

Seleção de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de ácidos orgânicos

Luana Assis Serra¹, Thályta Fraga Pacheco², Flávia C. de Paula e Silva³, João Ricardo Moreira de Almeida⁴

Resumo

Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* capazes de produzir etanol e outros compostos químicos de interesse a partir dos açúcares presentes na biomassa da cana-de-açúcar têm sido obtidas por meio de engenharia metabólica. O presente trabalho teve por objetivo selecionar linhagens capazes de produzir ácidos orgânicos a partir de fontes renováveis (bagaço da cana, por exemplo). Os ácidos orgânicos possuem ampla aplicação, podendo ser utilizados na indústria de alimentos, química, farmacêutica e como químico bloco construtor. Entretanto, sua produção por microrganismos pode ser limitada por seus efeitos inibitórios. Com isso, as linhagens industriais de *S. cerevisiae* CAT1, JP1, PEDRA2, BLUE, RED, SA1, A21, A33 e BG1 foram avaliadas com relação à capacidade de tolerar a presença de ácido acético, visando selecionar a linhagem mais robusta para posterior engenharia metabólica.

Introdução

O conceito de biorrefinarias é baseado na integração de processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e produtos químicos. Nesse sentido, a utilização da biomassa para produção de etanol e outros compostos químicos de interesse biotecnológico tem sido amplamente avaliada e, dessa forma, tem sido apontada como meio de viabilizar economicamente a cadeia produtiva de biocombustíveis, valorar resíduos e coprodutos e reduzir a eliminação de resíduos industriais (ALMEIDA; PAES, 2014).

Nesse contexto, microrganismos são essenciais para o funcionamento de biorrefinarias, já que são responsáveis por diferentes processos de conversão de

¹ Graduanda em Biologia, Universidade de Brasília, luaserra@globocom

² Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

³ Bióloga, doutora em Microbiologia Aplicada, Universidade Federal de Minas Gerais, flavia_cristina.silva@colaborador.embrapa.br.

⁴ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

biomassa e produção de moléculas de interesse. Várias linhagens microbianas capazes de produzir etanol e outros compostos químicos a partir dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica têm sido obtidas por engenharia metabólica. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um exemplo de microrganismo utilizado em biorrefinarias, capaz de fermentar grande parte dos açúcares presentes, sendo bastante importante na produção de etanol. Além disso, essa levedura vem sendo modificada geneticamente para produção de vários compostos químicos de interesse industrial.

As condições de crescimento das leveduras nas destilarias são bastante diversas das condições em ambientes laboratoriais. O substrato por si só contém alguns compostos em níveis bastante tóxicos (como potássio, alumínio, etc.), assim como altas concentrações de açúcares, variações de temperatura e baixo pH. (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013). Todas essas condições podem agir como fatores de estresse para as linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas na produção industrial de etanol em indústrias mundiais e brasileiras.

Durante o processo usual de produção de etanol, as leveduras são comumente lavadas com ácido sulfúrico, o que pode abaixar o pH até 1,8 (BASSO et al., 2011). Geralmente, linhagens industriais são mais tolerantes a condições desfavoráveis do que linhagens laboratoriais. Nesse âmbito, o presente trabalho teve por objetivo selecionar linhagens industriais da levedura *S. cerevisiae* tolerantes a altas concentrações de ácido acético, visando posterior produção de ácidos orgânicos. Estes podem ser produzidos a partir de açúcares e possuem ampla aplicação, podendo ser utilizado na indústria de alimentos, química, farmacêutica e como químico bloco construtor. Como a produção de ácidos é favorecida a baixo pH, a utilização de linhagens industriais de *S. cerevisiae* pode ser vantajosa para a otimização do processo de produção (TOIVARI et al., 2013).

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens industriais de *S. cerevisiae* CAT1, JP1, PEDRA2, BLUE, RED, SA1, A21, A33 e BG1 crescidas na presença de diferentes concentrações de ácido acético. Crescimento, viabilidade e vitalidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol foram acompanhados durante 72 horas. As linhagens foram selecionadas baseando-se em dois fatores importantes para a produção de ácidos: resistência a alta concentração de ácidos e pH do meio de cultivo.

Materiais e métodos

Curva de crescimento de leveduras em presença de ácido acético

Para avaliação da curva de crescimento das linhagens de leveduras em presença de ácido acético em diferentes concentrações, foram utilizadas placas de 96 poços. As linhagens CAT1, JP1, PEDRA2, BLUE, RED, SA1, A21, A33 e BG1 foram dispostas em microplacas contendo em cada poço 200 μ L de meio YPD e tampão kftalato durante 24 horas. Posteriormente, as leveduras foram transferidas para as novas placas contendo 200 μ L de meio YPD e tampão kftalato suplementado com ácido acético nas concentrações de 0 g/L, 2 g/L, 4 g/L e 6 g/L. Seguiu-se a incubação em estufa bacteriológica a 28 °C e foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm durante 72 horas.

Avaliação de viabilidade, vitalidade, biomassa e produção de metabólito celular das leveduras em presença de diferentes concentrações de ácido acético

Inicialmente, foram realizados os pré-inóculos nos quais as leveduras foram individualmente crescidas em placas de Petri contendo meio YPD ágar. Após detecção de crescimento, algumas colônias foram transferidas para frascos também individuais de YPD líquido duas vezes concentrado, no volume de 5 mL contidos em frascos do tipo Falcon com capacidade de 50 mL. Posteriormente, as leveduras foram incubadas em shaker durante 2 horas com rotação de 200 rpm e temperatura de 28 °C. Em seguida, as leveduras foram novamente transferidas para frascos do tipo Erlenmeyer aletados com capacidade de 500 mL contendo 100 mL de meio YPD líquido na concentração de uma vez. Feito isso, as leveduras foram novamente incubadas nas mesmas condições acima descritas, *overnight*.

Para a avaliação das leveduras em meio suplementado com ácido acético a pH 3 ou 5, foram adicionados 20 mL de YPD suplementado com 10 g/L (1,9 mL) de ácido acético em Erlenmeyer aletados de 200 mL de volume. O pH do meio foi ajustado com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) para atingir os valores de pH 3 e pH 5, respectivamente. O experimento foi iniciado com uma densidade celular inicial de 5 g/L de células preparadas a partir do pré-inóculo. A cada 24 horas do início do experimento, alíquotas do meio de crescimento de cada linhagem de levedura foram retiradas para realização dos testes de viabilidade e vitalidade celular por meio de contagem de células (câmara de

Neubauer e contagem de unidade formadora de colônia), leitura de biomassa celular por meio de absorvância (OD 600nm) e análise de metabólitos por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Para verificar a viabilidade das células, foram feitas diluições decimais em solução salina 0,85% das alíquotas do meio de crescimento retiradas a cada 24 horas. As amostras nas diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram plaqueadas em meio YPD ágar com auxílio de pérolas e, após 48 horas de incubação a 28 °C em estufa bacteriológica, foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias (UFC).

Para verificar a vitalidade das células, foram feitas contagens em Câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. As células foram marcadas com o corante celular eritrosina, e as leveduras marcadas de rosa representaram as células mortas. O percentual de vitalidade foi calculado da seguinte forma: número de células vivas divididas pelo total de células contadas (vivas e mortas).

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas.

Resultados e discussão

Para o primeiro experimento, por meio das leituras em espectrofotômetro, foi possível delinear curvas de crescimento para as linhagens. Sem a presença do inibidor, todas as leveduras apresentam fase de crescimento exponencial nas primeiras 24 horas. Na presença do ácido acético com concentração de 2 g/L e 4 g/L, as linhagens de leveduras também apresentaram crescimento, porém menor quando comparadas ao crescimento sem inibidor. Na concentração de 6 g/L, todas as linhagens foram afetadas pela alta concentração de ácido acético.

Conforme esperado, a ação inibitória do ácido acético foi maior quando este se encontrava em concentrações mais altas. As linhagens permaneceram em uma faixa de crescimento homogêneo entre si, sem um padrão de desempenho que pudesse mostrar se uma linhagem é melhor que a outra. É possível também que o ácido acético em 6 g/L adie a fase log de crescimento das leveduras (figura 1).

Para o experimento realizado em frascos sob agitação, os resultados relativos a absorvância (OD600), vitalidade (% de células vivas) e viabilidade (UFC) apresentaram valores maiores em pH 5 do que em pH 3, principalmente para a vitalidade (dados não mostrados). Os resultados obtidos, considerando a duplicata de cada análise para as 9 linhagens, foram analisados estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey de comparação de médias ($p < 0,05$).

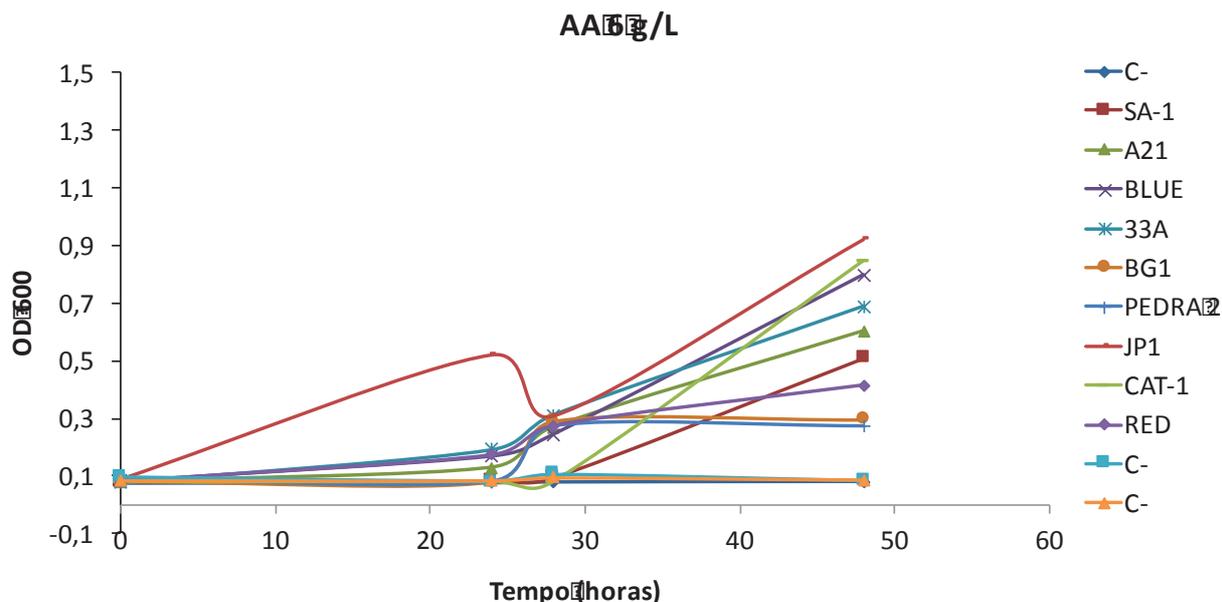


Figura 1. Curva de crescimento das linhagens na concentração de 6 g/L de ácido acético.

Para cada variável analisada (variação da OD, da viabilidade e vitalidade, glicose e ácido acético consumidos e etanol formado) foi possível ranquear as leveduras e estabelecer quais delas apresentam melhor desempenho na presença de ácido acético em pH 3 e pH 5. Os dados foram normalizados e, considerando o somatório de todas as variáveis (atribuindo-se o mesmo peso para todas as variáveis), para cada levedura, pôde-se estabelecer uma ordem global de desempenho das leveduras em cada um dos pHs. As leveduras com maior *score* apresentam melhor desempenho.

Tabela 1. Ordem decrescente de desempenho das leveduras avaliadas em pH 5, considerando somatório das variáveis normalizadas, variação de OD, viabilidade e vitalidade, glicose consumida e etanol formado.

pH 5								
1. BLUE	2. 33A	3. PEDRA 2	4. A21	5. RED	6. JP1	7. CAT1	8. BG1	9. SA1
3,63	3,36	2,88	2,77	2,51	2,44	1,95	1,53	1,39

A Tabela 1 apresenta em ordem decrescente os resultados para o pH 5. Como pode ser observado, as leveduras BLUE, 33A e PEDRA2 obtiveram os três melhores valores para o pH 5.

Quanto ao pH 3, na Tabela 2 são apresentados os resultados de maneira decrescente. É possível observar que a levedura BLUE obteve melhores resultados

tanto para pH 5 como para pH 3. A PEDRA 2 também se manteve entre as três melhores, porém, diferente do pH 5, sua colocação foi de segundo lugar. A levedura 33A, por exemplo, teve bom desempenho em pH 5, mas quando comparada ao pH 3 ela foi a segunda levedura a apresentar pior desempenho.

Portanto, não é possível afirmar que a levedura que teve bom desempenho em pH 5 terá bom desempenho em pH 3. Essa afirmação também é válida dita ao contrário. As linhagens BLUE e PEDRA 2 podem ser relacionadas como melhor desempenho tanto para o pH 3 como para pH 5. Por esse motivo, essas foram as linhagens em potencial para experimentos posteriores.

Tabela 2. Ordem decrescente de desempenho das leveduras avaliadas em pH 3, considerando somatório das variáveis normalizadas, variação de OD, viabilidade e vitalidade, glicose consumida e etanol formado.

pH 3								
1. BLUE	2. PEDRA2	3. JP1	4. BG1	5. SA1	6. CAT1	7. RED	8. 33A	9. A21
4,90	2,636	2,56	2,05	1,99	1,98	1,34	1,09	1,01

Por meio da análise por HPLC, foi possível observar que as linhagens A21 e SA1 apresentaram a capacidade de consumir completamente o ácido acético nas primeiras 24 horas do experimento. Já as linhagens 33A e JP1 também demonstraram a mesma capacidade de consumo de ácido acético, porém, após as 48 horas do experimento. Com o objetivo de avaliar o grau de correlação entre consumo de glicose, produção de etanol, variação de OD e consumo de ácido acético, foram determinados os coeficientes de correlação de Pearson para cada um dos pHs avaliados. Todos esses coeficientes determinados apresentaram valores próximos a zero, indicando não existir tendência quanto à variação conjunta das variáveis avaliadas duas a duas.

O fato de as leveduras com melhor desempenho, BLUE e PEDRA2, não terem consumido ácido acético nas condições avaliadas pode indicar que sua melhor tolerância pode estar relacionada à capacidade de bloquear a entrada do ácido na célula.

Conclusões

Foi possível constatar que quanto maior a concentração de ácido acético maior o efeito negativo sobre o crescimento das leveduras. Quando a

concentração de ácido acético foi aumentada para 6 g/L, a curva de crescimento apresentou um padrão inesperado, com fase exponencial de crescimento após as 48 horas. É possível concluir que as leveduras na presença de alta concentração de ácido (6 g/L) levam maior tempo para se adaptar (maior fase Lag) e, conseqüentemente, atrasam a sua fase de crescimento exponencial (fase Log).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, foi possível determinar que as linhagens *S. cerevisiae* BLUE e PEDRA2 são as mais tolerantes ao ácido acético nas condições avaliadas. O desempenho das linhagens foi melhor em pH 5, quando comparado com o desempenho em pH 3.

Apoio financeiro

Embrapa Agroenergia, CNPq.

Referências

ALMEIDA, R. M. J.; PAES, B. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and biological technologies in Agriculture**, Portici, v. 1, p. 1-10, 2014.

BASSO, L. C.; BASSO, O. T.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. dos S. (Ed.). **Biofuel production – Recent developments and prospects**. Rijeha: Intech, 2011. Capítulo 5. p. 85-100.

DELLA-BIANCA, B. E; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 104, n. 6, p. 1083-1095, 2013.

TOIVARI, M.; VEHKOMAKI, M. L.; NYGARD, Y.; PENTTILA, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M. G. Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 133, p. 555-562, 2013.