

O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais

The effect of the structural complexity of the carbon and nitrogen source in the fermentative performance of industrial yeast

Eric Francisco Simão dos Santos¹, Lilian Cristina Apolinário Schautz²,
Claudia Andrea Lima Cardoso³, José Roberto Ernandes⁴, Margareth Batistote⁵

¹²³⁵ Centro de Pesquisas em Biodiversidade-Cpbio- UEMS, Dourados, MS, Brasil

⁴Instituto de Química - Universidade Paulista - UNESP, São Paulo, SP, Brasil

Resumo

Saccharomyces cerevisiae tem evoluído para utilizar melhor os nutrientes acessíveis e se adaptar as deficiências nutricionais de forma a maximizar sua sobrevivência. O presente trabalho avaliou o efeito das fontes de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais (Catanduva-1 e Pedra-2). As análises dos parâmetros fermentativos mostraram que o tipo da fonte de carbono e a complexidade estrutural da fonte nitrogenada causam efeitos diferentes sobre o metabolismo das linhagens industriais. As fontes de carbono contendo glicose e sacarose suplementadas com a fonte nitrogenada (peptona) apresentaram melhor desempenho fermentativo para as linhagens estudadas. Este estudo mostrou que a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio, em correlação com o tipo de açúcar, tem um efeito importante no desempenho fermentativo de leveduras industriais.

Palavras-chave: metabolismo, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae has evolved to better utilize the nutrients available and to adapt nutritional deficiencies in order to maximize its survival. This study evaluated the effect of carbon and nitrogen sources in the fermentation performance of industrial yeasts (Catanduva-1 and Pedra-2). Analyses of fermentation parameters showed that the type of carbon source and structural complexity of nitrogen source cause different effects on the metabolism of industrial strains. The carbon sources containing glucose and sucrose supplemented with nitrogen source (peptone) showed better fermentation performance for the strains studied. This study showed that the structural complexity of the nitrogen source in correlation with the type of sugar has an important effect on the fermentation performance of industrial yeasts.

Keywords: metabolism, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation.

1. Introdução

Saccharomyces é o gênero de levedura mais largamente utilizada na indústria produtora de fermentados que tem como produto final o álcool. A capacidade deste gênero de ser utilizado em processos industriais transformando açúcares em etanol propicia uma alta tolerância ao produto formado, tolerância a variações de temperatura, atividade celular em ambiente ácido. Todos esses atributos podem ser resumidos por representantes do gênero *Saccharomyces* (ANDRIETTA et al., 2006).

Segundo PULZATTO (2000) a composição química da levedura é amplamente afetada pelas condições químicas e físicas do meio de crescimento, as quais podem ser resumidas como elevado teor de proteína e de ácidos nucleicos, baixo conteúdo de lipídeos, alto conteúdo de cinzas e vitaminas, conteúdo moderado de carboidratos e alto conteúdo de vitaminas.

Para todos os processos industriais em que participa a *Saccharomyces cerevisiae*, os meios de cultura devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, além de uma fonte de carbono, sais e vitaminas (COOPER, 1982; HORÁK, 1997). Os principais compostos utilizados como fonte de carbono pela levedura são os monossacarídeos (frutose, glicose e galactose) e os dissacarídeos (maltose e sacarose) (FLORES et al., 2000).

O outro elemento essencial para os organismos vivos é o nitrogênio sendo que as células de leveduras podem utilizar uma ampla variedade de compostos nitrogenados como fontes de nitrogênio, inclusive amônio, aminoácidos e peptídeos (COOPER, 1992; TERSCHURE et al., 1995; WIAME et al., 1985). Entretanto, nem todas as fontes de nitrogênio propiciam crescimento igualmente eficiente: por exemplo, foi observado que amônia, glutamato, glutamina, e aspargina são preferencialmente utilizadas por leveduras e induzem altas taxas de crescimento (MAGASANIK, 1992).

Na seleção dos nutrientes necessários ao metabolismo celular as leveduras sofrem a repressão catabólica induzida pela fonte de carbono (Carbon catabolite repression) e a repressão catabólica induzida pela fonte de nitrogênio (Nitrogen catabolite repression), a utilização destes nutrientes impõem a levedura uma sequência ordenada de utilização de fontes de carbono e nitrogênio.

Além destas vias de regulação existem outras de sinalização e de sensoriamento de nutrientes em leveduras, além ainda, de ocorrer a integração de várias vias de regulação envolvendo aquelas descritas para o carbono e outras para o nitrogênio, criando um quadro complexo de regulação e sinalização (GANCEDO, 1998; SCHNEPER et al., 2004).

Os estudos da interação das fontes de carbono e nitrogênio no metabolismo das diferentes linhagens industriais, são importantes na medida em que estes compostos apresentam uma complexidade estrutural e são fontes utilizadas pela levedura para um bom desempenho metabólico. O efeito da interação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio na eficiência fermentativa das leveduras industriais, pode ser um fator importante para promover melhoria na eficiência fermentativa das leveduras industriais e melhorar a produção de etanol.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no metabolismo de linhagens utilizadas em usinas para produção de etanol, bem como, a produção de biomassa, viabilidade celular, consumo de açúcar e concentração de etanol.

2. Material e métodos

2.1 Micro-organismos

As linhagens liofilizadas foram obtidas através da empresa LNF Latino Americana Biotecnologia Aplicada, localizada (Rua Fioravante Pozza, 198 - Bento Gonçalves, RS). As linhagens estudadas foram: Catanduva 1 (CAT), e Pedra 2 (PE), amplamente utilizadas pelo parque industrial brasileiro. As leveduras liofilizadas foram cultivadas em meio (YPD 2%) para serem reutilizadas.

2.2 Meios de cultura

As células de leveduras foram mantidas em meio YPD 2% (m/v), contendo: 1,0% (m/v) de extrato de levedo, 1,0% (m/v) de peptona, 2,0% (m/v) de glicose e 2,0% (m/v) de agar. O meio básico de cultivo foi o meio YNB 0,17% (m/v), sem aminoácidos e sem sulfato de amônio.

2.3 Condições de cultivo

O meio básico de fermentação utilizado foi o meio: YNB 0,17% (m/v), suplementado com as fontes nitrogenadas e esterilizados em autoclave 120°C por 20 minutos. A solução de açúcar foi autoclavada separadamente, ambas as soluções tiveram o pH 5,0 ajustado com (ácido clorídrico 1,0 M) Após o período de esterilização as fontes de carbono foram adicionadas assepticamente ao meio de cultivo.

O inóculo utilizado, foi uma suspensão de células recém crescidas e coletadas da superfície da cultura estoque com alça de platina ressuspensa em água a uma concentração de 0,025 mg/cels/mL.

O meio fermentativo contendo o meio básico YNB 0,17% (m/v) foi suplementado com as respecti-

vas fontes de nitrogênio (peptona, casaminoácidos e sulfato de amônio), na concentração de 1% (m/v). As fontes de carbono glicose e sacarose na concentração 15% (m/v) foram asépticamente adicionadas ao meio básico. O crescimento celular foi realizado em frascos erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL do meio fermentativo e incubados 300C, por 60 horas a 250 rpm.

2.4 Métodos analíticos

Nas análises dos ensaios fermentativos, periodicamente alíquotas foram retiradas para a determinação dos parâmetros tais como: biomassa, viabilidade, açúcar residual e etanol.

As análises do crescimento celular foram realizadas através de medidas espectrofotométricas a 570nm, correlacionada com curva de calibração. A determinação da viabilidade celular foi acompanhada através do método de coloração com azul de metileno (LEE et al., 1981).

O consumo dos açúcares redutores totais (ATR) foi determinado através do método do ácido 3,5 dini-

trosalicílico DNS (MILLER, 1959). A concentração do etanol foi determinada no cromatógrafo a gás CG 3900 com detector de ionização de chama (Varian), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida (ZB-5) com 30m de comprimento, 25 cm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme. A condição cromatográfica empregada foi: volume de injeção 1 μ L, razão de split 1:20 e temperatura do forno em isoterma de 40°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C. As amostras foram filtradas em ultrafiltro de 0,22 μ m.

3. Resultados e discussão

As linhagens Catanduva-1 e Pedra-2 são as mais utilizadas nas usinas da região sul do estado de Mato Grosso do Sul (BATISTOTE et al., 2010) e também no parque industrial sucroenergético do país.

As figuras 1 e 2 mostram os parâmetros fermentativos das linhagens crescidas no meio YNB 017% (m/v) acrescido das diferentes fontes de carbono e nitrogênio durante um período de 60 horas de fermen-

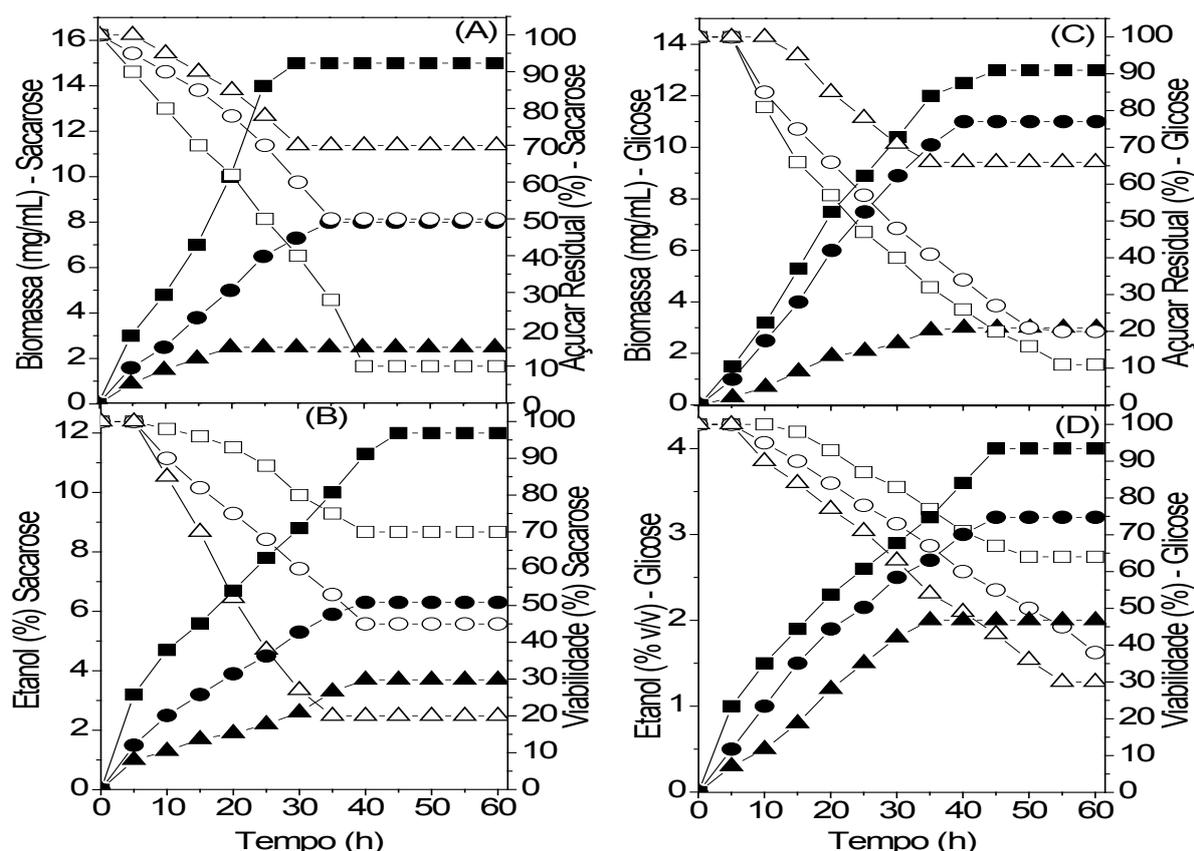


Figura 1: Determinação dos parâmetros fermentativos da linhagem Catanduva - 1 (CAT-1). As fontes de nitrogênio são representadas pelos símbolos, sendo fechado (■) biomassa e aberto consumo de açúcar (□) peptona, fechado (●) biomassa e aberto (○) casaminoácidos, (Δ) e (▲) sulfato de amônio. (A) biomassa e açúcar residual (sacarose 15%), (B) etanol e viabilidade (sacarose 15%), (C) biomassa e açúcar residual (glicose 15%), (D) etanol e viabilidade (glicose 15%). Fermentado na temperatura de 30°C, pH 5,0 por 60 horas a 250 rpm.

tação. Estas análises demonstraram que as linhagens apresentaram diferenças no perfil metabólico.

Na determinação dos parâmetros fermentativos a linhagem Catanduva-1 crescida em sacarose na concentração de 15% (m/v) (Figuras 1A e 1B) mostra uma alta produção de biomassa de 15 mg mL⁻¹, a taxa da viabilidade celular de 70%, consumindo praticamente todo o açúcar do meio apresentando uma concentração de 12% (v/v) de etanol, no meio suplementado com peptona. O meio suplementado com casaminoácidos a levedura analisada obteve uma produção de biomassa de 8,0 mg mL⁻¹ uma perda da viabilidade celular, o consumo de açúcar foi aproximadamente de 50%, produzindo aproximadamente 6% (v/v) de etanol. O meio complementado com sulfato de amônio apresentou um baixo rendimento fermentativo para todos os parâmetros analisados.

As Figuras 1C e 1D mostram a levedura Catanduva -1 crescida em glicose na concentração de 15% (m/v), a fonte nitrogenada peptona apresentou uma produção de biomassa de 13 mg mL⁻¹, a viabilidade

celular em torno de 75%, consumiu praticamente todo o açúcar e produzindo 4% (v/v) de etanol. O meio suplementado com casaminoácidos apresentou um crescimento celular de 8,0 g mL⁻¹ perda da viabilidade em 40%, consumo de açúcar de 20% e uma concentração de etanol de 3,3% (v/v). O meio complementado com sulfato de amônio, apresentou uma baixa produção de biomassa, um baixo consumo de açúcar e uma perda da viabilidade celular em torno de 30%.

O crescimento da linhagem Pedra - 2 na concentração de sacarose 15% (m/v) (Figuras 2A e 2B) mostram que o meio suplementado com peptona a levedura apresenta uma biomassa de 15 mg mL⁻¹, manteve a viabilidade em torno de 70%, consumindo praticamente todo o açúcar do meio e produzindo 11% (v/v) de etanol. Nos meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, para a levedura analisada apresentaram uma baixa produção de biomassa, baixo consumo de açúcar consequentemente comprometendo a produção de etanol.

A cinética de crescimento em glicose na concentração de 15% (m/v) (Figura 2C e 2D) no meio suple-

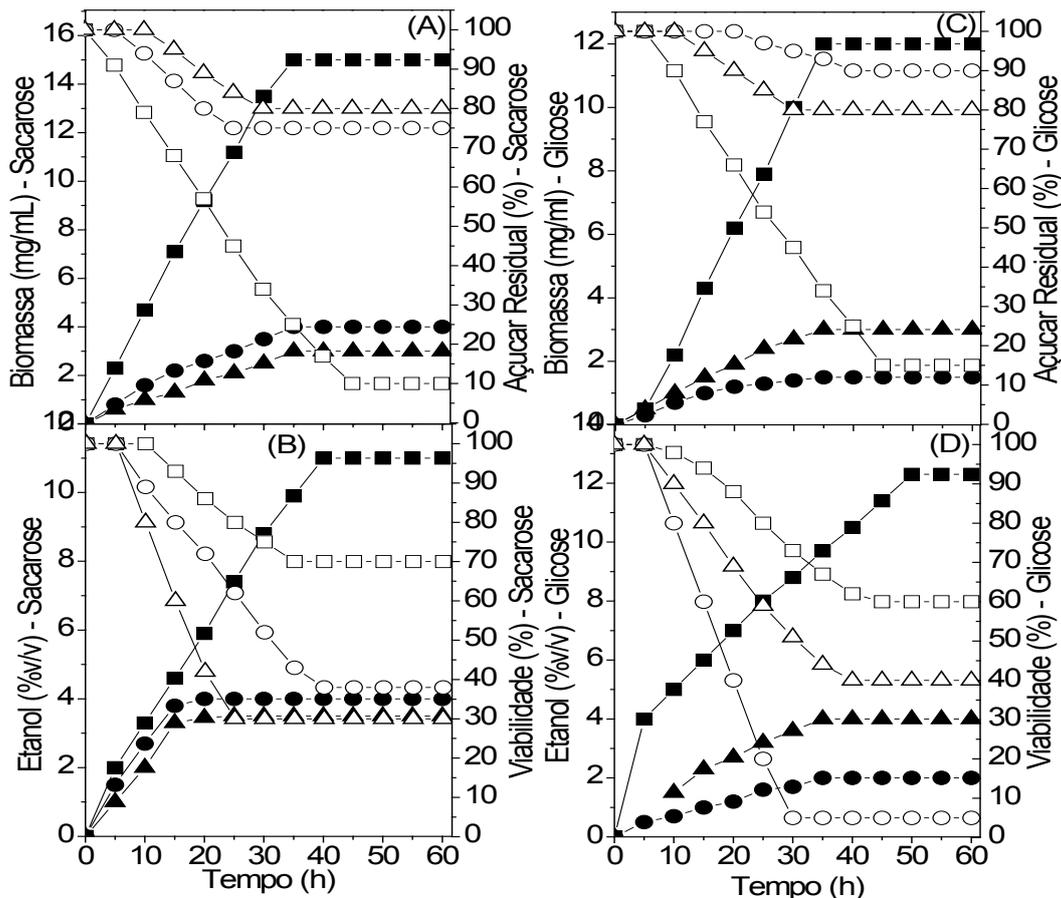


Figura 2: Determinação dos parâmetros fermentativos da linhagem Pedra - 2 (Pe-2). As fontes de nitrogênio são representadas pelos símbolos, sendo (■) e (□) peptona, (●) e (○) casaminoácidos, (Δ) e (▲) sulfato de amônio. (A) biomassa e açúcar residual (sacarose 15%), (B) etanol e viabilidade (sacarose 15%), (C) biomassa e açúcar residual (glicose 15%), (D) etanol e viabilidade (glicose 15%). Fermentado na temperatura de 30°C, pH 5,0 por 60 horas a 250 rpm.

mentado com peptona apresentou para a linhagem Pedra-2 uma biomassa de 12 mg mL⁻¹, viabilidade celular de 60%, consumindo praticamente todo o açúcar do meio e consequentemente produzindo uma elevada concentração de etanol aproximadamente 12% (v/v). Os meios complementados com casaminoácidos e sulfato de amônio apresentaram baixos rendimentos fermentativos. A peptona é o complemento nitrogenado que propiciou melhor desempenho fermentativo para a levedura Pedra-2 crescida em glicose e sacarose na concentração de 15% (m/v).

Os dados obtidos com as linhagens utilizadas em destilarias (Cat-1 e Pe-2), em relação aos parâmetros fermentativos analisados, mostram que apesar de serem selecionadas para processos industriais semelhantes e por serem da mesma origem, apresentaram perfis fermentativos diferentes em meio sintético contendo glicose e sacarose na concentração de 15% (m/v), em relação as diferentes fontes nitrogenadas.

Estudos de alterações nos perfis de utilização de maltose e glicose nas concentrações de 2 e 15% (m/v), em diferentes fontes nitrogenadas, empregando diferentes leveduras industriais, mostrou efeitos acentuados na produção de biomassa e etanol, e que este comportamento foi influenciado pela complexidade estrutural da fonte nitrogenada e concentração da fonte de carbono (BATISTOTE et al., 2006).

Na performance fermentativa das linhagens Catanduva-1, Barra Grande crescidas em meio sintético, acrescido de 22% de sacarose, suplementado com 1% de diferentes fontes nitrogenadas foi observado que as linhagens crescidas no meio com peptona de forma estática apresentaram alto acúmulo de biomassa, eficiente consumo de açúcar e mantiveram a viabilidade celular. Os meios complementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, as linhagens apresentaram uma baixa produção de biomassa o consumo de açúcar, a viabilidade celular variou entre as amostras estudadas (MIRANDA et al., 2009)

BATISTOTE et al (2010), analisaram as linhagens Catanduva-1 e Pedra-2 utilizadas em usinas no Mato Grosso do Sul, cultivadas em mosto a base caldo de cana na concentração de 15°Brix, as linhagens estudadas apresentaram performance fermentativa diferentes. A linhagem Cat-1 apresentou alta produção de biomassa 18mg mL⁻¹, mantendo elevada viabilidade celular em torno de 88%, alto consumo de açúcar, e uma produção de etanol 16 (v/v). A linhagem Pe-2 apresentou um crescimento de 16 mg mL⁻¹, e uma viabilidade celular, em torno de 82%, um bom consumo de açúcar e uma produção de 14% (v/v) de etanol.

Comparando esses resultados com os obtidos nesse estudo, observou-se que no meio sintético (YNB

0,17%) acrescido da fonte de carbono sacarose 15% e suplementado com 1% da fonte nitrogenada peptona as linhagens analisadas apresentaram maiores teores de etanol (12%, v/v). Comparando esses resultados, observa-se que as leveduras cultivadas em mostos apresentaram melhor desempenho fermentativo do que as crescidas em meios sintéticos.

4. Conclusão

Os resultados demonstram que a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio, em correlação com o tipo de açúcar, tem um efeito importante no desempenho fermentativo de leveduras industriais.

Os dados mostraram que as fontes de carbono contendo glicose e sacarose, suplementadas com a fonte nitrogenada peptona foram as que apresentaram melhor desempenho fermentativo para as linhagens estudadas.

No geral os meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, na presença de glicose e sacarose para as linhagens analisadas apresentaram baixa performance fermentativa.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, e a Empresa LNF Latino Americana Biotecnologia Aplicada por ceder as linhagens.

6. Referências

ANDRIETTA, M. G. S; STECKELBERG, C. E; ANDRIETTA. S. R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. Multi Ciências: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP, Campinas, v.7, n. 7, p. 1-16, 2006.

BATISTOTE, M.; Cruz, S. H; Ernandes, J.R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine strains influenced by the complexity of the nitrogen source. Journal of the Institute of Brewing, London, v. 112, n. 2, p. 84-91, 2006.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L.; ERNANDES, J. R.; RAMOS. D. D. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso

do sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar *Ciência e Natura*, Santa Maria, v. 32, n. 2, p.83-95, 2010.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Strathern J N, Jones E W, Broach J B, editors; Strathern J N, Jones E W, Broach J B, editors. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression*. New York, v. 1, p.39-99, 1982.

FLORES, C. L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non- conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, Madrid, v. 24, p. 507-529, 2000.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Madrid, v. 62, n. 2, p. 334-361, 1998.

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, Czech Republic, v. 1331, n. 2, p. 41-79, 1997.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, New York, v.11, p. 641-649, 1981.

MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. In: BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; JONES, E. W. (Ed). *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*, New York: Cold Spring Harbor, v. 2, p. 283, 1992.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, M. J. R.; BATISTOTE. M. CILLI, E. M.; ERNADES, J. R. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.115, n. 3, p.191-197, 2009.

PULZATTO, M. E. Fatores que influem na obtenção de biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*) na fermentação

alcoólica. 2000. p. 112. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SCHNEPER, L.; DUVEL, K.; BROACH, R. J. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, New Jersey, v.7, p. 624-630, 2004.

TERSCHURE, E. G.; SILLJÉ, H. H. W.; RAEVEN, L. J. R. M.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, Netherlands, v. 141, p. 1101-1108, 1995.

WIAME, J. M.; GRENSON, M.; ARST, H. N. Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Advances in Microbiology Physiology*, London, v.26, p. 1-88, 1985.