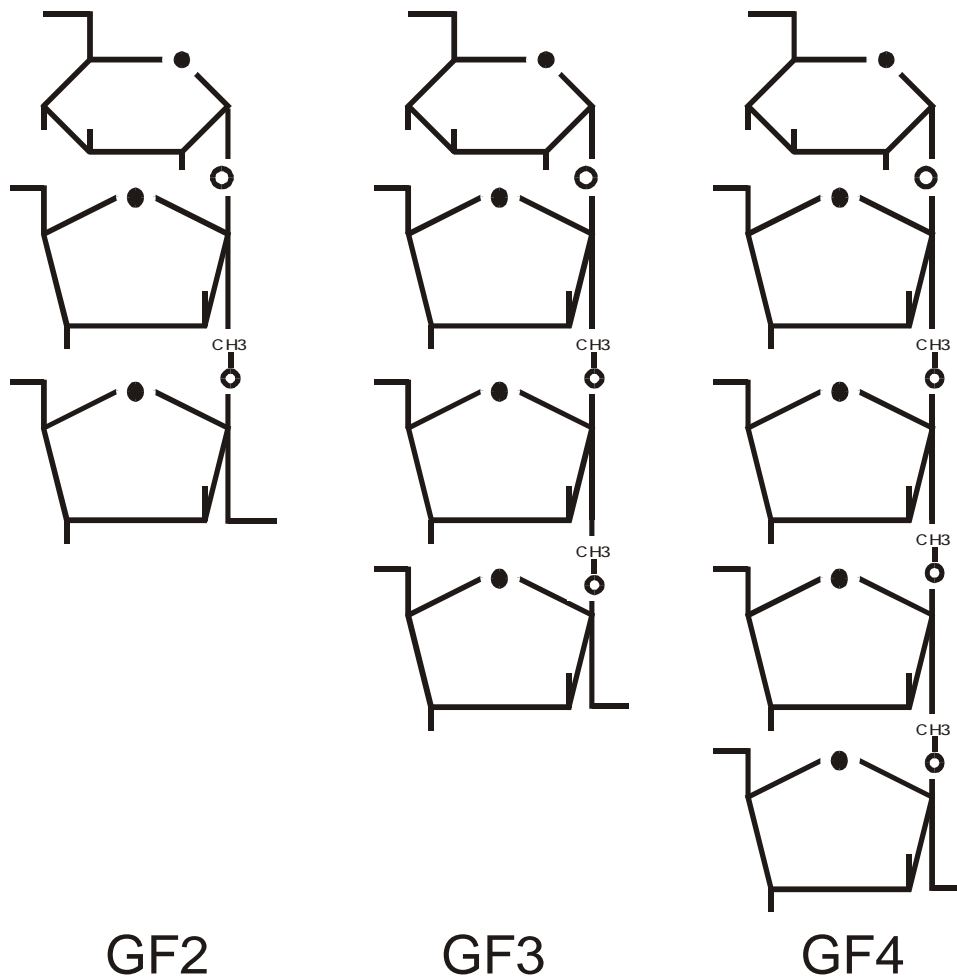
Para serem efetivos, os microrganismos probióticos devem ser criteriosamente selecionados, uma vez que necessitam transpor barreiras até o local em que deverão atuar. Alguns critérios que qualificam microrganismos candidatos na formulação de probióticos, são: i) ter sido isolado do animal a ser utilizado como hospedeiro, ii) biosegurança, iii) resistência ao suco gástrico, iv) resistência à bile. O produto, no momento do consumo deverá conter número elevado do microrganismo probiótico e para isto, este deverá resistir às condições de processamento, isto é, deve manter a atividade e viabilidade. Além disso, o produto probiótico deve apresentar propriedades funcionais, tais como antagonismo a patógenos, estimulação da resposta imune e modulação de certas atividades metabólicas do intestino (HUIS IN'T VELD & SHORTT, 1996).

Em diferentes regiões do trato intestinal, estão presentes grupos específicos de microrganismos benéficos, como bactérias lácticas que atuam no intestino delgado e bactérias bífidas que atuam no intestino grosso, notadamente na região colônica. Uma alternativa para o aumento de bactérias bífidas residentes no intestino é o emprego de prebiótico, definido como ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento ou da atividade de um ou um número limitado de espécies bacterianas já residentes no cólon (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Para um ingrediente alimentar ser considerado prebiótico, não deve ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal; deve promover seletivamente o crescimento e/ou estimular a

atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde e não o de outras bactérias, alterando a microbiota colônica em favor de uma composição mais saudável.

O ingrediente alimentar que atende a esses requerimentos, até o presente momento, são os oligossacarídeos tais como frutooligossacarídeo (FOS) e inulina. O FOS consiste de moléculas de sacarose, nas quais uma, duas ou três unidades de frutose são adicionadas por ligações glicosídicas β -(2-1) ao resíduo de frutose da sacarose (Esquema 1). O grau de polimerização varia de 2 a 10 unidades, abreviados como GF₂ (1- kestose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1^F - β -frutofuranosilnistose). Esses oligossacarídeos derivados da sacarose são encontrados naturalmente em vegetais e plantas como alcachofra, raiz da chicória, dália, dente de leão, cebola, alho e banana. No entanto, as concentrações presentes são baixas exigindo consumo extremamente elevado para obtenção dos efeitos fisiológicos desejados (TOMOMATSU, 1994).

Os FOS podem ser sintetizados enzimaticamente a partir de sacarose ou podem ser extraídos destes alimentos e posteriormente concentrados. A inulina disponível comercialmente no mercado europeu é principalmente extraída da raiz de chicória, e o grau de polimerização desses produtos varia de 11 a 60 unidades monoméricas. Sua hidrólise enzimática com a inulase resulta em FOS. Frutooligossacarídeo pode ser também obtido enzimaticamente a partir de sacarose, por ação de β -frutofuranosidase fúngica e esta é a forma mais comum encontrada no mercado japonês. Prebióticos já são amplamente comercializados no Japão e Europa como adoçantes funcionais, e são utilizados como ingredientes na produção de bebidas lácteas e produtos doces (SPIEGEL *et al.* 1994).



Esquema 1 – Estrutura química da molécula de Frutooligossacarídeo.

Além de FOS e inulina, transgalactooligossacarídeo, lactulose, isomaltoligossacarídeo, xilooligossacarídeo, glicooligossacarídeo e oligossacarídeos de soja também possuem efeito prebiótico, com resultados demonstrados *in vitro* e *in vivo* (GIBSON e FULLER, 2000).

O uso de prebióticos para aumentar bactérias benéficas no cólon tem vantagens sobre o uso de probióticos. As bactérias probióticas consumidas devem sobreviver às condições adversas no estômago e intestino delgado, para adaptar-se ao seu novo ambiente. No cólon, necessitam competir por nutrientes e sítios de colonização com as espécies da microbiota já estabelecidas num determinado habitat físico e metabólico disponível. Em contraste, os prebióticos vão estimular bactérias endógenas específicas do hospedeiro, no seu sítio de colonização, aumentando suas atividades metabólicas através do suprimento de substratos fermentáveis (CRITTENDEN, 1999).

A influência da microbiota intestinal no aumento da biodisponibilidade de minerais, principalmente do cálcio e magnésio demonstraram que o consumo de FOS e inulina pode aumentar a absorção de cálcio no intestino grosso de animais (OHTA *et al.*, 1995, 1998^a e 1998b; MOROHASHI *et al.*, 1998; WOLF *et al.*, 1998; LEVRAT *et al.*, 1994). Muitas hipóteses do mecanismo de absorção de cálcio têm sido propostas. FOS e inulina não são hidrolisados no trato gastrointestinal superior, sendo fermentados pela microbiota colônica. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos pela fermentação, reduzem o pH intestinal, aumentando a concentração de Ca ionizado e a sua difusão passiva. Por outro lado, OHTA *et al.* (1998b) demonstraram que parte do efeito estimulatório de FOS na absorção de cálcio pode ser via mecanismo transcelular no intestino grosso.

A microbiota intestinal contribui na proteção do hospedeiro contra patógenos exógenos, prevenindo o estabelecimento desses microrganismos no trato gastrointestinal. Este efeito é conhecido como “resistência à colonização”, “exclusão competitiva”, ou “efeito barreira” (FULLER, 1999). Distúrbios na microbiota normal, principalmente após tratamento com antibióticos ou radioterapia, podem deixar o hospedeiro vulnerável à colonização por patógenos exógenos, bem como ao aumento do número desses organismos da própria microbiota, uma vez que esses tratamentos podem provocar a eliminação ou decréscimo de certos grupos bacterianos benéficos, favorecendo a proliferação de patógenos em potencial (MITSUOKA, 1982).

Tanto a ingestão de células viáveis de bifidobactéria, como o estímulo do crescimento de bactérias bífidas endógenas pode auxiliar no restabelecimento da microbiota intestinal, reduzindo assim a oportunidade de colonização dos organismos patogênicos. A produção de ácidos orgânicos como ácido acético e láctico, e a concomitante redução do pH, restringem o crescimento de organismos patogênicos e putrefativos, ácido-sensíveis. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o antagonismo de bifidobactéria ao crescimento de enteropatógenos como *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter jejuni* (GOMES e MALCATA, 1999).

Estudos com animais livres de microrganismos comprovaram que as bactérias intestinais têm papel importante na etiologia do câncer de cólon, visto que nestes animais a incidência desse tipo de câncer induzido quimicamente é muito menor que

em animais convencionais. Algumas evidências sugerem a participação de certos microrganismos na tumorigênese. Números elevados de tumores no fígado foram desenvolvidos em camundongos gnotobios associados com *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium paraputrificum*. Entretanto, a proliferação de tumores diminui consideravelmente na presença de probióticos. Os animais livres de microrganismos desenvolveram menor número de tumores que o controle apesar da presença de bactérias indesejáveis. Tem sido sugerido que microrganismos probióticos removam a fonte de pró-carcinógenos ou as bactérias putrefativas possuidoras de enzimas que participam na conversão de compostos carcinogênicos ou pró-carcinogênicos (MITSUOKA, 1982). Além disso, a redução do pH colônico pode diminuir a biodisponibilidade de amins tóxicas, protegendo o cólon contra a carcinogênese (GALLAHER *et al.*, 1996).

Entre os AGCC produzidos pela microbiota, o butirato tem se destacado pela sua contribuição à manutenção da integridade da mucosa colônica. Estudos *in vitro* demonstram que o butirato inibe o crescimento de colonócitos transformados, assim como promove o reparo do DNA celular (TOPPING, 1996).

A administração de FOS e inulina tem demonstrado efeito na redução dos níveis de triacilglicerol sérico em ratos (FIORDALISO *et al.*, 1995, ROBERFROID e DELZENNE, 1998) e humanos (GLORE *et al.*, 1994; CANZI *et al.*, 1995). Um mecanismo proposto para o efeito hipolipidêmico de prebióticos está relacionado à produção de propionato, que inibe a síntese de colesterol hepático (CHEN *et al.*, 1984).

A capacidade da microbiota intestinal em desconjugar ácidos biliares pode também influenciar o nível de colesterol. Os ácidos biliares desconjugados absorvem baixa quantidade de lipídios do trato gastrointestinal quando comparado com ácidos conjugados, aumentando a excreção do colesterol na forma de coprostanol (BRIDGES *et al.*, 1992; KIM e SHIN, 1998). Algumas bactérias lácticas possuem atividade de sais biliares hidrolase (BSH), que desconjugam os sais biliares, além disso, os ácidos biliares desconjugados são menos solúveis em pH mais baixo (pH < 6,0) e precipitam, induzindo a uma co-precipitação do colesterol (KLAVER e MEER, 1993; TAHRI *et al.*, 1995). Essa co-precipitação do colesterol com ácidos biliares desconjugados pode tornar os ácidos biliares indisponíveis para reabsorção no fígado, sendo eliminados nas fezes. Uma vez que os ácidos biliares desconjugados

são eliminados, mais colesterol é requerido para síntese de novos sais biliares no fígado, diminuindo assim os níveis de colesterol sérico.

2.3. Leveduras como probióticos

Entre os microrganismos potencialmente probióticos destinados a melhorar a saúde de animais e humanos também incluem-se algumas espécies de leveduras. Várias interações específicas entre culturas de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e microrganismos entéricos patogênicos como *Escherichia coli* enteropatogênica, *Shigella* e *Salmonella* (GEDEK, 1991) têm demonstrado potencial probiótico daqueles microrganismos. Dentre os efeitos descritos incluem ligação de células patogênicas na membrana de leveduras (DUGUID e ODD, 1980; KORHONEN *et al.*, 1981; RUMELT *et al.*, 1988) e inibição de enterotoxinas produzidas por enterobactérias.

As espécies de leveduras mais utilizadas como probióticos para alimentação animal são, até o momento, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pintolopessi*, *Candida saitoana* e *Saccharomyces boulardii* que é usada também para humanos (BOVILL *et al.*, 2001). O efeito de *Saccharomyces boulardii* sobre os principais patógenos causadores de diarreia em humanos revelaram as principais características bioterapêuticas das leveduras: (1) aumento da resposta intestinal imune contra a toxina A e alteração das toxinas A e B de *Clostridium difficile* e dos respectivos receptores presentes na mucosa intestinal; (2) redução da ação da toxina de cólera pelo *Vibrio cholera* e (3) estabilização da estrutura das membranas das células intestinais afetadas por bactérias enteropatogênicas (CZERUCKA, 2002).

A administração de leveduras na alimentação de leitões recém desmamados tem resultado em melhor adaptação do filhote na próxima fase de crescimento aumentando o percentual de ganho de peso pelo aumento do consumo de alimentos e diminuindo a incidência de doenças (LYONS *et al.*, 1993). O uso de leveduras alcançou importância significativa primeiramente em ruminantes e suínos e atualmente têm sido administradas também na piscicultura. Podem, quando em grandes quantidades, agir como fonte protéica. Ainda podem causar efeitos específicos sobre a atividade da população ruminal (EWING e COLE, 1994). Em níveis baixos (10 – 100g/dia) fungos probióticos têm resultado em melhor

desempenho no ruminante (WALLACE e NEWBOLD, 1992; EWING e COLE, 1994). GIGER-REVERDIN *et al* (1996), por meio do uso de probióticos de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) no início da lactação de cabras sujeitas a dois níveis de consumo de nitrogênio, observaram uma redução no balanço energia/nitrogênio durante seis semanas após o parto. Segundo os autores, o probiótico pareceu aumentar a mobilização das reservas corporais e aumentar a produção de ácidos graxos do leite. Assim a produção de leite com maior teor de gordura aumentou durante o período em que os animais estavam muito susceptíveis ao estresse nutricional.

A produção de poliaminas por leveduras também representa uma condição essencial para seleção de cepas a serem utilizadas como probióticos para adesão no muco intestinal de larvas de peixes. Espécies de *Debaryomyces hansenii* têm demonstrado melhor produção de poliaminas que as linhagens mais utilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* conferindo, com isso, melhor desenvolvimento no intestino (TOVAR *et al.*, 2002).

O fenômeno *killer* em leveduras foi primeiramente descrito por BEVAN e MAKOWER (1963) com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Esses autores verificaram que estas linhagens inibiam o crescimento de leveduras sensíveis da mesma espécie. A atividade *killer* está presente em vários gêneros de leveduras como *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Torulopsis* (PHILLISKIRK, *et al.*, 1975; YOUNG *et al.*, 1982), *Ustilago* (KANDEL *et al.*, 1978), *Rhodotorula* e *Trichosporon* (MORACE *et al.*, 1984), *Hanseniaspora* (RADLER *et al.*, 1985), *Williopsis* e *Zygowilliopsis* (KAZANISAVA *et al.*, 1989; VASTIN *et al.*, 1991) e *Zygosaccharomyces* (RADLER *et al.*, 1993).

As toxinas *killer* (zimocina) de leveduras geralmente possuem de 10 a 20 KDa, mas existem espécies como *Kluyveromyces lactis* e *Pichia anomala* que apresentam toxinas com 100 KDa ou mais. Existem aproximadamente 11 diferentes toxinas *killer* classificadas de acordo com a sensibilidade e resistência. Em geral as toxinas *killer* são sensíveis ao calor e atuam melhor em baixos valores de pH (PFEIFFER e RADLER 1982; RADLER *et al.*, 1985; YOUNG e YAGIU, 1978). Algumas linhagens de *Kluyveromyces lactis* possuem dois plasmídeos lineares de DNA de fita dupla que codificam uma toxina, que é uma glicoproteína, de alto peso molecular formada por três polipeptídeos de 99, 30 e 27,5 KDa denominados alfa,

beta e gama; essa glicoproteína inibe a divisão celular em outras espécies sensíveis de leveduras (LACHANCE e PHAFF, 1987).

O modo de ação das diferentes leveduras *killer* envolve: a toxina *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* que inibe a síntese de macromoléculas (DNA) ou causa danos à membrana plásmatica permitindo a perda de moléculas de ATP e íons potássio (BROWN *et al.* 1993; SHMITT e RADLER 1987, 1988; YOUNG, 1987); a toxina *killer* de *Kluyveromyces lactis* interrompe a fase G1 do ciclo celular de leveduras sensíveis; enquanto a toxina *killer* de *Williopsis saturnus* var. *mrakii* inibe a síntese de β -1-3-glucano (STARK *et al.*, 1990).

Leveduras com atividade *killer* e suas toxinas têm sido amplamente aplicadas. Por exemplo, elas têm sido empregadas como modelo no estudo de mecanismos de regulação no processamento, secreção e recepção de polipeptídeos de células eucarióticas. Já que o sistema *killer* de leveduras é semelhante ao processo de ação e síntese de hormônios e neuropeptídeos de células de mamíferos (CHAN *et al.*, 1979; SOSSIN *et al.*, 1989). Na tecnologia de DNA recombinante, os plasmídeos *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* possuem potencial para serem usados para clonagem de vetores de secreção de polipeptídeos (SUGISAKI *et al.*, 1985; DIGNARD *et al.*, 1991). Em indústrias de alimentos e de produtos fermentados, o potencial *killer* das leveduras empregadas pode impedir a contaminação por outras leveduras indesejáveis durante o processo de fabricação de cerveja (YOUNG *et al.*, 1981), vinho (HARA *et al.*, 1980; BOONE *et al.*, 1990) e pão (BORTOL *et al.*, 1986). YAP *et al.* (2000) avaliaram a atividade *killer* de leveduras contra espécies que prejudicam a fermentação do suco de uva para a fabricação de vinhos causando aroma e sabor indesejáveis, aqueles autores constataram que a toxina *killer* pode ser usada em substituição ao sulfito (SO₂) para melhorar o equilíbrio da microbiota da fermentação do vinho.

Leveduras *killer* também são empregadas no controle biológico de leveduras indesejáveis na conservação de alimentos (PALPACELLI *et al.*, 1991). KITAMOTO *et al.* (1999) verificaram que a adição de *Kluyveromyces lactis* com atividade *killer* modificada geneticamente prolonga a estabilidade aeróbia da silagem de milho pela redução significativa de contaminantes indesejáveis, impedindo o seu apodrecimento. Na área médica, leveduras *killer* são aplicadas, particularmente, na determinação de biotipos de leveduras patogênicas como *Candida albicans*

(POLONELLI *et al.*, 1983) e *Cryptococcus* spp. (MORACE *et al.*, 1989). E em alguns trabalhos leveduras *killer* comprovaram o seu potencial antifúngico no tratamento de infecções em animais e humanos (POLONELLI *et al.*, 1986; HODGSON *et al.*, 1993). WALKER *et al.* (1995) selecionaram leveduras com atividade *killer* contra fungos fitopatogênicos, leveduras patogênicas oportunistas da microbiota intestinal de humanos e contra fungos deterioradores de madeira de grande interesse industrial.

Nas décadas de 50 e 60, segundo VRINGARD (1971), citado por BONEKAMP e OOSTEROM (1994), produziu-se biomassa protéica de elevado valor nutricional como alimento e ração. Essa biomassa constituiu *Kluyveromyces lactis* cultivada em soro de queijo, tendo lactose naturalmente como fonte de carbono. O soro de queijo é uma mistura heterogênea rica de proteínas. Seus principais constituintes são duas pequenas proteínas globulares, que representam 70 a 80% do total das proteínas do soro, as α -lactoglobulinas e β -lactoglobulinas. WANG *et al.* (1997) relataram que β -lactoglobulina tem afinidade por vitamina A e pode também se ligar à vitamina D, funcionando melhor como carreadora desta vitamina. Peptídeos, albumina de soro bovino, lactoferrina, imunoglobulinas, enzimas e fosfolipídeos são os componentes protéicos presentes em menor concentração no soro (SMITHERS *et al.*, 1996). O xarope de glicose e galactose obtido pela hidrólise de lactose e os constituintes do soro podem ser usados como fonte de carbono pela maioria dos microrganismos, aumentando a diversidade de bioprodutos obtidos (SISO *et al.*, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia, instalado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e na Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

3.1 Microrganismos utilizados neste trabalho

Além de leveduras que foram isoladas neste trabalho, outros microrganismos envolvidos foram: leveduras patógenas - *Criptococcus laurentii* e *Rodothorula* sp. - do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG; e isolados de várias indústrias de laticínios da região da Zona da Mata – MG, que fazem parte da coleção de culturas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Todas as leveduras, num total de 256 culturas e *Kluyveromyces lactis*, foram estocadas em suspensão com 30% de glicerol a -80°C e ativadas em meio YEPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%), antes de cada ensaio.

3.2 - Isolamento de leveduras de fezes de suínos recém-nascidos

O material fecal foi obtido de cinco animais sadios com três dias de idade. As fezes foram coletadas após massagens abdominais, provocando a evacuação. O material foi recolhido em placas de Petri estéreis e imediatamente transportado para o laboratório.

Amostras de 1g de fezes foram diluídas em 9 mL de água peptonada (0,1% de peptona) e após agitação em *vortex* por 60 segundos, foram feitas diluições sucessivas até 1:1000. Alíquotas de 1 mL da amostra original e de cada diluição foram plaqueadas em duplicata, em meio YPLC (Extrato de levedura 1%, peptona 2%, lactose 2%, cloranfenicol 0,02%). As placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 72 horas. Colônias de leveduras identificadas sob microscópio foram selecionadas, isoladas e estocadas a -80°C em glicerol (BEECH *et al.*, 1969; ROHM *et al.*, 1992; DIRIYE *et al.*, 1993; TANIWAKI, 1996).

3.3 Seleção das leveduras com atividade *killer*

O ensaio *killer* foi realizado segundo Stumm *et al.*(1997) com algumas modificações. Culturas de leveduras sensíveis à toxina *killer*, *Criptococcus laurentii* e *Rodothorula* sp., em crescimento exponencial e concentração de 10^7 células/ml foram plaqueadas pela técnica "pour-plate" em YEPD – contendo 0,003% p/v de azul de metileno e tamponado com solução citrato-fosfato 0,1 mol/L pH 4,5. Vinte isolados de suínos recém-nascidos e 234 provenientes da indústria de leite foram cultivados em meio líquido YEPD até fase de crescimento exponencial. Em seguida estriadas nas placas previamente inoculadas com os patógenos indicadores e incubadas a 30°C/ 48-96h. A atividade *killer* foi considerada positiva pela formação de um halo azul ou de inibição do crescimento do patógeno ao redor da estria.

3.3.1 Determinação de atividade *killer* de *Kluyveromyces lactis* sobre os isolados *killer* positivos selecionados

Os isolados que apresentaram atividade *killer* contra *Criptococcus laurentii* e *Rodothorula* sp., em crescimento exponencial e concentração de 10^7 células/ml foram

plaqueadas pela técnica "pour-plate" em YEPD – contendo 0,003% p/v de azul de metileno e tamponado com solução citrato-fosfato 0,1 mol/L pH 4,5. *Kluyveromyces lactis* fora cultivada em meio líquido YEPD até fase de crescimento exponencial. Em seguida estriada nas placas previamente inoculadas com os isolados *killer* e incubadas a 30°C/ 48-96h. A atividade *killer* foi considerada positiva pela formação de um halo azul ou de inibição do crescimento do isolado *killer* ao redor da estria.

3.4 Determinação do potencial probiótico *in vitro*

O potencial probiótico das leveduras selecionadas será determinado pelos seguintes fatores: i) crescimento em diferentes temperaturas, ii) avaliação do efeito de pH e iii) determinação do efeito de sais biliares.

Pela regressão linear do logaritmo dos dados obtidos na curva de crescimento determinou-se a velocidade específica de crescimento (μ) para cada isolado nos respectivos meios, utilizando a seguinte fórmula:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

Onde,

$\ln x$ = logaritmo neperiano da absorbância (DO_{600}) da cultura em crescimento no tempo t

$\ln x_0$ = logaritmo neperiano da absorbância da cultura no tempo zero

t = tempo (horas)

μ = velocidade de crescimento específica (h^{-1})

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com três repetições. A velocidade de crescimento específica obtida fora analisada estatisticamente pelo teste "t", no nível de significância de 5% de probabilidade.

3.4.1 Determinação do crescimento populacional em diferentes temperaturas das leveduras selecionadas

As curvas de cinética de crescimento foram obtidas, utilizando-se o meio YEPD (1% extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), em diferentes temperaturas, como 25, 30, 37, 40 e 50°C. Alíquotas de 1 mL, de um total de 30mL

de cada meio, foram retiradas em intervalos de duas horas durante 10 horas de cultivo. Crescimento populacional foi avaliado em espectrofotômetro em densidade ótica (D.O.) de 600nm. Gráficos construídos, convertendo-se os valores de densidade ótica em valores logarítmicos. A velocidade máxima de crescimento (μ) foi calculada a partir da regressão linear do logaritmo neperiano dos dados da fase de crescimento exponencial das culturas.

3.4.2 Avaliação do efeito de pH sobre o crescimento e sobrevivência das leveduras selecionadas

O crescimento de leveduras *killer* positivas em valores de pH 2, 3, 4, 5, 6 e 8 foi avaliado em meio líquido YEPD adicionado de HCl 1N ou NaOH 1N. Culturas em fase exponencial de crescimento em meio YEPD foram repicadas 0,1% da cultura na concentração de 10^7 células/mL no mesmo meio e amostras coletadas periodicamente foram analisadas quanto à concentração de células em espectrofotômetro a 600nm. A resistência a baixos valores de pH foi avaliada pela velocidade máxima de crescimento determinada pela regressão linear das medidas tomadas e a resistência ao valor de pH 2, pela contagem de células viáveis realizada imediatamente e 120 minutos após a inoculação, em ágar YPD.

3.4.3 Determinação do efeito de sais biliares sobre o crescimento das leveduras selecionadas

Os isolados *killer* positivos foram avaliados quanto à capacidade de crescimento na presença de bile. Culturas em fase exponencial de crescimento em meio YEPD foram repicadas 0,1% da cultura na concentração de 10^7 células/mL no mesmo meio suplementado com 0,3% p/v de *oxgall* (Difco) e incubadas a 37°C. O crescimento foi acompanhado por medidas periódicas de absorvância.

3.5 Avaliação da capacidade de utilização de lactose como única fonte de carbono pelas leveduras selecionadas

Os isolados *killer* positivos foram cultivados em meio ágar mineral mínimo (0,6% NaNO₃, 0,15% KH₂PO₄, 0,05% KCl, 0,024% MgSO₄, 0,001% FeSO₄, 0,001% ZnSO₄) com 2% de lactose e suplementados de 0,2% de extrato de levedura. Foram incubados em duplicatas a 30°C por 72 horas.

3.6 Preparo e Biotransformação do Soro de Queijo

O soro de queijo mussarela proveniente do Instituto de Laticínios Cândido Tostes – Juiz de Fora (MG) e ultrafiltrado em membrana de 10KDa de exclusão molecular, foi aquecido até fervura, adicionado de 0,4% de citrato de sódio para solubilizar proteínas remanescentes, decantado e autoclavado por 10 minutos.

Este substrato foi inoculado com culturas de *K. lactis* adaptadas e em fase de crescimento exponencial em concentração inicial de 10⁷ células/mL e incubado a 30°C a 250 rpm por 20 horas. As células foram separadas por filtração e o sobrenadante testado quanto seu potencial prebiótico.

3.7 Avaliação do potencial prebiótico do soro de queijo biotransformado

O soro de queijo biotransformado foi incorporado ao meio de cultivo das leveduras *killer* selecionadas (YNB sem aminoácidos 1,34% e 2% de glicose) e o seu efeito no crescimento foi avaliado como descrito anteriormente. A concentração de soro biotransformado no meio foi de 3, 6 e 9% (v/v). O experimento foi repetido três vezes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Leveduras isoladas de fezes de leitões

Depois de sucessivas estrias para obtenção de culturas puras e visualização ao microscópio óptico, foram selecionadas 20 culturas de leveduras isoladas de fezes de leitões, com média de 4 isolados por leitão.

4.2. Leveduras com atividade *killer* selecionadas

Um total de 254 isolados foram testados quanto à atividade *killer*, sendo 20 isolados dos leitões recém-nascidos e 234 isolados de laticínios. A atividade *killer* contra *Cryptococcus laurentii* e *Rodothorula* sp. foi detectada em 9 dos isolados testados, 2% dos isolados da indústria de laticínios e 25% dos isolados de fezes dos leitões, segundo figura 1. Os maiores halos de inibição foram verificados pela ação dos isolados L122, proveniente de laticínios, e P16 e P17 provenientes dos leitões recém-nascidos. Verifica-se que proporcionalmente a ocorrência de isolados *killer* provenientes das fezes foi maior que entre os isolados da indústria de laticínios. Tal fato confirma estudos ecológicos que indicam que a atividade *killer* é um mecanismo de competição entre as leveduras de um mesmo habitat (STARMER *et al.*, 1987; MORAIS *et al.*, 1995). A atividade *killer* apresentada pelos isolados provenientes das fezes de suínos pode ser um potencial para o estabelecimento de algumas

espécies de leveduras na microbiota inicial do recém-nascido. A presença de atividade *killer* dos isolados a serem utilizados como probióticos também é importante pela ação contra outras leveduras no intestino, ocasionando a liberação de nutrientes pela lise das células biodisponibilizando tanto para o hospedeiro quanto para os microrganismos presentes.

A atividade *killer* destes isolados poderia ser testada contra bactérias patogênicas de suínos, como por exemplo, *E. coli* enteropatogênica e *Clostridium* sp, já que algumas espécies de leveduras apresentaram atividade *killer* também contra bactérias.

4.2.1 Atividade *killer* de *Kluyveromyces lactis*

A atividade *killer* de *Kluyveromyces lactis* contra os isolados *killer* positivos selecionados foi positiva apenas contra o isolado P3. A *Kluyveromyces lactis* pode ser capaz de produzir toxina *killer* durante o cultivo em soro de queijo ultrafiltrado e inibir, após adição do sobrenadante, o crescimento dos isolados sensíveis.

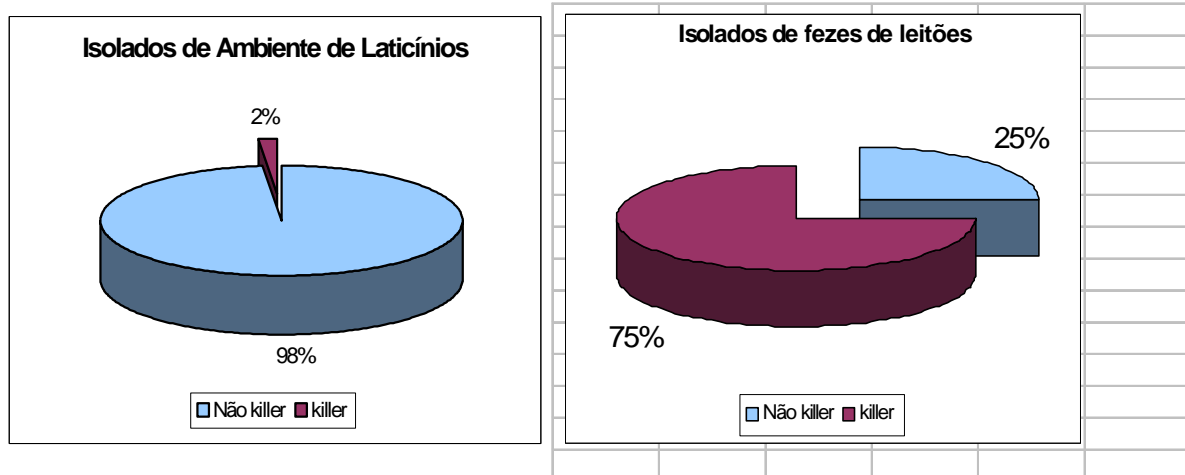


Figura 1 – Porcentagem de leveduras provenientes da indústria de laticínios e de fezes de leitões que apresentaram atividade *killer* contra os indicadores *Criptococcus laurentii* e *Rodothorula* sp.

4.3. Características probióticas de leveduras com atividade *killer* selecionadas

4.3.1. Capacidade de crescimento em diferentes temperaturas

A comparação do parâmetro velocidade de crescimento específica entre os 9 isolados de leveduras *killer* crescidos em meio YPD em temperaturas de 25, 30, 37, 40 e 50°C está apresentada na Figura 2.

A temperatura ótima de crescimento dos isolados está em torno de 30°C, sendo que para os isolados L7, P2, P3 e P6 não houve diferença significativa entre as temperaturas de 30, 37 e 40°C, ao nível de 5% de significância.

A temperatura retal de suínos recém nascidos é aproximadamente 39°C, logo as leveduras testadas neste experimento são capazes de resistir à temperatura elevada encontrada na passagem do trato gastrointestinal dos leitões. Os isolados que apresentaram melhor crescimento em meio YPD a 40°C foram, em ordem decrescente, L68, L7, L13, P2, P6 e P3.

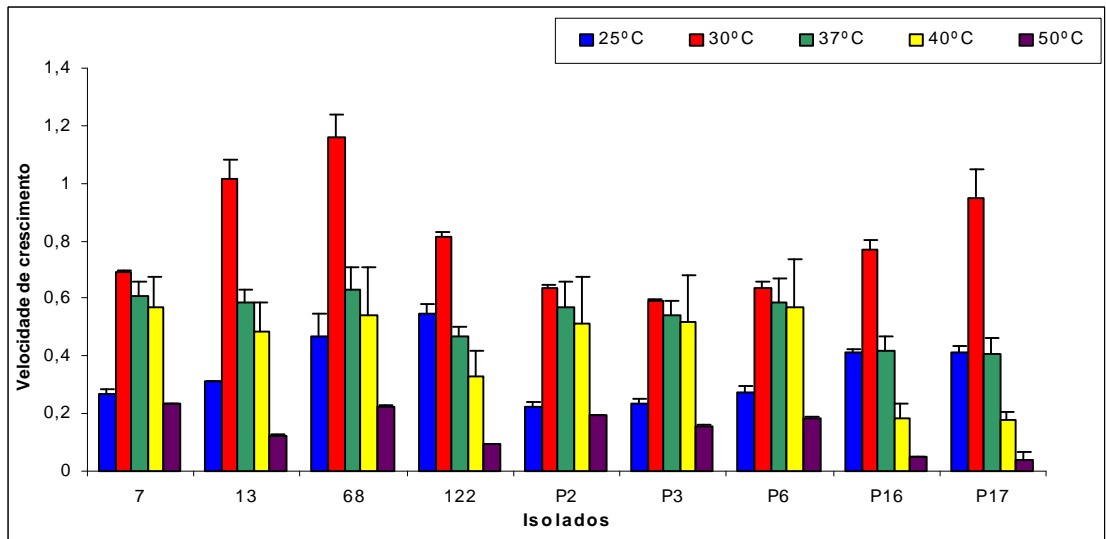


Figura 2 - Velocidade específica de crescimento (μ) de leveduras com atividade *killer* cultivadas em meio YPD a 25°C, 30°C, 37°C, 40°C e 50°C.

4.3.2. Crescimento na presença de sais biliares

Os resultados dos 9 isolados de leveduras *killer* crescidos em meio YPD contendo 0,3% de bile (oxgall) estão apresentados na Figura 3.

Os isolados P17, P16, L122, P2 e P6 foram os que melhor responderam à presença de sais biliares, isto é, todos com crescimento acima de 90% em relação ao controle, nesta ordem.

O resultado da velocidade específica de crescimento (μ) dos isolados encontram-se na Figura 4.

Verificou-se que a velocidade específica de crescimento dos 9 isolados estudados variou de 0,47 a 0,62 h⁻¹. Os isolados L7, L13, L68, 122, P2 e P6 não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) na velocidade específica de crescimento em presença de sais biliares quando comparada ao controle, indicando que a presença de bile não alterou a velocidade normal de crescimento desses organismos.

Na seleção de lactobacilos resistentes a bile, uma cultura que apresente crescimento em presença de 0,3% de oxgall, igual ou superior a 20% daquele obtido com o controle (meio YPD sem oxgall), é considerada resistente (REIS *et al.*, 1998). Estabeleceu-se no entanto resistência de 50% (mais que o dobro da normalmente indicada para *Lactobacillus*) no processo de seleção de leveduras potencialmente probióticas.

A bile bovina possui maior atividade antimicrobiana que as soluções de sais biliares de humanos e de outros animais (MARTEAU *et al.*, 1997). Portanto, as estirpes selecionadas com bile bovina neste experimento, podem apresentar maior resistência tanto à bile humana quanto à bile de suínos.

Por outro lado, o estresse dos sais biliares às leveduras no trato gastrointestinal é mais complexo que as condições *in vitro*, pois a concentração da bile não é estática ao longo do trato gastrointestinal e o tempo de residência da digesta varia em cada segmento. Sintetizados no fígado a partir do colesterol, os ácidos biliares são liberados da vesícula biliar para o duodeno na sua forma conjugada (cerca de 500 a 700 mL/dia). No jejuno, a concentração de ácidos biliares é cerca de 10 mmol/L e no íleo a concentração diminui para cerca de 4 mmol/L devido a sua absorção ativa (MARTEAU *et al.*, 1997).

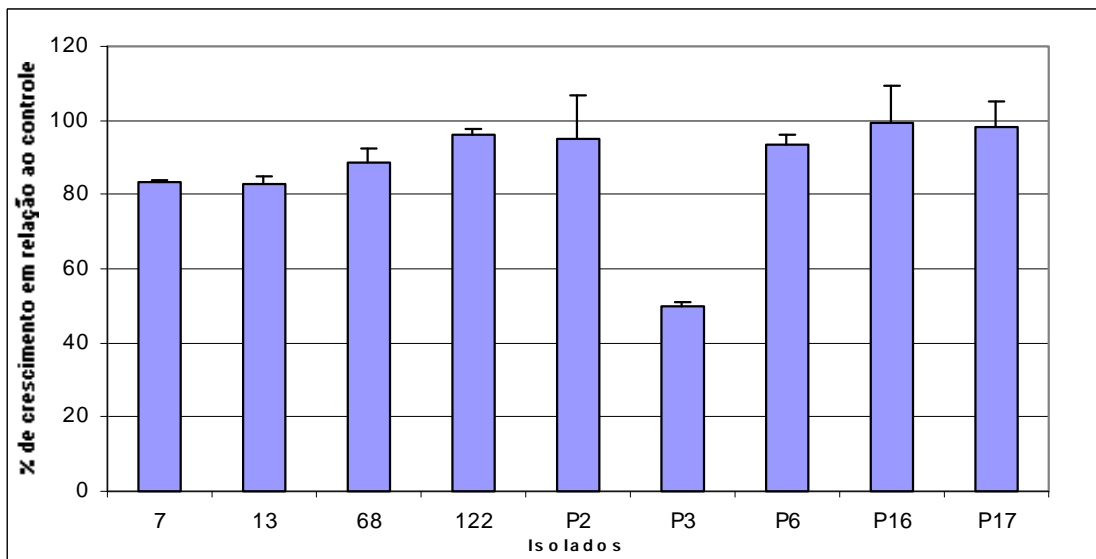


Figura 3 – Crescimento relativo de leveduras em meio YPD contendo 0,3% de sais biliares, em relação ao controle, após 12 horas de incubação.

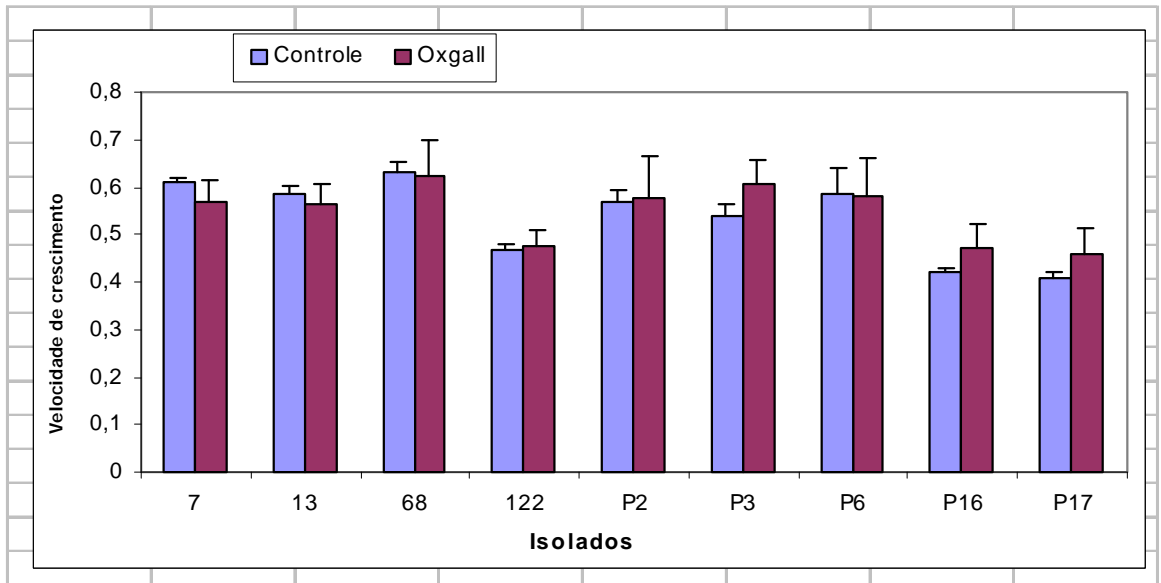


Figura 4 – Velocidade específica de crescimento (μ) de leveduras *killer* cultivados em meio YPD (controle) e em meio YPD adicionado de 0,3% de bile (Oxgall).

No cólon, em particular, os ácidos biliares sofrem intensa modificação química (desconjugação, desidroxilação, desidrogenação e desglucoronização), principalmente por ação de bactérias, e tanto os ácidos biliares conjugados como os desconjugados exibem atividade antimicrobiana, sendo que as formas desconjugadas são mais inibitórias sobre algumas espécies bacterianas (DUNNE *et al.*, 1999).

A resistência à bile é importante para possibilitar melhor atuação desses microrganismos como probióticos, uma vez que esta é reconhecidamente uma das barreiras fisiológicas presentes no trato gastrointestinal.

No presente trabalho, todos os isolados foram resistentes à bile (0,3% de oxgall), implicando que individualmente ou combinadas podem vir a ser empregado como probiótico. As leveduras exibem maior resistência a sais biliares que a maioria das bactérias estudadas, no trabalho de AGARWAL (2000) linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram resistentes a 0,9% de sais biliares, que pode estar relacionado à presença de quitina na composição da parede celular de leveduras.

4.3.3. Crescimento e sobrevivência na presença de diferentes concentrações de pH dos isolados *killer*

A velocidade de crescimento (μ) dos isolados *killer* em diferentes concentrações de ácido clorídrico está representada na Figura 5.

Os isolados L7, L13, L68, L122, P2, P3, P6, P16 e P17 foram capazes de crescer em pH 3, mas em pH 2 os isolados *killer* apresentaram velocidades de crescimento mínimos. O melhor valor de pH para crescimento de todos os isolados foi pH 3, exceto L122.

A sobrevivência dos isolados *killer* em meio YPD com pH 2, por 120 minutos, está apresentada na Figura 6. Os isolados L7, P2, P3 e P6 mantiveram os níveis iniciais de 10^7 UFC/mL após 120 minutos em presença de meio com pH 2. No entanto, verifica-se que o isolado P3, apesar de resistente à condição ácida, foi o menos resistente à bile. A variação da resistência das leveduras às diferentes barreiras evidencia a importância do emprego de mais de uma estirpe na composição de um probiótico. Os isolados L7, L13, L68, L122, P16 e P17 mostraram-se mais

sensíveis apresentando menos de 90% de sobrevivência após 120 minutos de exposição a pH 2.

O suco gástrico de suínos recém-nascidos apresenta um pH de aproximadamente 3 e durante os primeiros meses torna-se mais baixo até atingir valores próximos à 2,5. Deve-se considerar também que em determinadas condições o pH gástrico pode ser menor e a resistência pode ser diminuída. Porém, considerando-se que o veículo carreador de organismos probióticos geralmente é o leite desnatado e seus derivados, que exibem efeito tamponante além de aumentar o pH gástrico, a resistência pode ser aumentada devido à influência de substâncias protetoras presentes nesses produtos (CLARK *et al.*, 1993).

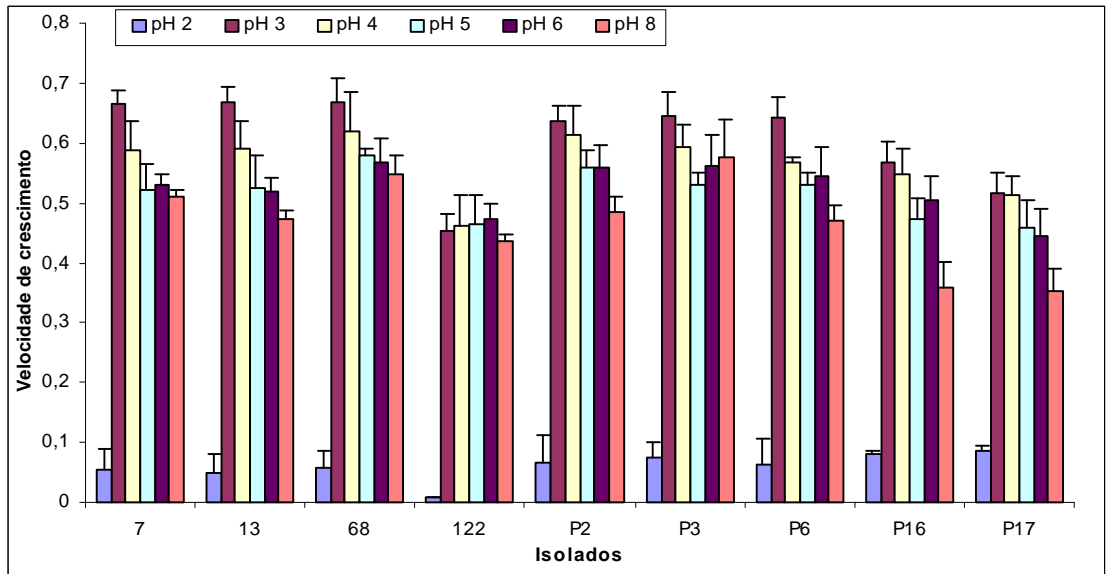


Figura 5 – Velocidade de crescimento específico (μ) de leveduras *killer* cultivadas em meio YPD em valores de pH 2, 3, 4, 5, 6 e 8 (ajustados com HCl 1N).

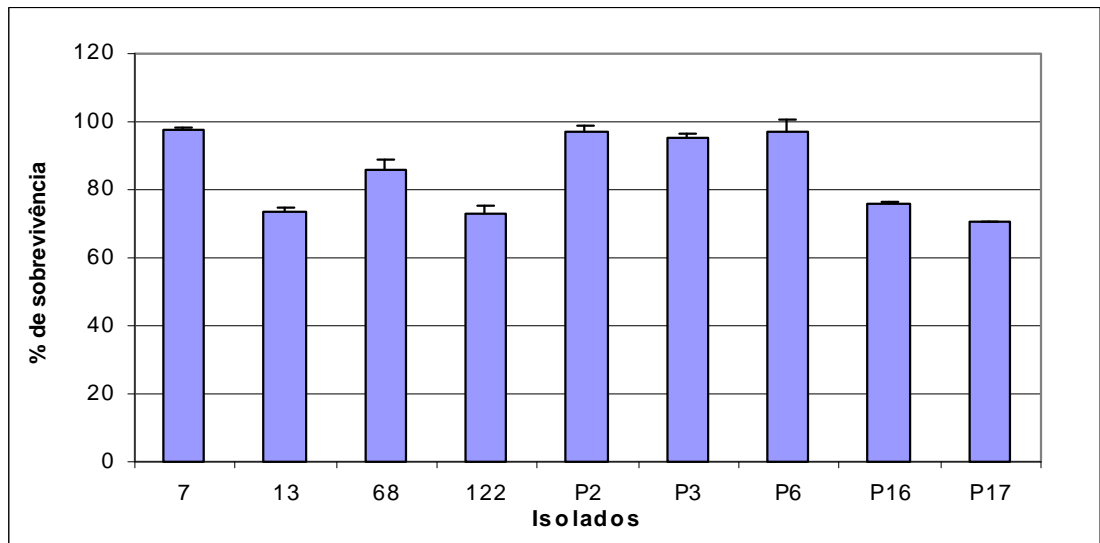


Figura 6 - Sobrevivência de leveduras *killer* em meio YPD (pH 2) após 120 minutos.

Outro fator a ser considerado é o tempo de esvaziamento gástrico que varia em função da composição do alimento consumido e da hora em que foi ingerido. Se o produto probiótico for ingerido juntamente com outros itens alimentícios ou com uma refeição, o tempo de retenção no estômago pode ser aumentado e conseqüentemente pode diminuir a sobrevivência dos organismos probióticos (CLARK *et al.*, 1993). Portanto, a seleção de estirpes ácido resistentes é importante na avaliação do potencial das leveduras *killer* para utilização como probiótico, uma vez que a levedura probiótica necessita atravessar o estômago antes de atingir seu alvo, o intestino.

Considerando-se as condições fisiológicas *in vitro* do trato gastrointestinal como um todo, as estirpes P2 e P3 de levedura *killer* testadas neste trabalho apresentando potencial para serem utilizadas como probióticos possuem resistência ao suco gástrico, à temperatura retal e à presença de sais biliares para que um número suficiente de leveduras viáveis atinja o intestino.

4.4. Capacidade de assimilação de lactose

Dos 9 isolados *killer* testados quanto à capacidade de crescimento em lactose como única fonte de carbono, apenas o isolado P6 não foi capaz de crescer em lactose. Verificou-se neste trabalho que as culturas L7, P2 e P3 fermentam lactose e apresentaram melhor desempenho aos obstáculos fisiológicos investigados, logo seriam as mais indicadas para utilização em ração probiótica animal, com maior probabilidade para atingir as regiões onde deverão atuar.

4.5. Potencial prebiótico do soro biotransformado

Os resultados dos 9 isolados de leveduras *killer* cultivados em meio mínimo (YNB sem aminoácidos) adicionado de 2% de glicose como controle e os tratamentos contendo 3, 6 e 9% de soro ultrafiltrado (SUF) fermentado por *Kluyveromyces lactis* estão apresentados na Figura 7.

Na avaliação do efeito estimulatório do soro ultrafiltrado biotransformado, o isolado *killer* que apresentou um crescimento igual a 20% ou superior aquele obtido no controle, é considerado positivo. Verifica-se na Figura 7 que os isolados L7, L13, L68 e P17 não apresentaram estímulo no crescimento pela adição de SUF biotransformado. No entanto os isolados L122, P2, P6 e P16 tiveram crescimento superior a 20% em meio contendo 3% de SUF biotransformado, mas tiveram o crescimento inibido em concentrações de 6 e 9% de SUF biotransformado.

As velocidades de crescimento específicas (μ) dos isolados *killer* em meio mínimo suplementado com SUF estão representadas na Figura 8.

O isolado P3 foi o que apresentou maior acréscimo na velocidade específica de crescimento em relação ao controle com a adição de 3 e 6% de SUF biotransformado, mas em concentração de 9% de SUF biotransformado observou-se considerável inibição do crescimento em relação ao controle deste isolado. Essa inibição pode ter sido ocasionada pela sensibilidade do isolado P3 à atividade *killer* de *Kluyveromyces lactis* verificada anteriormente. *Kluyveromyces lactis* pode ter produzido uma toxina *killer* durante a fermentação do soro que foi capaz de inibir o crescimento do isolado P3, pela adição de 6% e 9% do sobrenadante.

Verificou-se que as velocidades específicas de crescimento dos isolados L7, L13, L68, L122, P2, P3, P16 e P17 não apresentaram aumento significativo ($P > 0,05$) na concentração de 3% de SUF biotransformado quando comparada ao controle, exceto o isolado P6 que apresentou um significativo estímulo na velocidade específica de crescimento nesta concentração.

Os isolados L7, L13, L68, L122, P3, P6, P16 e P17 apresentaram aumento significativo em relação ao controle em concentrações de 6 e 9% de SUF biotransformado, mas não apresentaram diferença significativa entre as duas concentrações. O isolado P2 aumentou significativamente a velocidade de crescimento na concentração de 6% de SUF biotransformado mas apresentou forte

inibição na velocidade de crescimento em concentrações de 9% de SUF biotransformado.

A melhor concentração de SUF biotransformado por *Kluyveromyces lactis* avaliada para estimular o crescimento dos isolados *killer* selecionados, L7, P2 e P3 pelo potencial probiótico, foi de 6%.

Cultivar os isolados *killer* em soro de queijo ultrafiltrado fermentado por *Kluyveromyces lactis* pode ser uma alternativa para aumentar seu poder prebiótico.

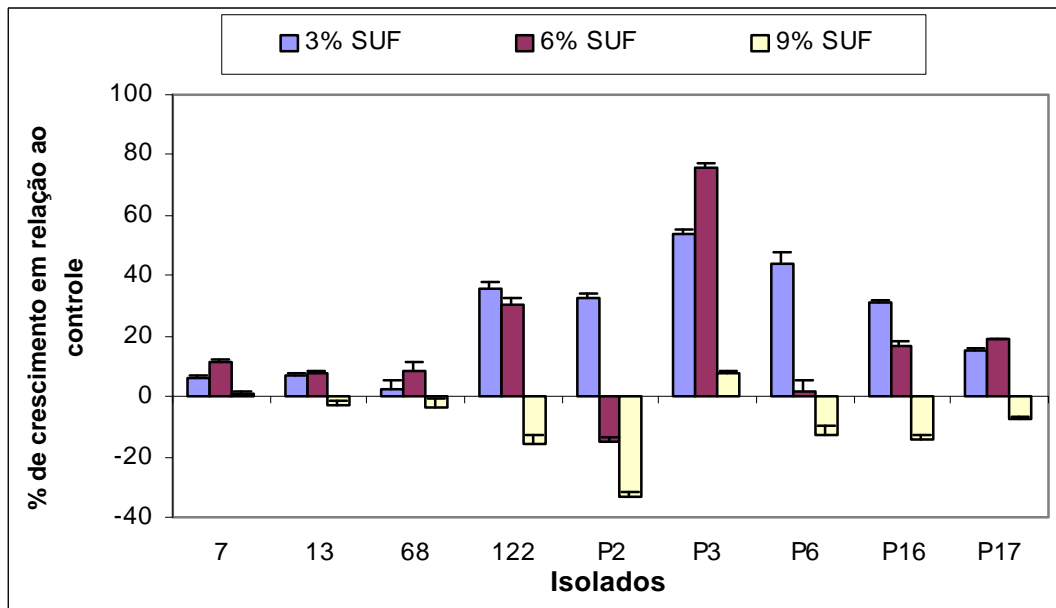


Figura 7 – Variação percentual na população final em relação ao controle de leveduras *killer* em meio YNB contendo 3%, 6% e 9% de SUF fermentado por *Kluyveromyces lactis*, após 12 horas de incubação.

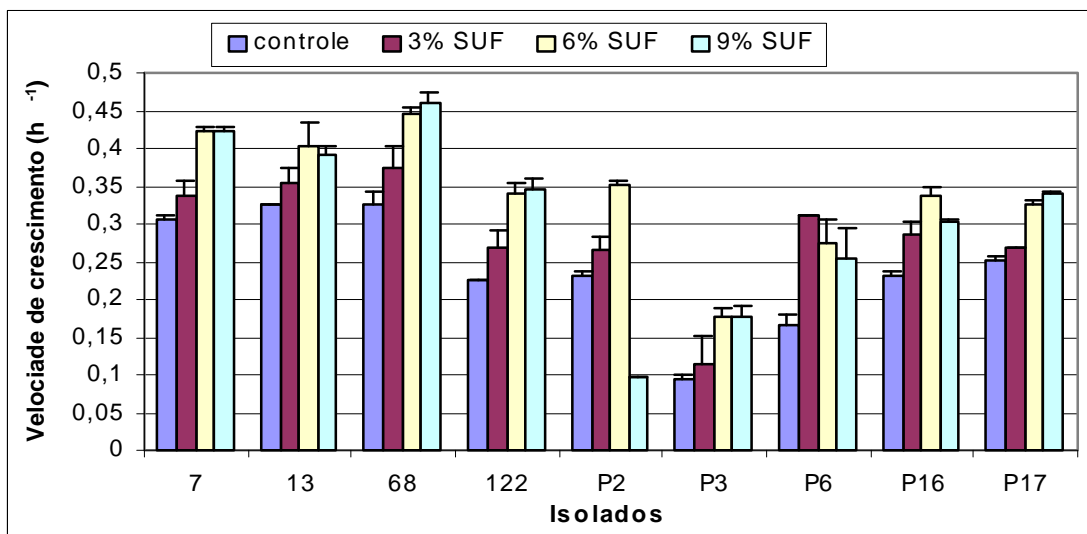


Figura 8 – Velocidade de crescimento específico (μ) dos isolados *killer* em meio YNB suplementado com 3%, 6% e 9% de SUF fermentado por *Kluyveromyces lactis*.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Culturas de leveduras foram isoladas de amostras de fezes de leitões recém-nascidos da Universidade Federal de Viçosa. Essas culturas juntamente com isolados de laticínios pertencentes à micoteca do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do BIOAGRO foram submetidas a testes de atividade *killer* contra o indicador *killer* patogênico *Cryptococcus laurentii*. De um total de 254 isolados (20 isolados provenientes de fezes de leitões e 234 isolados de laticínios), apenas 9 isolados exibiram teste *killer* positivo, esses isolados foram testados quanto à capacidade de crescimento e resistência à presença de ácido clorídrico, de sais biliares e crescimento em temperaturas elevadas.

Dos 9 isolados *killer* de leveduras, 3 isolados (L7, P2 e P3) apresentaram resistência a 0,3 % de sais biliares, a temperatura retal de suínos (39°C) e a ácido clorídrico - pH 2, em níveis variados, sendo que uma mistura dessas culturas poderia ser utilizada probiótico. No entanto, os isolados P2 e P3 são provenientes de fezes de leitões e seriam os melhores candidatos para utilização como suplemento para leitões.

Dos 9 isolados apenas o isolado P6 não é capaz de crescer em meio mínimo contendo lactose como única fonte de carbono.

A concentração de 6% de soro ultrafiltrado biotransformado por *Kluyveromyces lactis* foi o que melhor estimulou o crescimento dos isolados P2 e P3 indicados para utilização como probióticos.

Além das características probióticas estudadas neste trabalho, outras devem ser testadas *in vitro* antes da administração animal, como: capacidade de inibição de toxinas produzidas por bactérias patogênicas e proteção de células epiteliais intestinais contra a ação de enterobactérias.

O poder probiótico dos isolados P2 e P3 e prebiótico do soro ultrafiltrado biotransformado só poderá ser confirmado com testes *in vivo* em leitões recém nascidos, mas a resistência destes isolados às condições fisiológicas e o grande potencial do soro ultrafiltrado biotransformado como prebiótico puderam ser comprovados neste experimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, N.; KAMRA, L. C.; CHAUDHARY, A.; PATHAK, N. N. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for use as a microbial feed additive. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 270-273, 2000.

BARCELLOS, D. E. S. N. Diarréias em suínos, etiologia, diagnósticos e controle. **Suinocultura Industrial**, v. 51, p. 4-10, 1983.

BAYER. Diarréias em suínos. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 22 jun. 1975. P. 6. (Suplemento agrícola)

BEECH, F. W.; DAVENPORT, R. R. - The isolation of non-pathogenic yeasts. **Isolation Methods for Microbiologists Academic Press**, p.71-88, 1969.

BEVAN, E. A. & MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **In Proceedings of the Eleventh International Congress of Genetics** ed. Goerts, S. J., v. 1, p. 202-203, 1963.

BINDER, H. J. & POWELL, D. W. Bacterial enterotoxins and diarrhea. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 12, p. 1582-1587, 1970.

BONEKAMP, F. J. & OOSTEROM, J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 41, p. 1-3, 1994.

BOONE, C.; SDIEU, A. M.; WAGNER, J.; DEGRE, R.; SANCHEZ, C. and BUSSEY, H. Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification. **American Journal of Enology Vit**, v. 41, p. 37-42, 1990.

BORTOL, A.; NADEL, C.; FRAILK, E.; DE TORRES, R.; GLOLETTI, A.; SPENCER, J. F. T. and SPENCER, D. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 414-416, 1986.

BRIDGES, S. R.; ANDERSON, J. W.; DEAKINS, D. A.; DILLON, D. W.; WOOD, C. L. Oat bran increases serum acetate of hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 455-459, 1992.

CHEN, W. J. L.; ANDERSON, J. W.; JENNINGS, D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. **Biology of Medicine**, v. 175, p. 215-218, 1984.

CLARK, P. A.; COTTON, L. N.; MARTIN, J. H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II – tolerance to simulated pH of human stomachs. **Culture Dairy Products Journal**, v. 28, p. 11-14, 1993.

CRITTENDEN, R. G. Prebiotics. In: TANNOCK, G. W. (Ed.). **Probiotics – a critical review**. England: Horizon Scientific Press, 1999, p. 141-156.

CROMWELL, G. L. The swine industry: the road for word. In: LYONS, T. P. ed. **Biotechnology in the feed industry**, p. 317-329, 1987.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. - Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, 2002.

DIGNARD, D.; WHITEWAY, M.; GERMAIN, D.; TESSIER, D. e THOMAS, D. Y. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. **Molecular Gen. Genetics**, v. 227, p. 127-136, 1991.

DIRIYE, F. U.; SCORZETTI, G.; MARTINI, A. - Methods for the separation of yeasts cells from the surfaces of processed, frozen foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.19, p.27-37, 1993.

DRASAR, B. S.; SHINER, M.; Mc LEOD, G. M. Studies on the intestinal flora. **Gastroenterology**, v. 56, p. 71-79, 1969.

DUGUID, P. & ODD, D. C. Adhesive properties of *Enterobacteriaceae*. In bacterial adherence, ed. E. H. Beachey, **Receptors and Recognition Series B6**, p. 185-217, 1980.

DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'MAHONY, L.; O'HALLORAM, S.; FEENEY, M.; MORISSEY, D.; THORNTON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; QUIGLEY, E. M. M.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and human clinical trials. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 279-292, 1999.

EWING, W. N. & COLE, D. J. A. **The living gut**. Contex. Co Tyrone, N. Ireland. 1994. 220pp.

FIORDALISO, M.; KOK, N.; DESAHER, J. P.; GOETHAIS, F.; DEBOYSER, D.; ROBERFROID, M.; DELZENNE, N. Dietary oligofrutose lowers triglicerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins in rats. **Lipids**, v. 30, p. 163-167, 1995.

FULLER, R. A review – probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. - Probiotics in human medicine, **Gut**, v. 32, p. 439-442, 1991.

FULLER, R. Modulation of intestinal microflora by probiotics. In Hanson L. A and Yolken, R. H. (Ed). **Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora**. Nestlé Nutrition Workshop Series, Nestec Ltd., Vevey/ Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, v. 42, p. 33-45, 1999.

GALLAHER, D. D.; STALLINGS, W. H.; BLESSING, L. L.; BUSTA, F. F.; BRADY, L. J. Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. **Journal Nutrition**, v. 126, p. 1362-1371, 1996.

GEDEK, B. R. Regulierung der Darmflora über die Nahrung. **Zbl. Hyg.**, v. 191, p. 277-301, 1991.

GIGER-REVERDIN, S.; BEZAULT, N.; SAUVANT, D.; et al. Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level. **Animal Feed Science Technology**, v. 63, p. 149 – 162. 1996.

GILLILAND, S. E. Probiotics: fact or fancy? In: **International Biotechnology symposium**, Paris, Societé Française de Microbiologie, v. 2, p. 923-933, 1988.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R.; FULLER, R. - Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal Nutrition**, v. 130, p. 391s-395s, 2000.

GOMES, A. M. P. & MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trend Food Science Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

HADAN, J. I. & MIKOLAJEIK, E. M. Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 27, p. 8, 1974.

HARA, S. & IMURA, Y. & OTSUKA, K. Breeding of useful killer wine yeasts. **American Journal of Enology**, v. 31, p. 28-33, 1980.

HODGSON, V. J. Anti-*Candida* activity of killer toxins from the yeast *Williopsis mrakii*. PhD Thesis. **Dundee Institute of Technology**, Scotland, 1993.

HUIS IN'T VELD, J. H. J. & SHORTT, C. Selection criteria for probiotic microorganisms. In: LEEDS, A. R., ROWLAND, I. R. (Ed). **Gut Flora and Health-past, present and future**. International Congress and Symposium Series 219. Royal Society of Medicine press Limited. 1996, p. 27-36.

KANDEL, J. & KOLTIN, Y. Killer phenomenon in *Ustilago maydis*: comparison of killer proteins. **Exp. Mycology**, v. 2, p. 270-278, 1978.

KAZANISAVA, D. L. & ZIMINA, M. S. Yeast killer strains with a broad spectrum of activity: search of collection strains and preliminary identification. **Microbiology**, v. 58, p. 230-235, 1989.

KIM, M. & SHIN, H. K. The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentration and fecal lipid excretion in rats. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1731-1736, 1998.

KLAVER, F. A. M. & VAN DER MEER, R. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1120-1124, 1993.

KLEEMAN, E. G. & KLAENHAMMER, T. R. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal ceels. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 2063-2069, 1982.

KORHONEN, T. K.; LEFFLER, H. and SVANBORG EDEN, C. Binding specificity of piliated strains of *Escherichia* and *Salmonella typhimurium* in epithel cells, *Saccharomyces cerevisiae* cells, and erythrocytes. **Infection Immunity**, v. 32, p. 769-804, 1981.

KORNACKI, J. L. & MARTH, E. H. Food-borne illness caused by *Escherichia coli*: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 1051-1065, 1982.

KYRIAKYS, S. C. Post-weaning syndrome (PWDS) of piglets. A new therapeutic approach with the supporting therapy (5th). **Pig News and Information**, v. 4, p. 23-27, 1983.

KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. - **The yeasts: A taxonomic study**, 4^a-ed., 1055p., 1997.

KITAMOTO, H. K.; HASEBE, A.; OHMOMO, S.; SUTO, E. G.; MURAKI, M.; IIMURA, Y. - Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified *killer yeast*, *Kluyveromyces lactis*, defective in the ability to grow on lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4697-4700, 1999.

LEVRAT, M. A.; FAVIER, M. L.; MOUNDRAS, C.; RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C.; MORAND, C. Role of dietary propionic acid and bile acid excretion in the hypocholesterolemic effects of oligossaccharides in rats. **Journal Nutrition**, v. 124, p. 531-538, 1994.

LYONS, T. P.; JACQUES, K. A.; DAWSON, K. A. - Miscellaneous products from yeast: in the yeasts. **Yeast Technology**, v.5, p.293-324, 1993

MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Survival of lactic acid bacteria in dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1031-1037, 1997.

MATHEW, A. G.; UPCHURCH, W. G. and CHATTIN, S. E. Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 429-434, 1998.

MITSUOKA, T. Recent trends in research on intestinal flora. **Bifidobacteria and Microflora**, v. 1, p. 3-24, 1982.

MORACE, G.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M. e POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system. **Mycopathology**, v. 84, p. 81-85, 1984.

MORACE, G.; MANZARA, S.; DETTORI, G.; FANTI, F.; CONTI, S.; CAMPANI, I.; POLONELLI, I. and CHEZZI, C. Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system. **European Journal Epidemiology**, v. 5, p. 303-310, 1989.

MORAIS, P. B.; MARTINS, M. B.; KLACZKO, L. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. and HAGLER, A. N. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* resource partitioning among *Drosophila* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4251-4257, 1995.

MOROHASHI, T.; SANO, T.; OHTA, A.; YAMADA, S. The calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. **Journal Nutrition**, v. 128, p. 1815-1818, 1998.

NAKASAWA, Y. & HOSONO, A. - Functions of Fermented Milk. Challenges for the Health Sciences. **Elsevier Applied Science**, Londres, Inglaterra, 1992.

OHTA, A. OHTSUKI, M.; BABA, S.; ADAICHI, T.; SAKATA, T.; SAKAGUCHI, E. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. **Journal Nutrition**, v. 125, p. 2417-2424, 1995.

OHTA, A.; MOTOHASHI, Y.; OHTSUKI, M.; HIRAYAMA, M. ADACHI, T.; SAKUMA, K. Dietary fructooligasaccharides change the concentration of calbin-

D9k differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. **Journal Nutrition**, v. 128, p. 934-939, 1998a.

OHTA, A.; OHTSUKI, M.; ADACHI, T.; HARA, H.; SAKATA, T. Dietary fructooligosaccharides prevent osteopenia after gastrectomy in rats. **Journal Nutrition**, v.128, p. 106-110, 1998b.

OLIVER, S. P.; MALK, J. L.; DOWELEN, H. H. Antibiotic residues in milk following antimicrobial therapy during lactation. **Journal of Food Protection**, v. 33, p. 693-696, 1990.

PALPACELLI, V.; CIANI, M. and ROSINI, G. Activity of different killer yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. **FEMS Microbiology Letters**, v. 84, p. 75-78,1991.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITIO, M. and MORACE, G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **Journal Clinical Microbiology**, v. 17, 774-780, 1983.

POLONELLI, L.; LORENZINI, R.; DE BERNARDIS, F. and MORACE, G. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. **Mycopathology**, v. 96, p. 103-107, 1986.

PFEIFFER, P. & RADLER, F. Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* isolate 28. **Journal Genetics Microbiology**, v. 128, p. 2699-2706, 1982.

PHILLISKIRK, G. & YOUNG, T. W. The occurrence of killer character in yeast of various genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 43, p. 125-128, 1975.

RADLER, F.; PFEIFFER, P. and DENNART, M. Killer toxins in new isolates of the yeast *Hanseniaspora nvarum* and *Pichia kluyveri*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 19, p. 269-272, 1985.

RADLER, F.; HERZBERGER, S.; SEHONIG, I. and SCHOVARZ, P. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces barla*. **Journal of Genetics Microbiology**, v. 139, p. 495-500, 1993.

REIS, F. G.; WOLF, B.; LIMA, R. B.; SANTOS, D. A.; NEVES, C. S.; SALVA, T. J. G.; MORENO, I.; LERAYER, A.L. S. Seleção de bactérias lácticas resistentes a sais biliare. **Anais do XV Congresso Nacional de Laticínios**, p. 102-107, 1998.

RIORDAN, K. O. & FITZGERALD, G. F. - Evaluation of bifidobacteria for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in cottage cheese at refrigeration temperature. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 103-114, 1998.

ROHM, H. R.; LECHNER, F. L.; BRÄUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.370-376, 1992.

ROBISON, J. M.; WHIPP, S. C.; BUCKLIN, J. A; ALLISON, M. J. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 964-969, 1984.

RUMELT, S.; METZGER, Z.; KARIV, N. and ROSENBERG, M. Clearance of *Serratia marcescens* from blood in mice: role of hydrophobic versus mannose-sensitive interactions. **Infection Immunity**, v. 56, p. 1167-1170, 1988.

RUSSEL, E. G. Types and distribution of anaerobic bacteria in the longe intestine of pigs. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 37, p. 187-193, 1979.

SAGISAKI, Y.; GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K.; YAMISAKI, M. and TAMURA, G. Transfer of DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis* to *Kluyveromyces fragilis* and *Candida pseudotropicalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 164, p. 1373-1375, 1985.

SAVAGE, D. C. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. **Food Technology**, v. 41, p. 82-87, 1987.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of gastrointestinal tract. **Animal Reviews Microbiology**, v. 31, p. 107, 1977.

SCHMITT, M. & RADLER, F. Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* isolate 28. **Journal Genetics Microbiology**, v. 133, p. 3347-3354, 1987.

SCHMITT, M. & RADLER, F. Molecular structure of the cell wall receptor for the killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Bacteriology**, v. 170, p. 2192-2196, 1988.

SISO, M. I. G.; CERDAN, E.; PICOS, M. A. F. Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for milk whey saccharification: a comparison of different treatments. **Biotechnology Techniques**, v. 6, p. 289-292, 1992.

SMITH, W. H. Effect of antibiotics on bacterial ecology in animals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 23, p. 1472-1479, 1970.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1454-1459, 1996.

SOSSIN, W. S.; FISHER, J. M. and SCHELLER, P. H. Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. **Neuron**, v. 2, p. 1407-1417, 1980.

SPIEGEL, J. E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V. H.; SCHMITT, D. F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v.48, p. 85-89, 1994.

STARMER, W. T.; GANTER, P. F.; ABERDEEN, V.; LACHANCE, M. and PHAFF, H. J. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 783-796, 1987.

STARK, M. J. R.; BOYD, A.; MILEHAM, A. J.; ROMANOS, M. A. - The plasmid-encoded *killer* system of *Kluyveromyces lactis* : a review. **Yeast**, v. 6, p.1-29, 1990.

STUMM, C.; HERMANS, M. H.; MIDDELBEEK, E. J.; CROES, A. F.; DDE VIRES, G. J. M. L. - *Killer*-sensitive relationships in yeast from natural habitats. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 43, p. 125-128, 1977.

TAHRI, K.; CROCIANI, J.; SCHNEIDER, F. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. **Letters Applied Microbiology**, v. 21, p. 149-151, 1995.

TANIWAKI, M. H. - Meios de cultura para contagem de fungos em alimentos. **Boletim SBCTA**, v.30(2), p.132-141, 1996.

TAYLOR, D. Y. Post weaning diarrhea. **Pig diseases**. 14 ed, p.300, 1980.

TOMOMATSU,H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 48, p. 61-65, 1994.

TOOPING, D. L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, v. 5, p. 15-19, 1996.

YAP, N. A.; LOPES, M. B.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. - The incidence of *killer* activity of non-Saccharomyces yeast towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p381-389, 2000.

YOUNG, T. W. & YAGIU, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 44, p. 59-77, 1978.

YOUNG, T. W. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. **Journal Institute Brew.**, v. 87, p. 292-295, 1981.

YOUNG, T. W. The properties of brewing performance of brewing yeasts possessing killer character. **Journal Am. Soc. Brew. Chemistry**, v. 42, p. 1-4, 1982.

YOUNG, T. W. Killer yeasts: in the yeasts. **Yeasts and the Environments**, v. 2, p. 131-164, 1987.

VASTIN, M. M.; DABLEVE, J. P.; RESHETOVA, I. S.; SHENYAKINS, T. M. e SINNEKIL, S. F. Use of the sensitivity of the basidiomycete yeasts to the killer toxin of *Williopsis praiensis* for taxonomic differentiation. **Microbiology**, v. 60, p. 239-242, 1991.

VINCENT, J. G.; VEOMETT, R. G.; RILEY, R. F. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 4, p. 477-484, 1959.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Rumen fermentation and its manipulation: The development of yeast cultures as feed additives. In: LYONS, T. P. **Biotechnology in the feed industry**. Nicholasville, Alltech Technical Publications, p. 173-192, 1993.

WALKER, G. M.; McLEOD, A. H. and HODGSON, V. J. Interaction between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 127, p. 213-222, 1995.

WANG, Q.; ALLEN, J. C.; SWAISGOOD, H. E. Binding of Vitamin D and cholesterol to α -gactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1054-1059, 1997.

WILSON, M. Diarréia suína causada pela Escherichia coli. **Suincultura Industrial**, v. 76, p. 26-29, 1985.

WOLF, B. W.; FIRKINS, J. L.; ZHANG, X. Varying dietary concentrations of fructooligosaccharides effect apparent absorption and balance of minerals in growing rats. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1791-1806, 1998.

WU, J. F. The microbiologist's function in developing action-specific microorganisms. In LYONS, T. P. ed. **Biotechnology in the Feed Industry**. Nicholasville, Alltech Technical Publications, v. 3, p. 181-197, 1987.

APÊNDICE

Quadro 1A. Dados da velocidade de crescimento específica () obtidos na curva de crescimento dos isolados *killer* em diferentes temperaturas, sob 250rpm de agitação.

Isolados		Temperatura				
		25°C	30°C	37°C	40°C	50°C
7	1		0,671	0,661	0,669	0,237
	2	0,239	0,685	0,601	0,469	0,234
	3	0,267	0,669	0,568	0,603	
	Média	0,253	0,675	0,610	0,580	0,235
	DP	0,020	0,009	0,047	0,102	0,002
13	1		1,063	0,633	0,631	0,128
	2	0,311	0,987	0,546	0,430	0,121
	3	0,313	0,927	0,573	0,555	
	Média	0,312	0,992	0,584	0,539	0,125
	DP	0,001	0,068	0,044	0,102	0,005
68	1		1,126	0,718	0,728	0,226
	2	0,404	1,279	0,572	0,401	0,223
	3	0,519	1,220	0,603	0,519	
	Média	0,462	1,208	0,631	0,549	0,224
	DP	0,082	0,077	0,077	0,166	0,002
122	1		0,809	0,508	0,372	0,096
	2	0,562	0,815	0,445	0,227	0,097
	3	0,522	0,842	0,446	0,390	
	Média	0,542	0,822	0,467	0,330	0,097
	DP	0,029	0,018	0,036	0,089	0,001
P2	1		0,606	0,670	0,661	0,195
	2	0,218	0,631	0,494	0,346	0,195
	3	0,237	0,626	0,547	0,545	
	Média	0,227	0,621	0,570	0,517	0,195
	DP	0,013	0,013	0,090	0,159	0,000
P3	1		0,582	0,583	0,667	0,153
	2	0,239	0,572	0,485	0,347	0,156
	3	0,216	0,567	0,553	0,548	
	Média	0,228	0,574	0,540	0,521	0,154
	DP	0,017	0,008	0,050	0,162	0,003
P6	1		0,668	0,659	0,685	0,188
	2	0,289	0,616	0,500	0,354	0,186
	3	0,259	0,639	0,542	0,532	
	Média	0,274	0,641	0,567	0,523	0,187
	DP	0,021	0,026	0,083	0,166	0,002
P16	1		0,728	0,477	0,108	0,059
	2	0,407	0,780	0,397	0,168	0,060
	3	0,422	0,793	0,384	0,206	
	Média	0,415	0,767	0,419	0,161	0,060
	DP	0,011	0,034	0,050	0,049	0,001
P17	1		1,084	0,468	0,136	0,024
	2	0,403	0,956	0,386	0,176	0,060
	3	0,428	0,883	0,369	0,189	
	Média	0,415	0,974	0,407	0,167	0,042
	DP	0,017	0,102	0,053	0,028	0,025

Quadro 2A. Velocidade de crescimento específica () obtidos na curva de crescimento dos isolados *killer* em meio YPD (controle) e meio YPD adicionado de 0,3% de oxgall (Oxgall), a 37°C sob 250rpm de agitação.

Isolados		Controle		Oxgall
7	1	0,661	1	0,611
	2	0,601	2	0,597
	3	0,568	3	0,496
	Média	0,610	Média	0,568
	DP	0,047	DP	0,063
13	1	0,633	1	0,606
	2	0,546	2	0,582
	3	0,573	3	0,501
	Média	0,584	Média	0,563
	DP	0,044	DP	0,055
68	1	0,718	1	0,673
	2	0,572	2	0,644
	3	0,603	3	0,549
	Média	0,631	Média	0,622
	DP	0,077	DP	0,065
122	1	0,508	1	0,525
	2	0,445	2	0,505
	3	0,446	3	0,394
	Média	0,467	Média	0,474
	DP	0,036	DP	0,070
P2	1	0,670	1	0,648
	2	0,494	2	0,612
	3	0,547	3	0,467
	Média	0,570	Média	0,576
	DP	0,090	DP	0,096
P3	1	0,583	1	0,455
	2	0,485	2	0,419
	3	0,553	3	0,363
	Média	0,540	Média	0,412
	DP	0,050	DP	0,046
P6	1	0,659	1	0,658
	2	0,500	2	0,576
	3	0,542	3	0,504
	Média	0,567	Média	0,580
	DP	0,083	DP	0,077
P16	1	0,477	1	0,508
	2	0,397	2	0,495
	3	0,384	3	0,408
	Média	0,419	Média	0,470
	DP	0,050	DP	0,054
P17	1	0,468	1	0,504
	2	0,386	2	0,485
	3	0,369	3	0,390
	Média	0,407	Média	0,460
	DP	0,053	DP	0,062

Quadro 3A. Logaritmo neperiano da absorbância (ln D.O.₆₀₀) dos isolados *killer* em meio YPD (controle) e meio YPD adicionado de 0,3% de oxgall (Oxgall) após 12h de incubação a 37°C sob 250rpm de agitação.

Isolados	Tempo 0		Tempo 12h		%12h
	Controle	Oxgall	Controle	Oxgall	
7	-2,238	-1,973	2,141	2,213	83,52
13	-2,139	-1,811	2,101	2,212	82,92
68	-2,238	-1,994	2,116	2,228	88,71
122	-1,397	-1,359	2,087	2,213	96,25
P2	-2,645	-2,509	1,819	1,750	95,04
P3	-2,594	-1,283	1,718	1,416	50,17
P6	-2,589	-2,539	1,832	2,054	93,23
P16	-1,405	-1,297	1,792	2,104	99,29
P17	-1,419	-1,287	1,699	1,890	98,04

Quadro 4A. Dados da velocidade de crescimento específica () obtidos na curva de crescimento dos isolados *killer* em diferentes valores de pH, sob 250rpm de agitação.

Isolados		pH					
		2	3	4	5	6	8
7	1	0,031	0,642	0,585	0,561	0,512	0,501
	2	0,079	0,689	0,638	0,531	0,528	0,519
	3		0,666	0,541	0,472	0,547	0,513
	Média	0,055	0,666	0,588	0,521	0,529	0,511
	DP	0,034	0,024	0,049	0,045	0,018	0,009
13	1	0,026	0,660	0,590	0,575	0,506	0,472
	2	0,071	0,696	0,638	0,536	0,546	0,462
	3		0,651	0,544	0,467	0,509	0,489
	Média	0,048	0,669	0,591	0,526	0,520	0,474
	DP	0,032	0,024	0,047	0,055	0,022	0,013
68	1	0,036	0,628	0,612	0,592	0,523	0,509
	2	0,077	0,709	0,689	0,576	0,602	0,564
	3		0,664	0,561	0,570	0,576	0,566
	Média	0,056	0,667	0,620	0,580	0,567	0,547
	DP	0,029	0,040	0,064	0,011	0,040	0,032
122	1	0,010	0,426	0,403	0,512	0,452	0,427
	2	0,008	0,485	0,500	0,465	0,501	0,433
	3		0,449	0,484	0,418	0,468	0,449
	Média	0,009	0,453	0,462	0,465	0,474	0,436
	DP	0,001	0,030	0,052	0,047	0,025	0,011
P2	1	0,036	0,655	0,617	0,582	0,559	0,507
	2	0,098	0,646	0,660	0,568	0,524	0,488
	3		0,606	0,567	0,526	0,598	0,456
	Média	0,067	0,635	0,615	0,559	0,560	0,484
	DP	0,044	0,026	0,047	0,030	0,037	0,026
P3	1	0,058	0,686	0,553	0,526	0,549	0,528
	2	0,092	0,641	0,625	0,551	0,520	0,646
	3		0,606	0,606	0,514	0,619	0,557
	Média	0,075	0,644	0,594	0,530	0,563	0,577
	DP	0,024	0,040	0,037	0,019	0,051	0,062
P6	1	0,032	0,679	0,577	0,517	0,516	0,499
	2	0,093	0,637	0,567	0,552	0,520	0,451
	3		0,615	0,563	0,525	0,602	0,461
	Média	0,063	0,644	0,569	0,531	0,546	0,471
	DP	0,043	0,033	0,007	0,018	0,048	0,026
P16	1	0,074	0,471	0,458	0,459	0,441	0,343
	2	0,085	0,531	0,533	0,471	0,390	0,367
	3		0,531	0,527	0,405	0,470	0,286
	Média	0,079	0,511	0,506	0,445	0,434	0,332
	DP	0,007	0,034	0,042	0,035	0,041	0,042
P17	1	0,080	0,477	0,482	0,495	0,451	0,375
	2	0,092	0,531	0,519	0,474	0,397	0,372
	3		0,542	0,542	0,407	0,488	0,310
	Média	0,086	0,517	0,514	0,459	0,445	0,352
	DP	0,009	0,035	0,030	0,046	0,046	0,037

Quadro 5A. Sobrevivência dos isolados *killer* em meio YPD (pH 2), expressos em Log UFC/mL, após 120 minutos.

Isolados		T0	T120	%120
7	1	7,400	7,210	97,43
	2	7,340	7,200	98,09
	3	7,360	7,150	97,15
	Média	7,367	7,187	97,56
	DP	0,031	0,032	0,49
13	1	7,390	5,350	72,40
	2	7,320	5,460	74,59
	3	7,240	5,370	74,17
	Média	7,317	5,393	73,72
	DP	0,075	0,059	1,17
68	1	7,380	6,500	88,08
	2	7,200	6,300	87,50
	3	7,130	5,900	82,75
	Média	7,237	6,233	86,11
	DP	0,129	0,306	2,92
122	1	7,310	5,150	70,45
	2	7,330	5,320	72,58
	3	7,250	5,470	75,45
	Média	7,297	5,313	72,83
	DP	0,042	0,160	2,51
P2	1	7,380	7,050	95,53
	2	7,400	7,300	98,65
	3	7,390	7,200	97,43
	Média	7,390	7,183	97,20
	DP	0,010	0,126	1,57
P3	1	7,400	7,050	95,27
	2	7,450	7,010	94,09
	3	7,350	7,100	96,60
	Média	7,400	7,053	95,32
	DP	0,050	0,045	1,25
P6	1	7,220	7,160	99,17
	2	7,490	7,000	93,46
	3	7,350	7,300	99,32
	Média	7,353	7,153	97,32
	DP	0,135	0,150	3,34
P16	1	7,020	5,350	76,21
	2	7,310	5,480	74,97
	3	7,120	5,400	75,84
	Média	7,150	5,410	75,67
	DP	0,147	0,066	0,64
P17	1	7,050	5,000	70,92
	2	7,350	5,140	69,93
	3	7,450	5,220	70,07
	Média	7,283	5,120	70,31
	DP	0,208	0,111	0,54

Quadro 6A. Dados da velocidade de crescimento específica () obtidos na curva de crescimento dos isolados *killer* em meio YNB com 2% de glicose (controle) e meio YNB com 2% de glicose adicionado de 3, 6 e 9 % de SUF fermentado por *Kluyveromyces lactis*, a 37°C sob 250rpm de agitação.

Isolados	Controle	%SUF			
		3%	6%	9%	
7	1	0,305	0,321	0,418	0,419
	2	0,316	0,352	0,427	0,428
	Média	0,310	0,336	0,422	0,423
	DP	0,007	0,021	0,007	0,006
13	1	0,327	0,341	0,424	0,400
	2	0,326	0,368	0,380	0,385
	Média	0,326	0,355	0,402	0,393
	DP	0,001	0,019	0,031	0,010
68	1	0,338	0,355	0,452	0,451
	2	0,312	0,394	0,439	0,470
	Média	0,325	0,374	0,445	0,461
	DP	0,018	0,027	0,009	0,013
122	1	0,225	0,285	0,350	0,334
	2	0,226	0,252	0,330	0,357
	Média	0,225	0,268	0,340	0,345
	DP	0,001	0,023	0,014	0,016
P2	1	0,235	0,255	0,354	0,097
	2	0,229	0,279	0,347	0,097
	Média	0,232	0,267	0,350	0,097
	DP	0,004	0,017	0,006	0,000
P3	1	0,097	0,091	0,199	0,167
	2	0,090	0,140	0,214	0,186
	Média	0,093	0,116	0,206	0,177
	DP	0,005	0,035	0,011	0,014
P6	1	0,177	0,360	0,295	0,281
	2	0,157	0,361	0,252	0,225
	Média	0,167	0,361	0,274	0,253
	DP	0,014	0,001	0,031	0,040
P16	1	0,235	0,275	0,277	0,305
	2	0,230	0,298	0,296	0,299
	Média	0,233	0,286	0,286	0,302
	DP	0,004	0,016	0,013	0,004
P17	1	0,246	0,267	0,319	0,342
	2	0,255	0,267	0,330	0,340
	Média	0,250	0,267	0,324	0,341
	DP	0,006	0,000	0,008	0,002

Quadro 7A. Absorbância (D.O.₆₀₀) dos isolados *killer* em meio YND com 2% de glicose (controle) e meio YND com 2% de glicose adicionado de 3, 6 e 9% de SUF fermentado por *Kluyveromyces lactis* após 12h de incubação a 37°C sob 250rpm de agitação.

D.O.600 máxima após 12h				
Isolados	Controle	3%	6%	9%
7	2,771	3,533	4,038	4,039
13	3,158	3,728	3,968	3,969
68	3,294	3,727	3,999	3,999
122	1,466	1,911	2,843	2,843
P2	0,540	0,844	0,651	0,651
P3	0,424	0,477	0,990	0,991
P6	0,482	0,758	0,740	0,741
P16	2,099	2,497	3,542	3,542
P17	2,428	2,476	3,565	3,566

Varição percentual populacional			
Isolados	3%	6%	9%
7	6,01	11,13	0,72
13	6,61	7,61	-2,87
68	2,60	8,68	-3,30
122	35,49	30,14	-15,64
P2	32,52	-14,71	-33,55
P3	54,12	76,08	7,42
P6	44,10	1,99	-12,73
P16	31,03	16,85	-13,91
P17	15,10	18,66	-7,28