IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE AROMAS DIFERENCIAIS ISOLADOS DE CAFÉ

S. P. Thomaz[1], A. B. Taques[2], M. L. Demito[3], M. M. F. Nascimento[4], J. V. M. Bittencourt [5]

1 - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 84017-220 - Ponta Grossa – PR- Brasil, Telefone: 55 (42) 3220-4800 – Fax: Fax: (42) 3220-4810 – e-mail: (shelent34@gmail.com)

2 - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 84017-220 - Ponta Grossa – PR- Brasil, Telefone: 55 (42) 3220-4800 – Fax: Fax: (42) 3220-4810 – e-mail: (arthurtaques@hotmail.com)

3 - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 84017-220 - Ponta Grossa – PR- Brasil, Telefone: 55 (42) 3220-4800 – Fax: (42) 3220-4810 – e-mail:

4 - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 84017-220 - Ponta Grossa – PR- Brasil, Telefone: 55 (42) 3220-4800 – Fax: (42) 3220-4810 – e-mail: (marianam@utfpr.edu.br)

5 - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 84017-220 - Ponta Grossa – PR- Brasil, Telefone: 55 (42) 3220-4800 – Fax: Fax: (42) 3220-4810 – e-mail: (julianavitoria@utfpr.edu.br)

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi identificar microrganismos produtores de aromas diferencias relacionados a produção de aromas em cafés fermentados por sequenciamento do DNA. O isolamento foi realizado em meio ágar Sabouraud a partir de grãos de café. Todos os microrganismos foram caracterizados por coloração, textura, velocidade de crescimento e aroma característico. Foi realizado a extração de DNA de cada microrganismo isolado, posteriormente o DNA foi amplificado por PCR purificado, para posterior identificação a partir da comparação de sequencias com os bancos de dados. Um total de 08 isolados foram identificados após análise das sequências obtidas. O uso de ferramentas moleculares permitiu a identificação dos microrganismos estudados.

ABSTRACT – The objective of this work was to identify microorganisms that produce different aromas related to flavor production in coffee fermented by DNA sequencing. Isolation was performed on Sabouraud agar from coffee beans. All microorganisms were characterized by coloration, texture, growth rate and characteristic aroma. DNA was extracted from each isolated organism, then the DNA was amplified by purified PCR, for further identification from the sequence comparison with the databases a total of 08 isolates were identified after analysis of the sequences obtained. The use of molecular tools allowed the identification of the studied microorganisms.

PALAVRAS-CHAVE: Café, taxonomia, coleção microbiológica, aroma.

KEYWORDS: Coffee, taxonomy, microbiological collection, isolation of microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

O setor de aromas e fragrâncias em suas diversas aplicações, tais como, perfumes finos, fragrâncias de base usadas em perfumes, cosméticos, brindes de borracha, etc., representa não somente um mercado global multibilionário, mas também uma fonte de desenvolvimento científico e de inovação constante (Speziali, 2012). Os aromas são integrantes indispensáveis na indústria de alimento, bebidas e cosméticos. Sua percepção é um processo dinâmico de uma série de eventos e leva o consumidor aceitação ou rejeição de um determinado produto. No que se refere aos alimentos, apesar das ótimas características nutricionais, eles são consumidos devido as características organolépticas assim como aroma, sabor e textura (Costelli, 2005).

Os produtos alimentícios geralmente contêm centenas de compostos químicos com sabor ativo que são divididos com base no mecanismo pelo qual são detectados, ou seja, o 'sabor' detectado pelo nosso paladar (azedo, doce, amargo, salgado e umami (Lindemann, 2001), e o "aroma" sendo uma fração volátil é detectada no bulbo olfativo do nariz (Buck, 2000). Primeiramente, os consumidores realizam ações – busca por informações, avaliação entre as marcas e a compra em si – que geram a compra ou o recebimento de um produto. Depois, eles consomem o produto de uma certa maneira, em um respectivo lugar e sob determinadas condições para, posteriormente, eliminá-lo, ou seja, darem um destino a ele. (Blackwell et al., 2005).

O marketing sensorial nada mais é que o uso do marketing através dos cinco sentidos, e tem como objetivo fixar uma marca, produto ou serviço na mente do consumidor ao promover sensações por meio dos sentidos, para formar, então, um vínculo emocional entre a marca e o cliente (Trierweiller, 2011). Deste modo, uma das ferramentas que pode ser utilizada pelo mercado para atrair novos consumidores é o aroma de seus produtos que busca diferenciação através da exploração dos sentidos (Zouain, Hamerski, 2017).

A extração de compostos de aromas de modo direto da natureza tem um baixo rendimento do produto, alto custo, além de apresentarem dependência de fatores sazonais e climáticos, além disso pode implicar em problemas ecológicos (Zhou et al., 2014). Quando aromas sintéticos são manipulados, os mesmos só podem ser apresentados como “aroma artificial” ou até mesmo “aroma idêntico ao natural”, diminuindo o apelo comercial dos produtos aos quais eles são adicionados (Akacha, Gargouri, 2015).

Desta forma, o mercado de aromas tem buscado por aromas naturais e que possam ser produzidos biotecnologicamente a partir de fontes alternativas (Demito, 2019). Além disso, de maneira geral os consumidores tem buscado consumir produtos mais saudáveis e isso consequentemente levou ao desenvolvimento de bioprocessos para produção de aromas naturais (Dubal et al., 2008). Umas das alternativas para a produção de aromas naturais é a utilização de microrganismos uma vez que o espectro de compostos voláteis produzidos por fungos, por exemplo, é o que mais se aproxima da grande variedade e complexidade de aromas produzidos pelas plantas na natureza (Krings, Berger, 1998). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar a identificação molecular de microrganismos produtores de aromas diferencias relacionados a produção de aromas em cafés fermentados por sequenciamento do DNA

2. MATERIAL E METODOS

2.1 Isolamento dos Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram previamente isolados por Demito(2019). De acordo com o autor, para o isolamento dos fungos foram transferidos dois grãos de café de cada tratamento e colocados no centro de uma placa de Petri contendo meio Ágar Sabouraud (Dextrose 40 g/L, Peptona 10 g/L e Ágar-Ágar 15 g/L). As placas foram devidamente identificadas, fechadas e incubadas a 30ºC por 7 dias até obter crescimento

das colônias. Após esse período de desenvolvimento das colônias, os microrganismos foram repicados até a obtenção de colônias puras.

2.2 Identificação dos Microrganismos Isolados

Dos isolados obtidos na etapa de Isolamento, 8 isolados foram então selecionados para a identificação molecular pelo sequenciamento do DNA.

2.2.1 Extração De DNA

Para a extração de DNA dos microrganismos, retirou-se aproximadamente 1 cm² de colônia e transferiu-se para microtubos de volume 1,5 mL contendo tampão CTAB (300 µL) e uma mistura de sílica e celite (proporção de 2:1), na sequencia seguiu-se o protocolo estabelecido por Vicente et al. (2008). O material foi triturado por aproximadamente 5 minutos com auxílio de pistilos de plástico esterilizados. Em seguida, adicionou-se mais 200 µL de tampão CTAB aos tubos que foram então incubados a 65°C por 10 minutos. Após a incubação adicionou-se 500 µL de CIA (clorofórmio:álcoolisoamílico 24:1), e homogeneizou-se por inversão dos tubos. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos obtendo-se duas fases: aquosa e orgânica. A fase aquosa foi coletada e transferida para novos tubos esterilizados, acrescentando-se 800 µL de etanol 96% para a precipitação do DNA em freezer -20°C pelo período de 12 horas. Depois da precipitação do DNA, realizou-se nova centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos e todo o sobrenadante foi descartado. Na sequência, foi procedida a lavagem do DNA obtido com 1000 µL de álcool a 70% gelado.

O DNA obtido teve sua qualidade e integridade verificada em gel de agarose a 0,8% (70v por 40 minutos), corado com brometo de etídio e visualizado em Transluminador.

2.2.2 Amplificação do DNA e Purificação do DNA

Com as amostras de DNA isolado, realizou-se a reação de PCR. Os iniciadores utilizados foram o ITS1 e ITS4. O mix usado foi calculado para o volume de 25 µL, onde para os valores de cada reação usaram-se 14 µL de H2O ultrapura, 2,5 µL de dNTP's, 2,5 µL de tampão Buffer 10X, 1,3 µL de MgCl2, 1,3 µL de cada primer, 0,3 µL de enzima Taq DNA Polimerase Platinum e, por fim 2 µL de DNA molde. As condições de amplificação foram: 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, 94°C por 45 segundos para a desnaturação, 52°C por 45 segundos para o anelamento, 72°C por 2 minutos para a extensão e 72°C por 7 minutos para a extensão final. A reação foi realizada em 35 ciclos.

Os produtos de amplificação por PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,4% (70v por 40 minutos), corado com brometo de etídio visualizado em Transluminador. Realizou-se a purificação do produto da PCR utilizando o polímero PEG (politetilenoglicol) com base no protocolo de Vicente et al (2007).

2.2.3 Sequenciamento e Análise das Sequencias

Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento na empresa Ludwig Biotec (https://ludwigbiotec.com.br), os quais foram preparados de acordo com as normas exigidas pela empresa. As sequências recebidas foram tratadas através do software BioEdit e, em seguida realizada comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de dados do National Center for BiotechnologyInformation (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3. RESULTADOS E DISCUÇÕES

Dos oito isolados relacionados ao aroma de café selecionados para identificação molecular foi possível identifica-los ao nível de espécie. Em sua maioria, os isolados identificados foram leveduras pertencentes ao gênero *Pichia* (Tabela 1).

Existe diversas formas de identificar um microrganismo, entre elas pelas características bioquímicas, características morfológicas, tanto macro quanto pela micro-morfologia visualizada através do microscópio. Além do uso técnicas moleculares, que são feitas a partir do sequenciamento do material genético de microrganismos em estudo (Koneman et al., 2008).

É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura são derivados das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos (Canhos et al., 1998)

Após as etapas de isolamento e sequenciamento do DNA, a identificação molecular de uma linhagem é realizada por meio da comparação das sequências com bancos de dados mundiais, que ajudam a garantir uma identificação correta para cada microrganismo. Assim, juntamente com os dados das características morfológicas e a identificação molecular, torna-se possível a confirmação de uma espécie, mesmo que esta possua semelhanças morfológicas com outras espécies próximas (Crous, et al., 2009).

Todavia, para que se mantenham as informações necessárias sobre estes microrganismos depositados em coleção, é fundamental que se tenha uma identificação taxonômica precisa. O emprego de técnicas moleculares ajuda na identificação e classificação de microrganismos, diminuindo o tempo dos resultados obtidos. Estas técnicas possuem alta sensibilidade, permitindo a identificação de variações mínimas existentes entre as espécies de microrganismos (Canada, 2017).

Após as fases de isolamento e sequenciamento do DNA, devesse prosseguir com a identificação da linhagem por meio da comparação das sequências com bancos de dados mundiais, que auxiliam na garantia de uma correta identificação para cada microrganismo. Assim, após coletar todos os dados sobre suas características morfológicas e sua identificação molecular, tornando-se possível a confirmação de uma espécie, mesmo que esta possua semelhanças muito próximas a outras espécies.

Tabela 1. Identificação taxonômica dos fungos leveduriformes isolados a partir das amostras de café submetidas a diferentes processos de fermentação

Amostra	Código	Identificação
1	C2A	*Pichia membranifaciens*
2	1A	*Pichia kudriavzevii*
3	2S	*Pichia membranifaciens*
4	1F	*Pichia kudriavzevii*
5	2PF	*Pichia kudriavzevii*
6	1PF	*Pichia membranifaciens*
7	2F	*Pichia fermentans*
8	1S	*Pichia kudriavzevii*

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As ferramentas de identificação molecular aplicadas na taxonomia de microrganismos se mostraram eficientes quando aplicadas aos oito microrganismos em estudo e relacionados a aromas do café. A correta identificação molecular de microrganismos permite a identificação do microrganismo, bem como possibilita a aplicação adequada em processos biotecnológicos, tornando-se dessa uma ferramenta muito importante, uma vez que existem casos, onde duas espécies só podem ser diferenciadas por meio de diagnóstico molecular, pois as espécies se mostram semelhantes fenotipicamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akacha, N.B., & Gargouri, M. (2015). Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 675–706.

Blackwell, R. D., Miniard, P. W., & Engel, J. F. (2005). *Comportamento do consumidor*. (9 ed.). São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 630 p.

Buck, L. B. (2000). The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell*, 100:611–8.

Canada. T-4-126 – *Identification and taxonomic classification of microorganim(s) represented for use as suplements inder the Fertilizers Act.* Disponível em: https://www.inspection.gc.ca/plant-health/fertilizers/trade-memoranda/t-4-126/eng/1346524491267/1346527009874

Canhos, V. P. (1998). Estratégia Nacional de Diversidade Biológica – Microrganismos e Biodiversidade de Solos. Disponível em: https://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/gtt10.pdf

Costelli, M. C. (2005). Cultivo De *Bacillus polymyxa* para a Produção de Acetoína: Influência do pH e do Tempo de Cultivo do Inóculo. (Dissertação mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., & Samson, R. A. (2009). CBS - Laboratory Manual Series Fungal Biodiversity, 1a ed, Utrecht.

Demito, M. L. (2019). *Caracterização dos Microrganismos Produtores de Aromas Associados a Cafés Fermentados em Minas Gerais*. (Dissertação de mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa.

Dubal, S.A; Tilkari, W.P; Momin, S.A; & Borkar, I.V. Biotechnological routes in flavor industries. *Advanced biotechnology*, 20-31, 2008

Koneman, E. W., Allen, S. D., & Janda, W. M. (2008). Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. (6 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Krings, U., & Berger, R.G. (1998). Biotechnological production of flavors and fragrances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 1-8.

Lindemann, B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413:219–25.

Speziali, M. G. (2012). De aromas e perfumes, o mercado da indústria do "cheiro". *Química nova*, 35(4), 861864.

Trierweiller, A. C., Weise, A.D., Pereira, V.L.D.V., Pacheco Junior, W., & da Rocha, R.A. (2011). Diagnóstico de satisfação de clientes como ferramenta para fidelização: um estudo de caso em cinema Cult. *Revista de Administração da UNIMEP*, São Paulo, 9(1), 130-148.

Vicente, V. A., Attili-Angelis, D., Pie, M. R., Queiroz-Telles, F., Cruz, L. M., Najafzadeh, M. J., G.S.de Hoog, J. Zhao, & Pizzirani-Kleiner, A. (2008). Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in Mycology*, 61, 137-144.

Zhou, J., Du, G., & Chen, J. (2014). Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 25, 17-23.

Zouain, M.S., Hamerski, H. (2017). Marketing sensorial: o estímulo olfativo como ferramenta de marketing no ponto de venda Sensory marketing: the olfactory stimulus as point of sales marketing tool. *Revista Científica Faes*a, , 13(2),12-121.