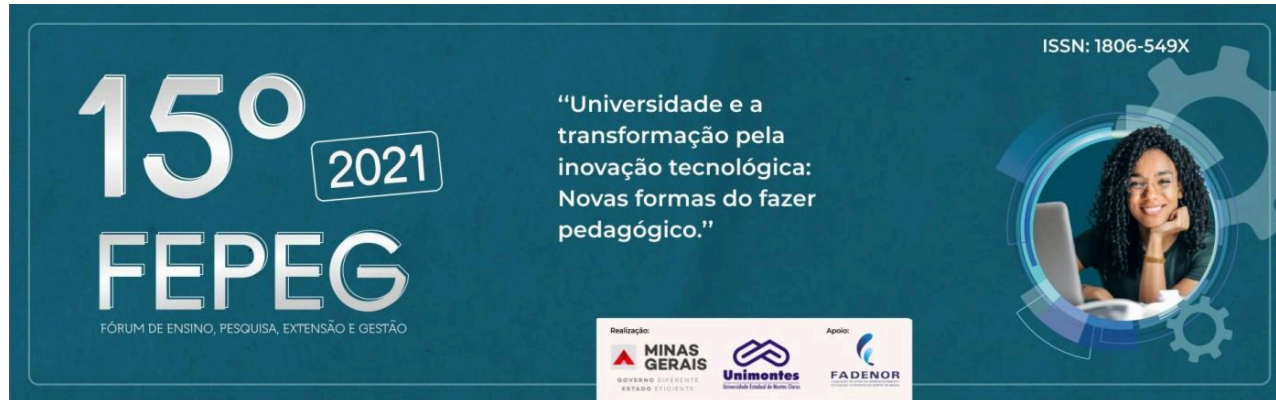




AUTOR(ES): MILENA NASCIMENTO SANTOS, DAILANE AMARAL DE ALMEIDA, THALITA EMANUELLE SOUSA LIMA, JULIANA KÁTIA LOPES ARAÚJO RODRIGUES, MARIANA SANTANA VERSIANI e HENRIQUE MAIA VALÉRIO.
ORIENTADOR(A):

DOMESTICAÇÃO DE LINHAGENS DE LEVEDURAS SELVAGENS SUBMETIDAS A ESTRESSE OSMÓTICO, ETANÓLICO E TÉRMICO

Introdução

As leveduras são microrganismos eucariotos e unicelulares que pertencem ao reino dos fungos. Apesar das diversas aplicações biotecnológicas, a competência em degradar compostos orgânicos produzindo etanol e CO₂ em um processo denominado de fermentação, é o que faz este microrganismo se destacar no campo industrial (TADESSE et al., 2019).

É conhecida uma grande diversidade de espécies de leveduras, mas são as do gênero *Saccharomyces* as que dominam a fermentação industrial para produção de bioetanol e de bebidas como vinho, cachaça e cerveja (WENDLAND, 2014). Todavia, a produção de bebidas fermentadas fornece a esse microrganismo um ambiente hostil para seu desenvolvimento por meio de combinações de estresses, como osmótico, alta concentração de etanol, mudanças na temperatura e estresse ácido (LEGRAS et al., 2018), que somados a reutilização das células por várias vezes contribui para a redução da eficiência das mesmas na fermentação.

A necessidade de ter células que tolerem tais variações demonstra ser de suma importância para a indústria, e a domesticação é uma ferramenta capaz de superar esses estresses. Gallone e colaboradores (2018) citam em estudo a capacidade de leveduras em fermentar maltotriose como uma característica de domesticação, sendo este um açúcar encontrado em poucas proporções no meio ambiente, mas em alta quantidade no ambiente de fabricação de cerveja. Os autores explicam que a domesticação é a seleção humana e reprodução de espécies selvagens obtendo variantes destas que, possuindo características aprimoradas e vantajosas, prosperem em ambiente não natural.

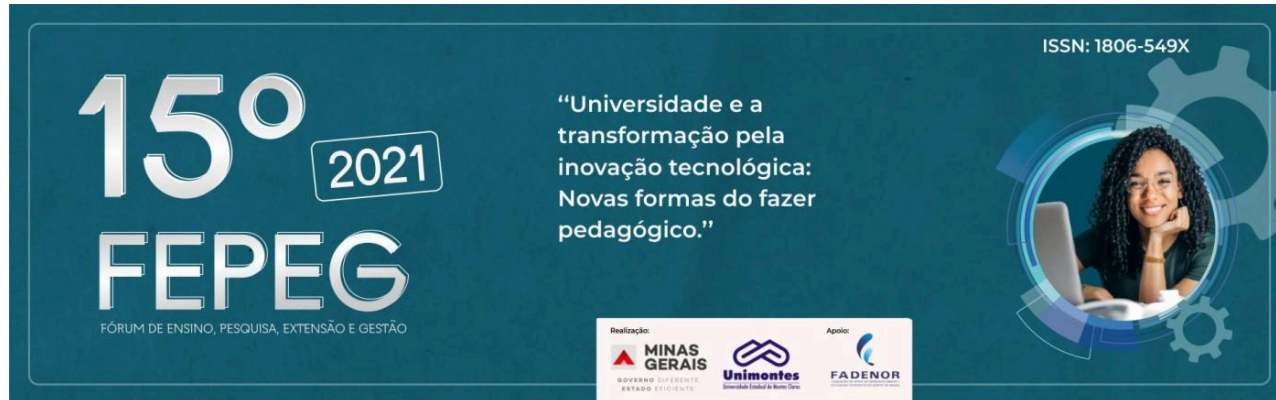
Mediante a isso, leveduras domesticadas permitem um processo fermentativo mais eficiente para a indústria, por meio da adaptação aos estresses impostos no decorrer do processo. Portanto, o objetivo desse trabalho foi domesticar linhagens isoladas de dorna de fermentação de cachaça, expondo-as a testes de tolerância a diferentes concentrações de glicose, etanol e a variações de temperatura.

Material e Métodos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Microbiologia Ambiental (LEMMA) da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), com linhagens de leveduras coletadas a partir de dornas de fermentação etanólica em mosto de cana-de-açúcar, em 4 fábricas localizadas no município de Salinas-MG. Foi obtido um total de 76 amostras, no qual foram incubadas a 25 °C por sete dias em meio YP suplementado com 15% de sacarose (p/v) e 0,1% de ampicilina (50µg/ml). Passado o período de incubação, as leveduras foram separadas por diferenças macro e micromorfológicas e depois isoladas.

A. Teste de tolerância à glicose

Dos 76 isolados, 30 foram escolhidos aleatoriamente para serem testados quanto a habilidade de fermentar em meio com diferentes concentrações de glicose, e para isso foi realizado pré-cultivo por 48h das células, seguindo método de Djelal et al (2006). Após, as amostras padronizadas a uma absorbância 0,1 (D.O_{610nm}) foram inoculadas em meio YPD líquido a 25 °C durante 24 e 48h, sendo testadas nas concentrações 3, 6, 10 e 15% (p/v). Foram incluídos controles em todos os testes. Analisou-se taxa de crescimento por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) e foi determinada a quantidade de Álcool por Volume (ABV - Alcohol by Volume).



B. Teste de tolerância à etanol

Os 10 inóculos que obtiveram melhores resultados no teste anterior foram avaliados quando a capacidade de tolerar diferentes concentrações de etanol a 30 °C. O experimento foi realizado de acordo com Belloch et al (2008), com modificações. Assim sendo, as amostras para este teste foram ajustadas a uma absorbância de 0,3 (D.O_{600nm}), de maneira que 3 repetições de tubos com 8,5 mL; 8,25 mL; 8,0 mL e 7,8 mL de meio líquido YEPD foram anteriormente preparados e assim foram acrescentados 1 mL de inóculo juntamente com os respectivos volumes de 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL e 1,2 mL de etanol, correspondendo dessa forma simultaneamente às concentrações de 5%, 7,5%, 10% e 12% de etanol. Foi verificada a tolerância das células em cada concentração, após 48h de incubação a 30°C, por meio de UFCs/ml. Controles de 9 ml de meio YEPD + inóculo foram incluídos neste teste.

C. Teste de termotolerância

Quatro isolados, foram escolhidos entre os dez anteriores, para serem testados quanto a tolerância à quatro diferentes temperaturas sendo realizado de acordo com a metodologia de Mertens e colaboradores (2015), com modificações. De forma que, após repique e incubação em meio YEPD líquido das amostras à 25°C durante 24h, estas foram ajustadas a uma absorbância de 0,3 (D.O_{600nm}). Depois, alocadas no agitador orbital estático, as amostras foram submetidas às temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C, respectivamente, de tal maneira que ao passar de 24h a temperatura foi mudada para o próximo grau da sequência. Foi feita contagem em câmara de Neubauer e de UFCs para avaliação de tolerância das células. Os controles foram mantidos a 25°C.

Resultados e Discussão

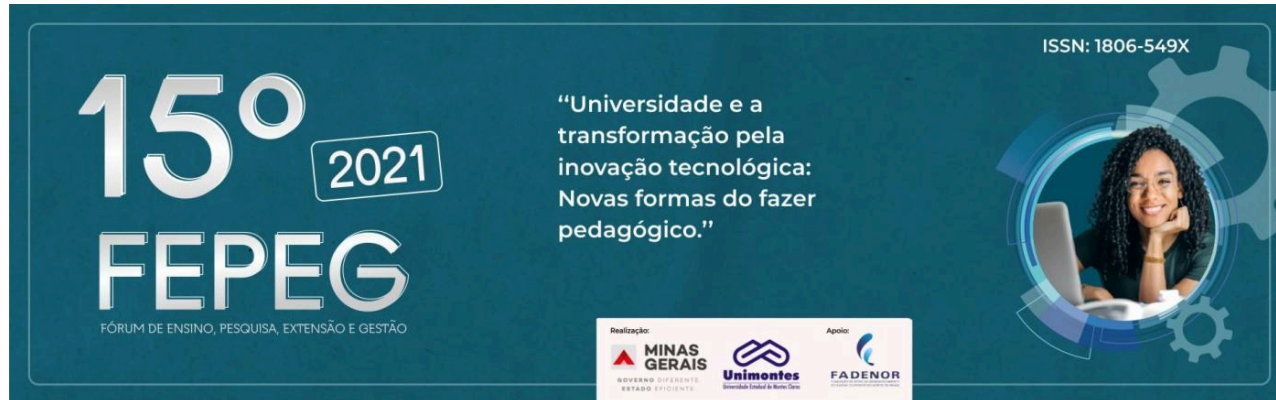
Inicialmente, foi verificado a adaptação das células em ambiente com as concentrações de 3, 6, 10 e 15% de glicose, de tal forma que a partir de 30 isolados, 10 se destacaram mediante resultados de UFCs por demonstrarem maior tolerância em meio com maior concentração de glicose (15%), porém, analisados o período de 48h a 96h foi visto que a média das 10 amostras diminuiu com o tempo. As células desencadeiam uma série de respostas para superar esse estresse até se tornarem ajustadas ao ambiente estressante. Neste estudo, a amostra da levedura 21, mostrou aumento considerável de colônias em 96h no meio com maior concentração de glicose (15%), podendo ter ocorrido adaptação das células ao meio (Fig. 1A). Em contraste, as demais amostras não demonstraram tal acomodação na contagem de UFCs no entanto, ao determinar a quantidade de Álcool por Volume (ABV - Alcohol by Volume) notou-se que as amostras de leveduras 11, 23, 24, 28 assim como a levedura 21, apresentaram maiores valores de ABV (Fig.1B).

Esses dados demonstram, exceto pelo isolado 21, que apesar das amostras terem obtido valores menores de UFCs na maior concentração de glicose deste estudo, as células que resistiram ao estresse, ou seja, não sofreram lise celular, se ajustaram ao meio e consumiram a glicose alcançando os maiores valores de ABV comparado as outras cinco (5) amostras restantes de um total de dez.

As dez amostras foram em seguida avaliadas também quanto a tolerância ao etanol nas concentrações de 5%, 7,5%, 10% e 12%, de modo que cinco amostras se distinguiram das outras por terem maiores UFCs em 12% de etanol, sendo as linhagens 05, 23, 11, 24 e 21 (Fig. 1C). Porém, a levedura 23 apesar de queda de viabilidade a 7,5%, mostrou maior número de colônias às 48h em 12% de etanol, sendo esta a que melhor se adaptou a este estresse. Ma & Liu (2010), explicam que diversos genes envolvidos na composição da membrana, na biossíntese de determinados aminoácidos como a prolina e o triptofano, na função peroxissômica, além de vários outros genes; estão associados à tolerância das células de leveduras ao etanol.

Mediante aos resultados do teste de tolerância a glicose e etanol, os isolados 11, 21, 23 e 24 foram escolhidos e seguiram para o teste de termotolerância. A tolerância pelas células a temperaturas elevadas é também de interesse industrial, isso porque processos fermentativos para produção de alguns tipos de bebidas acontecem em temperatura acima daquela que as células estão acostumadas na natureza. Perante o exposto, os quatro isolados foram submetidos a 30, 35, 40 e 45°C. Em análise de UFCs (Fig. 1D), as linhagens 11 e 23 mostraram melhor crescimento a 35°C, com valores respectivos de 3,03e+07 e 4,393e+07; diferente da linhagem 24 que teve melhor crescimento a 40°C (9,633e+06), sendo ainda a que melhor se adaptou a esta temperatura. Já a amostra 21, foi a que demonstrou menor tolerância ao aumento de temperatura, visto a queda gradual do número de colônias chegando a 0 a 45°C.

Em estudo, em que uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* foi testada quanto a resposta a choque térmico, quando exposta a 45°C, as leveduras de brotamento da linhagem tornaram-se dormentes e a 46°C observou-se perda do



conteúdo citoplasmático (MUNNA; HUMAYUN; NOOR, 2015), partindo disso, sugere-se que o mesmo possa ter ocorrido com as células das demais 4 linhagens expostas a 45°C neste estudo. Todavia, apesar da notável perda de viabilidade das células em 45°C, o isolado 23 ainda apresentou colônias nesta temperatura (6,667e+04), mostrando adaptação a variação da temperatura.

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

O presente estudo demonstrou haver tolerância de 4 linhagens de leveduras a três condições estressantes características no processo fermentativo industrial, sendo de alta concentração de glicose (substrato), etanol (produto) e variações de temperatura. Nesse aspecto, a linhagem 21 mostrou melhores resultados em glicose a 15%, visto que esta não só consumiu a glicose quase toda, mas também teve crescimento de colônias considerável. Contudo, a linhagem 23 se sobressaiu das demais linhagens tanto em teste de tolerância etanólica e no teste de termotolerância, mostrando-se como uma possibilidade de uso na indústria, de forma que esta suportaria as condições desfavoráveis do ambiente industrial.

Este estudo confirma a importância de leveduras que sejam resistentes a processos estressantes, visto que isso interfere no rendimento destas leveduras e mostra a necessidade de estudos que expliquem os processos fisiológicos e bioquímicos os quais tornaram tais linhagens mais adaptadas, sendo assim, domesticadas ao ambiente antrópico.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa Institucional de Iniciação Científica Voluntária –ICV da Unimontes, à Capes e FAPEMIG.

Referências

- BELLOCH, C. et al. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International journal of food microbiology**, v. 122, n. 1–2, p. 188–195, fev. 2008.
- DJELAL, H. et al. Effect of the dissolved oxygen on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. **Journal of biotechnology**, v. 125, n. 1, p. 95–103, ago. 2006.
- GALLONE, B. et al. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 148–155, 2018.
- LEGRAS, J.-L. et al. Adaptation of *S. cerevisiae* to Fermented Food Environments Reveals Remarkable Genome Plasticity and the Footprints of Domestication. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 7, p. 1712–1727, 2018.
- MERTENS, S. et al. A Large Set of Newly Created Interspecific *Saccharomyces* Hybrids Increases Aromatic Diversity in Lager Beers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 23, p. 8202–8214, 2015.
- MUNNA, M. S.; HUMAYUN, S.; NOOR, R. Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 369, 2015.
- TADESSE, B. T. et al. Molecular Characterization of Fermenting Yeast Species from Fermented Teff Dough during Preparation of Injera Using ITS DNA Sequence. v. 2019, 2019.
- WENDLAND, J. Lager Yeast Comes of Age. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 10, p. 1256–1265, 2014.

15° FEPEG

2021

FÓRUM DE ENSINO, PESQUISA, EXTENSÃO E GESTÃO

“Universidade e a transformação pela inovação tecnológica: Novas formas do fazer pedagógico.”



Realização:
MINAS GERAIS
GOVERNO DIFERENTE
ESTADO EFICIENTE

Unimontes
Universidade Estadual de Montes Claros

Apoio:
FADENOR
FUNDAÇÃO DE APOIO À DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

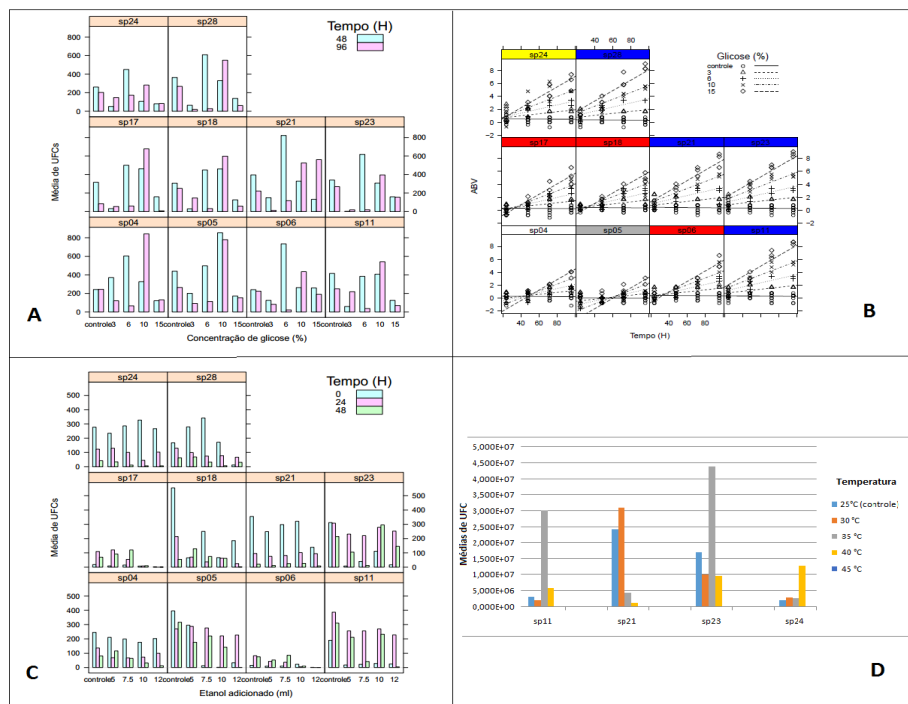


Figura 1. **A** - Análise de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de 10 amostras em teste de tolerância a glicose nas concentrações de 3,6, 10 e 15% e controle 1%. **B** - Análise de variância de contrates das espécies, para Álcool por Volume (ABV) em teste de tolerância à glicose nas concentrações de 3,6, 10 e 15% e controle 1% no tempo de 24, 48, 72 e 96h; com correção da densidade em temperatura da estufa (25°C). **C** - Análise de UFCs de amostras em teste de etanol nas concentrações de 5%, 7,5%, 10% e 12% e controle 0%, em 24 e 48h. **D** - Análise de UFCs de 4 amostras (11, 21, 23 e 24) em teste de termotolerância nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C, sendo o controle de 25°C.