

**IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVAÇÃO DE CEPAS GRAS DE  
*Saccharomyces cerevisiae* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

**ACTIVATION AND BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF GRAS STRAINS OF  
*Saccharomyces cerevisiae* WITH BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL**

Esdras Abimael Maia Mendonça<sup>1</sup>, Gabriel Silva da Costa<sup>1</sup>, Adreiellen de Oliveira Branco<sup>1</sup>, Andreina Nuele Freitas da Silva<sup>1</sup>, Thaissa Nicolly Rodrigues da Silva<sup>1</sup>, Yasmin Maia de Oliveira<sup>1</sup>, Edailson de Alcântara Corrêa<sup>2</sup>

1. Aluno(a) do Ensino Técnico de Química do Instituto Federal de Rondônia – IFRO, Campus Porto Velho  
Calama

2. Professor Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia do Instituto Federal de Rondônia – IFRO -  
Departamento de Química/Orientador

\*Autor correspondente: e-mail: correa\_bio@yahoo.com.br

**RESUMO**

O *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura de importância biotecnológica associada às indústrias alimentícias, sucroalcooleira associadas a participação nos processos fermentativos. Esta pesquisa objetivou realizar a identificação e ativação bioquímica de cepa de *S. cerevisiae* com potencial biotecnológico exposta à condições de inviabilidade celular. A ativação foi realizada por reidratação em solução salina de NaCl à 0,9% a 37° C ± 1 °C por 5 min, seguida da agitação em vortex por 5 min. Posteriormente, alíquotas de 100µl foram semeada em meio ágar Sabouraud Dextrose (CAF) a 37 °C. A análise da viabilidade e identificação foi realizada em microscopia, teste em azul de metileno, fermentação e a identificação com kit Fungifast da Elitech Microbio - Ref. 44430, após 24 h. Os resultados confirmaram tratar-se de cepas de *S. cerevisiae* que, após os ensaios, apresentaram-se viáveis com atividades fermentativas e peroxidase positiva. As técnicas foram práticas, eficazes e podem contribuir com o aprimoramento da ativação e identificação de leveduras.

**Palavras-chave:** Leveduras. Fermentação. Biotecnologia.

**ABSTRACT**

*Saccharomyces cerevisiae* is yeasts of biotechnological importance associated with the food, sugar and alcohol industries due to their participation in fermentation processes. The aim of the research was to perform the biochemical identification of *S. cerevisiae* strain with biotechnological potential exposed to the cellular unviability conditions. Activation was carried out by rehydration in 0.9% NaCl saline at 37 °C ± 1 °C for 5 min, followed by vortexing for 5 min. Afterwards, aliquots of 100µl were seeded in Sabouraud Dextrose agar medium (CAF) at 37 °C. The viability analysis was performed under microscopy, methylene blue test, fermentation and the identification with Fungifast kit from Elitech Microbio - Ref. 44430, after 24 h. The results confirmed that strains of *S. cerevisiae* were presented, after the test, they were viable, with fermentative activities and peroxidase positive. The techniques were practical and may contribute to the enhancement of yeast activation and identification.

**Keywords:** Yeasts. Fermentation. Biotechnology.

**1. INTRODUÇÃO**

O fungo da espécie *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura de importância biotecnológica para diferentes setores econômicos associados, principalmente, as áreas de panificação, cervejaria e de produção de etanol [1], possuem aproximadamente 3µm de diâmetro e são capazes de dividir-se a cada 90 minutos em condições nutricionais adequadas [2]. No que se refere a classificação taxonômica, a espécie *S. cerevisiae* está incluída no Domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Saccharomycetes; Ordem

Saccharomycetales; Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces* [3]. Dados de análises bioquímicas, em meio oxigenado, mostram que essas leveduras convertem os açúcares em dióxido de carbono, gerando as “bolhas de ar” [4]. Além disso, este microrganismo é considerado, dentre outras abordagens, um modelo para estudos relacionados as interações biológicas, das estruturas e funções proteicas. Essas leveduras possuem características interessantes para o trabalho laboratorial por não serem patogênicas - consideradas GRAS (*generally regarded as safe*), serem de fácil crescimento e passíveis de técnicas como transformação, *replica-plating*, isolamento de mutantes, entre outras [5].

Quanto aos aspectos fisiológicos da célula, a principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica em leveduras é a glicólise (rota Embden-Meyerhof-Parnas ou EMP) por meio da qual uma molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato são produzidas [6] apresentando, para leveduras, como mecanismo metabólico de formação de etanol a partir de glicólise [7]. Assim, considerando suas características bioquímicas e relevância, dados da literatura científica especializadas mostram que o *S. cerevisiae* é, sem dúvidas, o mais importante microrganismo explorado pela humanidade. Ressaltam-se, ainda, que nenhum outro organismo, até então, tem sido tão bem associado com o progresso e bem-estar da espécie humana [8]. Diante do exposto, esta pesquisa objetivou realizar ensaios de ativação bioquímica e identificação de cepa de *S. cerevisiae* com potencial biotecnológico expostas a condições de armazenamento e inviabilidade celular.

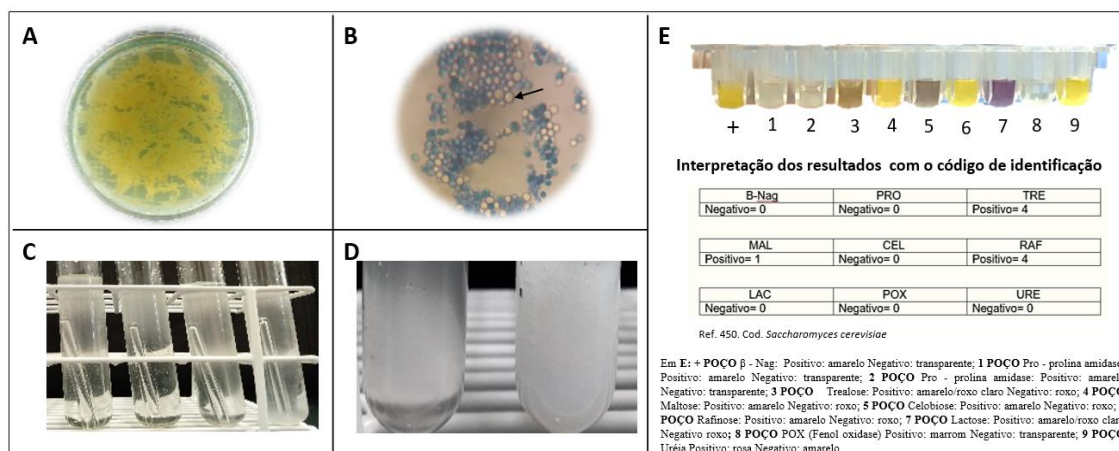
## 2. METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa exploratória amostral de ativação e identificação de leveduras obtidas de extratos de fontes comerciais. O processo metodológico, modificado de Costa, Ferreira [9] e Abreu, Tutunji [10], foi realizado pela mensuração de pequenas frações de 6 mg de granulados de leveduras, comerciais, que foram previamente obtidas. As frações foram reidratadas e homogeneização em 1 ml solução salina de NaCl à 0,9% sob agitação em vórtex por 5 a 10 min. Posteriormente, essas amostras foram levadas ao banho Maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Após esse processo, homogeneizou-se e alíquotas de 100 $\mu\text{l}$  foram pipetadas e dispersas para semeio em placas de petri antecipadamente preparada com meio ágar Sabouraud Dextrose (CAF - Cloranfenicol) que foram semeadas uniformemente com alça de Drigalski. O cultivo, realizado em estufa bacteriológica modelo Fanem modelo 502, ocorreu por 24 a 72 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após este período, as cepas foram observadas na forma de colônias (UFC) sendo

coletadas e avaliadas a viabilidade celular de acordo com as especificações de Oliveira e col. [11]. O procedimento objetivou o registro e identificação de células viáveis em solução do corante solução de azul de metileno. As análises ocorreram por meio da microscopia óptica com aumento de 640x. Em seguida, os testes bioquímicos de peroxidase e de fermentação de carboidratos (dissacarídeo/sacarose) foram realizados a partir das modificações de ensaios para avaliação de leveduras descritos pelo M.S. [12]. Após os testes dessas estirpes, a identificação foi realizada pelo kit Fungifast da Elitech Microbio - Ref. 44430, por 24 a 72 horas, de acordo com as orientações do fabricante.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que os ensaios de ativação utilizados para cepas de *S. cerevisiae*, em solução salina a 0,9% seguido do semeio em placas com meio ágar Sabouraud Dextrose, da análise de viabilidade em azul de metileno e dos testes bioquímicos, evidenciaram a presença de células viáveis e com identificação bioquímica positiva para *S. cerevisiae* observados nas imagens da figura 01.



**Figura 01:** Identificação e ensaios bioquímicos realizado pelo kit Fungifast. Em **A**: cultura em meio Agar Sabouraud. Em **B**: Teste de viabilidade em azul de metileno evidenciando levedura 640x. Em **C**: teste de fermentação com tubo Durham. Em **D**: teste de peroxidase/catalase. Em **E**: Identificação realizada pelo kit Fungifast com resultado positivo para cepas de *S. cerevisiae*.

O método de reidratação em soluções iônicas, princípio deste estudo, apresentou resultados positivos. Estudos mostram que procedimentos similares vem sendo amplamente realizados por diferentes metodologia. Normalmente, ocorrem por meio da transferência de blocos de ágar contendo os microrganismos para um recipiente seguida da adição de uma solução de água esterilizada, como descritos nos estudos de Costa e Ferreira [9]. Nesta técnica utiliza-se, preferencialmente, culturas jovens com cerca de 10 a 15 dias e visa atingir um estágio

de hipobiose, com a diminuição do metabolismo e formação do estado latente da célula em função da restrição de fontes nutritivas [9], [10]. Além disso, dados da literatura científica, como as de Nass e Rao [20], mostram que o processo de reativação com a solução salina pode estar relacionada aos diferentes mecanismos de resposta ao estresses que envolvem a participação de íons, portanto, soluções iônicas podem ser importantes no desencadeamento na ativação das vias de sinalização associado à homeostase iônica. Outro dado que contribui para a o processo de reestabilização celular é que, em leveduras, a manutenção da homeostase de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  é dependente de sistemas transportadores responsáveis pelo influxo e efluxo de sais, tais como a bomba exportadora de sódio  $\text{Ena1p}$ , como já observado e descrito nos estudos de Benito, Quintero e Rodríguez-Navarro [13]. Logo, sugere-se que o método utilizado neste estudo pode ter proporcionado resultados eficientes na reativação a partir da reidratação e estabilização iônica em solução salina 0,9%, como já observado e descrito em outros estudos.

As cepas leveduriformes, obtidas pelo cultivo em meio ágar Sabouraud Dextrose (CAF) nos intervalos de 24 a 72 h, mostraram perfis de viabilidade após os procedimentos de cultivo. As células fungicas apresentaram formas, variando entre ovais à elípticas em colônias com crescimento rápido e uniforme, textura cremosa e com coloração entre branco à creme com bordas regulares (Fig. 1 A e B), características que corroboram os estudos de Yarrow [14] e Camargo [15]. No que se refere à análise de viabilidade, determinada com o teste do corante azul de metileno e observada em microscopia óptica em 640 x, evidenciou células consideradas com perfis de células viáveis - caracterizadas pela ausência de cor (Fig. 1B), dados semelhantes associados a viabilidade são descritos no trabalho de Bonneu e col. [16], bem como nas especificações metabólicas que mostram que as células coradas são consideradas mortas e as não coradas, vivas. Adicionalmente, os ensaios bioquímicos realizados revelaram que as cepas apresentavam atividades fermentativas (Fig. 1C) e reação de peroxidase positiva (Fig. 1D). Nos testes de fermentação realizados, observou-se a formação de gases, evidenciados nos tubos de Durham, característica que contribuem com a análise de positividade do teste, como já observado e descrito por Barnett e col. [21].

Quanto a identificação, realizada pelo kit Fungifast o qual analisa características básicas da vias metabólicas das principais leveduras, os resultados mostram ser de cepas de fungos da espécie *S. cerevisiae* (Fig. 1 E). As características metabólicas dos microrganismos, como das leveduras, são critérios associados a identificação, como descritos por Costa e Moradas-Ferreira [17]. Ademais, estas células podem crescer em condições de aerobiose e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas e ânions

superperóxidos, provenientes de processos metabólicos normais como respiração e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Adicionalmente, o processo fermentativo consiste na transformação dos açúcares fermentáveis em álcool etílico –  $C_2H_5OH$ , gás carbônico ( $CO_2$ ) e outros compostos secundários com duração média de 24 horas, como descrito por Pataro e col. [18]. Um dado associado ao comportamento das leveduras, embora não observado neste estudos, são observados e relatados nos trabalhos de Pataro e col.[19]. Neste, evidenciam um decréscimo da população de *S. cerevisiae* no final da fermentação. Desta forma, os dados obtidos nas avaliações microscópicas, nos testes de peroxidase e na fermentação positiva e da identificação pelos testes bioquímicos (Kit) confirmam ser de cepas da espécie *S. cerevisiae*.

## CONCLUSÕES

Os dados permitem concluir que as leveduras, quando adicionadas e homogeneizadas em solução salina à 0,9%, levadas a banho Maria a 37 °C – sob agitação, semeada e cultivadas em condições apropriadas, possuem fatores que estimulam processos metabólicos que podem estar envolvidos ou colaborar de forma sinérgica com a sua ativação e/ou quebra da dormência. Que os ensaios para a reativação, associados aos testes bioquímicos, foram práticos, viáveis e podem contribuir com o aprimoramento de novos processos biotecnológicos e com a identificação de leveduras GRAS, assim como, as cepas reativadas, avaliadas pelos ensaios bioquímicos e testes de identificação, confirmaram tratar-se de cepas de *S. cerevisiae*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Rondônia - IFRO, campus Calama, aos Departamentos de Ensino e Pesquisa e Extensão e a todos os membros do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do campus.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V.; SILVA, J.B.A. Elementos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte - As leveduras. Rev Analytica. n. 25, 2006.
- [2] PASSARGE, E. Genética: texto e atlas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.



- [3] KURTZMAN, C.P.; Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. In: Kurtzman, C.P; Fell, J.W. The yeasts, a taxonomic study. 4 ed., p. 111–121, The Netherlands: Elsevier Science, B V. 1998.
- [4] BORTOLI, D.A.S.; SANTOS, F.; STOCCO, N. M.; ORELLI Jr., A.; TOM, A.; NEME, F.F.; NASCIMENTO, D.D. Multiplicação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) cervejeiras utilizando meios de cultura a base de açúcar mascavo. Rev. bioenergia em revista: diálogos, n. 2, p. 50-68, 2013.
- [5] MONTEIRO, A.R.S. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* para estudo de organismos procariotos. (Dissertação) Mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- [6] MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Nutrition and metabolism. Brock biology of microbiology, 2000.
- [7] BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnol Adv, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.
- [8] DE SMIDT, O.; PREEZ, J.C.D.; ALBERTYN, J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. FEMS Yeast Res, v. 8, p. 967-978, 2008.
- [9] COSTA, C. P.; FERREIRA, M.C. Preservação de microrganismos: revisão. Rev de Microbiologia, v. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.
- [10] ABREU, M.M.V.; TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de Culturas de microrganismos do UniCEUB. Universitas Ciências da Saúde, v. 02, n. 2, p. 236-25, 2003.
- [11] OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool. Piracicaba, p. 89, 1996.
- [12] MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod\\_4\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf)>. Acesso em: 20 de março de 2019.
- [13] BENITO, B.; QUINTERO, F.J.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. Biochem Biophys Acta. v.1328, p. 214-225, 1997.
- [14] YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In The yeasts, a taxonomic study, 4th ed., p. 77-100, 1998. Edited by C. P. Kurtzman, & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.

- [15] CAMARGO, J.Z. Estudo da fisiologia de diferentes leveduras industriais e isoladas na região Centro-Oeste. (Dissertação) Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental. Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados - MS, 2013.
- [16] BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by eritrosine B. staining. *Analytical Biochemistry*, v.193, p. 225-230, 1991.
- [17] COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in of *S. cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects in Medicine*. v. 22, p. 217-246, 2001.
- [18] PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAUJO, R.A.C.; ROSA, C.A.; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C. R.; CASTRO, H. A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37- 43, 2002.
- [19] PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONCA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p.1-9, 2000.
- [20] NASS, R.R.; RAO, R. Novel localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem*; v. 273, p. 21054-060, 1998.
- [21] BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeasts, characteristics and identification*. 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811p.