



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

**ESTUDO FISIOLÓGICO DO EFEITO DA COMPLEXIDADE
ESTRUTURAL DA FONTE DE NITROGÊNIO NO MEIO DE CULTURA
NO METABOLISMO DE LEVEDURAS**

Margareth Batistote

Orientador: **Prof. Dr. José Roberto Ernandes**

Trabalho apresentado ao Instituto de Química, UNESP, Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

ARARAQUARA

2006

MARGARETH BATISTOTE

**ESTUDO FISIOLÓGICO DO EFEITO DA COMPLEXIDADE ESTRUTURAL DA
FONTE DE NITROGÊNIO NO MEIO DE CULTURA NO METABOLISMO DE
LEVEDURAS**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ernandes

ARARAQUARA

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

B333e Batistote, Margareth
 Estudo fisiológico do efeito da complexidade estrutural da fonte de
nitrogênio no meio de cultura no metabolismo de leveduras / Margareth
Batistote. -- Araraquara : [s.n], 2006
 175 f. : il.

 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
 Orientador: José Roberto Ernandes

 1. Biotecnologia. 2. Leveduras. 3. Metabolismo. 4. Nitrogênio. 5. Carbono.
I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dados curriculares

Margareth Batistote

1. Dados pessoais

Nascimento: 07 de Maio de 1963

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: Campo Grande - MS

Estado civil: solteira

Filiação: Adelino Batistote

Nilza Guimarães Batistote

Profissão: Bióloga

Documento de Identidade: 153743

Cadastro de Pessoa Física: 294.454.931-68

Endereço: Rua Santa Amélia, 632 VI. Carvalho

CEP: 79100-240 – Campo Grande, MS

Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni s/n

CEP: 14800-900 – Araraquara, SP

2. Formação acadêmica

Licenciada em Biologia, Curso de Biologia, concluído em 15 de Junho de 1988, Faculdades Unidas Católicas de Mato Grosso. Campo Grande – MS.

Especialização em Biologia Geral, concluído em 29 de Julho de 1990, Fundação Educacional Serevino Sombra. Rio de Janeiro – RJ.

Mestrado em Microbiologia, concluído em 31 de Julho de 1998, Universidade Estadual de Londrina. Londrina – PR.

Doutorado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em andamento, Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

3. Atividades de pesquisa

3.1. Trabalhos apresentados em congressos nacionais

BATISTOTE, M., OGATA, S.Y., KANESHIMA, E. N., CAVAZZANA JR, M., CATARINO L.M.G.M., JANKEVÍCIUS J.V., UEBO, C.T., BACAN G.C., JANKEVÍCIUS, J.V. and S. ITOW-JANKEVICIUS. Enzymatic profiles of ornithine-arginine cycle of fitly isolates from phytophagus Hemiptera. XI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protologia. Caxambu-MG, 1995.

CATARINO, L.M.G., BATISTOTE, M., PINTO, F.G.S., ONO, C.J., YAMADA, S.F., JANKEVÍCIUS, J.V. and S. ITOW-JANKEVICIUS. Nutricional and enzymatic of trypanosomatids isolated from Malus sp (Argentina), Amarantus (Spain), Euphorbia hyssopifolia (Brasil), and from phytophagous Hemiptera (Brasil). XII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protologia. Caxambu-MG, 1996.

CAVAZZANA JR, M., KANESHIMA, E. N., REICHE, E.M.V., BATISTOTE, M., JANKEVÍCIUS, J.V. and S. ITOW -JANKEVÍCIUS. AP – PCR: studies of dna polymorphism of genus Crithidia, trypanosomatidae isolated from phytophagous Hemiptera. XXI Reunião de Genética de Microrganismos, Londrina – PR, 1997.

BATISTOTE, M., SANTOS, N.A., OGATA, S., LIRA, P.C.N., RAMALHO, M . and S. I. TOW-JANKEVÍCIUS. Tripanossomatídeos de insetos: caracterização morfológica e fisiológica. 11^o Encontro de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS), Sao Pedro – SP, 2000.

CRUZ, S.H., BATISTOTE, M., ERNANDES, J.R. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of nitrogen source on yeast growth and fermentation. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu-MG, 2003.

BATISTOTE, M., CRUZ, S.H., ERNANDES, J.R. Altered patterns of sugar utilization by industrial yeast influenced by the complexity of nitrogen source XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu-MG, 2004.

BATISTOTE, M., ERNANDES, J.R. Studies on the accumulation of Trealose and Glicogen in industrial Influence of sugars and the structural complexity of nitrogen source. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia-SP, 2005.

BATISTOTE, M., CRUZ, S.H., ERNANDES, J.R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine yeasts influenced by the complexity of nitrogen source. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia-SP, 2006.

3.2. Publicações

BATISTOTE, M.; S. ITOW-JANKEVICIUS Genética variability of trypanosomatids isolated from phytophagous Hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic marks. **Journal . Parasitology**, v. 87, p.1335-1341, 2001.

CRUZ, S.H., BATISTOTE, M., ERNANDES, J. R. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of the nitrogen source on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, p. 349-355, 2003.

BATISTOTE, M.; CRUZ, S. H.; ERNANDES, J. R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine yeasts influenced by the complexity of nitrogen source. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, 2006 (aceito).

3.4. Participação em congressos

XI a XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, anos de 1995 a 1997.

XXI Reunião de Genética de Microrganismos REGEMI, ano, 1997.

XXIII Congresso Brasileiro de Zoologia, ano, 2000.

XXXI a XXXIV Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, anos de 2002 a 2006.

Dedico este trabalho a Deus,

“Meu Pastor, meu refúgio, minha luz, força e humildade...a minha fé que sem ela nada conquistaria. Senhor Obrigado pelo Dom da Vida.

Aos meus Pais Adelino Batistote (In memorian) e Nilza Guimarães Batistote, por todo apoio, diálogo, ensinamentos transmitidos pelo amor incondicional a mim dedicado. E por me ensinarem a ter força e coragem para enfrentar todos os obstáculos que surgirem ao longo da minha caminhada. Meus verdadeiros mestres, muito obrigada.

A toda minha família e amigos, por todo apoio e incentivo!

Amo vocês!

À Deus

*Uma noite eu tive um sonho
Sonhei que estava andando na praia com o Senhor
E através do céu passavam cenas da minha vida.
Para cada cena que passava,
Percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia,
Um era o meu e o outro do Senhor.
Quando a última cena da minha vida passou diante de nós,
Olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes
No caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia.
Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e
Angustiosos da minha vida.
Isso aborreceu-me deveras,
E perguntei então ao Senhor:
“Senhor, tu disseste que, uma vez que eu resolvi te seguir,
Tu andarás sempre comigo todo o caminho,
Mas notei que, durante as maiores tribulações do meu viver,
Havia na areia dos caminhos da vida apenas um par de pegadas.
Não compreendo porque, nas horas em que eu necessitava de Ti,
Tu me deixaste!”
O Senhor me respondeu:
“Meu precioso filho, eu te amo e jamais te deixarei nas horas da tua
prova e do teu sofrimento.
Quando viste na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí
Que eu te carreguei nos braços!”*

PEGADAS NA AREIA

Agradecimentos

O final de uma tese é um momento vivenciado por uma avalanche de sentimentos (de um lado alegria, alívio e cansaço; de outro, tristeza, incerteza, expectativa e otimismo) e marcado por um processo de aprendizagem, amadurecimento pessoal, profissional e acadêmico. Em meio a muitas sensações vivenciadas nesta fase está a certeza da conquista de mais um ideal, o qual só foi possível com muita determinação, e perseverança. Também constitui um momento de reconhecimento e, portanto, ficam aqui os meus agradecimentos a muitas pessoas importantes, sem as quais este trabalho não seria concluído.

Os meus mais sinceros agradecimentos Prof. Dr. José Roberto Ernandes, pela oportunidade de trabalho, orientação, confiança, pelas valiosas discussões e sugestões, especialmente pela amizade. E por ter acreditado e apostado em mim.

Às Prof^{as}. Dr. Maria Célia Bertolini e Cecília Laluce por permitirem a utilização dos laboratórios e equipamentos sob suas responsabilidades.

Ao Prof. Dr Eduardo M. Cilli , pela orientação, colaboração e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr João Atílio, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, pela oportunidade de usufruir de seus conhecimento e experiências durante a realização deste trabalho, e o Prof. Dr Jonas Contieiro, Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP, pelas discussões e sugestões no Exame Geral de Qualificação.

A Prof. Dr. Sandra Helena da Cruz, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, (USP) pela amizade, pelas nossas conversas, pela sua simpatia, prestatividade, pelas preciosas sugestões e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, principalmente do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica pelo companheirismo e convivência, Crisla, Karen, Eliane, Kátia, Patrícia, Saulo, Fernando, Sandro e Crusca.

A todos a minha família por todo amor, carinho e incentivo e confiança.

Aos casais Sr. Luis Carlo e Marlene e ao Sr. Claudinei e Maria Inês, pela amizade apoio e incentivo.

A minha pequena e grande amiga Elaine Cristina Teixeira, e Carla Kawaguti pelos anos de convivência, pelas conversas, por estarem sempre por perto nas horas alegres e tristes em que sempre precisamos de um ombro amigo. Pelas “conversas sérias” que nos fazem crescer e rever conceitos. Pelas risadas e também por chorarmos juntas, pela confiança, pelos ensinamentos e ajuda no laboratório, enfim por serem minhas amigas. Obrigada por vocês estarem presentes na minha vida.

Aos meus amigos de outras matizes, que apesar da distância e do tempo, estamos sempre ligados pelo mesmo sentimento fraterno. Maria das Graças B. Marietto, Leonice Souza, Vilma Maldonato, Suely Azevedo, Celly Gonçalves, Transwal B. Marietto, Margarete da Silva, Wagner da Silva, Marta Oliveira, Mônica Leirias Santos, Luis Eduardo Guimarães, Antônio de Albuquerque e Djalmir César Seixas.

Aos amigos Ana Paula Felício, Eduardo Hilário, Fernanda Zanolli, Renato Magalhães de Paula e Rosana Inácio dos Reis, Mônica Cristina Terrão e Aline pela receptividade, amizade, discussões, pelos valiosos ensinamentos, pelos bons momentos que passamos juntos, pela ótima convivência. Vocês foram e são muito especiais para mim.

Ao meu bem vindo amigo de trabalho Messias Miranda, sempre disposto a me ajudar, pela vontade de aprender, pela amizade, pela sua valiosa ajuda e discussões, pelos bons momentos de convivência.

Ao pessoal do laboratório, Juliana, Luiz Carlos, Flávia, Gisele, Patrícia, Wesley e ao Rodrigo que estão ingressando agora, pela amizade, conversas e bons momentos.

Ao pessoal que passou pelo laboratório, em especial, ao Rômulo, Luciano Apponi, Alessandra Jim, Patrícia Maida, Mary Helen, Evelyn, Keyte, Viviane, Marcelo, Maria Helena, Lísia, Alessandro, Alice e Denis.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química: Tarcísio e Fernando pelos ensinamentos, presteza, colaboração e amizade durante estes anos. E a Zilda, Telma, Fátima e Waldenir, por toda ajuda e pela convivência.

As minhas colegas anteriores e atuais de república pela convivência, paciência, estímulo e desabafos: Maira, Ana Lúcia, Mariana, Karin, Tamara, Livia, Michele e Carolina.

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação (Izolina, Sandra, Patrícia e Célia) e da biblioteca pelo auxílio e colaboração.

A todos os funcionários do Instituto de Química.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Meu muito obrigada!

Resumo

Saccharomyces cerevisiae, é um fungo leveduriforme responsável por processos fermentativos no Brasil e no mundo. Estes processos são importantes na produção de: pães, bebidas e produção de etanol, gerando altos valores econômicos e colocando este microrganismo na vanguarda mundial. Tendo em vista os altos valores econômicos gerados pelas leveduras, conhecer de forma mais detalhada este organismo e seus processos fisiológicos, possibilitará o melhoramento dos processos industriais dos quais ele participa.

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar estudos do efeito da complexidade estrutural de fontes de nitrogênio no fluxo metabólico do carbono em leveduras industriais utilizadas nas indústrias de panificação, de produção de vinhos e cervejas. Os meios básico de cultura continham vitaminas e sais essenciais, um açúcar (glicose, galactose ou maltose) como fonte de carbono e uma fonte nitrogenada variando de um simples sal de amônio (sulfato de amônio), a aminoácidos livres (casaminoácidos) e peptídeos (peptona). Os estudos envolveram: a) determinação do desempenho fermentativo de leveduras industriais em meios de cultivo suplementado com fontes de nitrogênio com diferentes graus de complexidade estrutural e com diferentes açúcares; b) estudo do efeito da utilização de diferentes frações peptídicas isoladas de peptona no desempenho fermentativo das leveduras industriais; c) avaliação do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio na produção dos carboidratos de reserva glicogênio e trealose por leveduras industriais.

Através da determinação dos parâmetros fermentativos das leveduras foi possível verificar que o tipo da fonte de carbono e a complexidade estrutural da fonte nitrogenada causam efeitos diferentes sobre o metabolismo das leveduras industriais. No geral, no meio contendo glicose (um açúcar repressor), a peptona é o complemento nitrogenado que proporciona melhor desempenho fermentativo para as linhagens, com maior produção de biomassa e etanol, com a preservação da viabilidade celular. Entretanto, na fermentação da galactose e maltose (açúcares reprimidos por glicose) o melhor desempenho fermentativo foi no meio contendo casaminoácidos. Uma das linhagens de cervejaria e uma de vinícola, não conseguiram fermentar (produzir etanol) em maltose e galactose no meio suplementado com peptona. Este resultado é interessante do ponto de vista industrial, onde na maioria das vezes os meios de produção apresentam composição variada de açúcares e compostos nitrogenados. O aumento da concentração da fonte nitrogenada restabeleceu a capacidade da linhagem cervejeira de fermentar maltose e galactose. Este resultado é indicativo da deficiência

das referidas linhagens de utilizar fonte de nitrogênio na forma de peptídeos, o que não aconteceu com outras linhagens. O sulfato de amônio, em todas as condições estudadas, sempre induziu um desempenho fermentativo inferior.

Os estudos com frações peptídicas isoladas da peptona como fonte de nitrogênio, indicam que as linhagens apresentam capacidades diferenciadas em utilizar peptídeos, o que em parte corrobora os resultados obtidos no estudo do desempenho fermentativo das linhagens industriais em fonte de nitrogênio com complexidade estrutural diversificada.

Os resultados obtidos com os carboidratos trealose e glicogênio estão de acordo com o comportamento esperado para o acúmulo destes compostos, uma vez que foi observado que a quantidade destes carboidratos de reserva nas células sofrem acentuadas variações em resposta a diferentes alterações nutricionais experimentadas pelas leveduras durante o processo fermentativo, e isto ocorre como consequência do complexo sistema regulatório que controla a produção dos carboidratos. A maioria dos dados indica que a quantidade de trealose e glicogênio foram sempre maiores na suplementação com amônio e menor com peptona. A concentração de trealose e glicogênio produzidas pelas linhagens talvez reflita o processo de seleção a que foram submetidas as linhagens, o tipo e concentração da fonte de carbono, o tempo de fermentação e também com a natureza estrutural da fonte de nitrogênio.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae, is a budding yeast responsible for fermentative processes in Brazil and in the world. These processes are important is the production of breads, drinks, and ethanol, generating high economic values and placing this microorganism in the worldwide vanguard. In view of this, the knowledge of the organism and its physiology will make possible the improvement of the industrial processes of which it is involved.

The present work had as main objective to carry out studies of effects of the structural complexity of nitrogen sources in the metabolic flux of carbon in industrial yeasts used in the production of bread, wines, and beers. The basic media contained vitamins and essentials salts, sugar (glucose, galactose or maltose) as carbon source and a nitrogen source varying of a simple ammonium salt (ammonium sulphate), the free amino acids (casamino acids) and peptides (peptone). The studies involved: a) evaluation of fermentative performance of industrial yeasts in media supplemented with nitrogen sources with differing degrees of structural complexity and with different sugars; b) study of the effect of the use of different peptides fractions isolated of peptone in the fermentative performance of the industrial yeasts; c) evaluation of the effect of the structural complexity of the nitrogen source in the production of reserve carbohydrates glycogen and trehalose by industrial yeasts strains.

Considering the fermentative parameters it was possible to verify that the type of the carbon source and the structural complexity of the nitrogen source induced different effects on the metabolism of industrial yeast. In the general, in the medium containing glucose (repressive sugar), the peptone is the nitrogen complement that provides a better fermentative performance, with high production of biomass and ethanol, preserving of the cellular viability.

However, in the fermentation of galactose and maltose (sugars repressed by glucose) the optimum fermentative performance occurred in the medium containing casaminoacids. One strain of brewing and one of wine didn't produce high levels of ethanol in maltose and galactose in medium supplemented with peptone. This result is interesting of the industrial point of view, because most production media present a varied composition of sugars and nitrogen sources. Increasing the concentration of the nitrogen source reestablished the capacity of the beer strains ferment maltose and galactose. This result is an indicative of differing ability of industrial strains to use nitrogen source in the form of peptides. The ammonium sulphate, in all the studied conditions, always induced a lower fermentative performance.

The studies with isolated peptides fractions from peptone as a nitrogen source indicate that the industrial strains show different capabilities of using peptides. This suggest that the results obtained in the studies of the fermentative performance using nitrogen source with diversified structural complexity, is in part due the differing ability of industrial strains to use peptides.

The results obtained with the carbohydrates trehalose and glycogen are in accordance with the expected behavior for the accumulation of these compounds, once it was observed that the amount of these reserve carbohydrates of in the cells suffers accented variations in response to the different nutritional alterations experienced by the yeasts during the fermentative process. This may occurs as consequence of the complex regulatory system that controls the production of the carbohydrates.

The majority of the data indicates that the amount of trehalose and glycogen was always higher under ammonium and casamino acids supplementation than with peptone. Perhaps the concentration of trehalose and glycogen produced by the strains reflects the process of selection that the strains were submitted, the type and concentration of the carbon source, the time of fermentation and also with the structural nature of the nitrogen source.

Figuras

1. *Fotografia da célula de Saccharomyces cerevisiae em reprodução por brotamento.* 32
2. *Assimilação de nutrientes pela célula de levedura.* 40
3. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de glicose.* 58
4. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de glicose.* 59
5. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de glicose.* 60
6. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de glicose.* 61
7. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de glicose.* 62
8. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de glicose.* 63

glicose.

9. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de glicose.* 64

10. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de glicose.* 65

11. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de galactose.* 68

12. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de galactose.* 69

13. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de galactose.* 70

14. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de galactose.* 71

15. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de maltose* 74

16. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de maltose.* 75
17. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de maltose.* 76
18. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 2% de maltose.* 77
19. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de maltose.* 78
20. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de maltose.* 79
21. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de maltose.* 80
22. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 1% e 15% de maltose.* 81
23. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e* 86

- viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de glicose.*
24. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de glicose.* 87
25. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de glicose.* 88
26. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de galactose.* 90
27. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de galactose.* 91
28. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de galactose.* 92
29. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de maltose.* 94
30. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em* 95

meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de maltose.

31. *Produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio 3% e 15% de maltose.* 96

32. *Efeito da utilização das frações peptídicas isoladas da peptona, produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3, L52 e Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo a fração (4-8) em 2% de Glicose.* 102

33. *Efeito da utilização das frações peptídicas isoladas da peptona, produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3, L52 e Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo a fração (9-14) em 2% de Glicose.* 103

34. *Efeito da utilização das frações peptídicas isoladas da peptona, produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3, L52 e Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo a fração (4-8) em 2% de maltose.* 104

35. *Efeito da utilização das frações peptídicas isoladas da peptona, produção de biomassa, açúcar residual, produção de etanol e viabilidade celular de S. cerevisiae (A3, L52 e Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo a fração (9-14) em 2% de maltose.* 105

36. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 108

37. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de* 108

amônio.

38. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. 109

39. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. 109

40. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. 110

41. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. 110

42. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. 112

43. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. 112

44. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. 112

45. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 113
46. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 114
47. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 114
48. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de galactose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 116
49. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de galactose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 116
50. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de galactose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio* 117
51. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de galactose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 117
52. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de* 118

galactose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.

53. *Perfil dos níveis de glicogênio em células de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de galactose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio* 118

54. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 120

55. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio* 120

56. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio* 121

57. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 121

58. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 122

59. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de glicose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 122

60. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (A3) durante* 124

crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.

61. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 124

62. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 125

63. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (L52) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 125

64. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 126

65. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (Fiso) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de maltose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 126

66. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de galactose suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 128

67. *Perfil dos níveis de trealose em células de S. cerevisiae (A3) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de galactose* 128

suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.

68. Perfil dos níveis de trealose em células de *S. cerevisiae* (L52) durante 129
crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de galactose
suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de
amônio.

69. Perfil dos níveis de trealose em células de *S. cerevisiae* (L52) durante 129
crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de galactose
suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de
amônio.

70. Perfil dos níveis de trealose em células de *S. cerevisiae* (Fiso) durante 130
crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% (p/v) de galactose
suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de
amônio.

71. Perfil dos níveis de trealose em células de *S. cerevisiae* (Fiso) durante 130
crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) de galactose
suplementado com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de
amônio.

Tabelas

<i>Tabela 1. Produção de biomassa, etanol e viabilidade celular de linhagens de cervejaria e vinícola cultivadas em meio YNB contendo 2% e 15% glicose e diferentes fontes de nitrogênio.</i>	83
<i>Tabela 2. Produção de biomassa, etanol e viabilidade celular de linhagens de cervejaria e vinícola cultivadas em meio YNB contendo 2% e 15% maltose e diferentes fontes de nitrogênio.</i>	83
<i>Tabela 3. Produção de biomassa (mgcels/mL) e de etanol (% v/v, valor entre parênteses) produzidos por linhagens industriais em meios com diferentes açúcares 15% e nas concentrações de 1 e 3% (p/v) de fonte de nitrogênio.</i>	99
<i>Tabela 4. Efeito das diferentes fontes de carbono e nitrogênio no perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio e trealose em células cultivadas em peptona</i>	132
<i>Tabela 5. Efeito das diferentes fontes de carbono e nitrogênio no perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio e trealose em células cultivadas em casaminoácido.</i>	133
<i>Tabela 6. Efeito das diferentes fontes de carbono e nitrogênio no perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio e trealose em células cultivadas em sulfato de amônio.</i>	134

Abreviaturas:

Ale e lager - tipos de linhagens de cervejaria

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico

D.O - densidade óptica

Fiso - colônia isolada da levedura de panificação “Fleischmann e Royal Produtos alimentícios Ltda”

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

M - molar

mM - milimolar

mg - miligramas

mL - mililitros

nm - nanômetros

nmoles - nanomoles litros

sulfato de amônio - (NH₄SO₄)

YNB - yeast nitrogen base

YPD (ou YEPD) - meio de cultivo contendo extrato de levedo, peptona e glicose

VIN7 e VIN13 – tipos de linhagens de vinícola

μg - microgramas

μL - microlitros

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	30
I.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
I.2. EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DOS MICRORGANISMOS	33
I.2.1. Fontes de carbono	34
I.2.2. Fontes de nitrogênio	36
I.2.3. Transporte de açúcares e compostos nitrogenados	38
I.3. CARBOIDRATOS DE RESERVA	41
I.3.1. Glicogênio	41
I.3.1.1. Descrição	41
I.3.2.1 Funções	41
I.3.3.1 Metabolismo	42
I.3.2. Trealose	42
I.3.2.1. Descrição	43
I.3.2.2. Funções	43
I.3.2.3. Metabolismo	44
II. OBJETIVO	46
III. MATERIAS E MÉTODOS	48
III.1. Microrganismos utilizados	48
III.2. Meios de cultivo	48
III.3. Manutenção da cultura e preparo do inóculo	49
III.4. Condições de crescimento e obtenção da suspensão de células	49
III.5. Obtenção da suspensão de células	49
III.6. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS	50
III.6.1. Determinação do crescimento célula	50
III.6.2. Determinação da viabilidade celular	50
III.6.3. Determinação do açúcar residual	50
III.6.4. Determinação de etanol	51
III.7 .PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS A PARTIR DE PEPTONA	51
III.8. .PRODUÇÃO DE TREALASE SEMI-PURIFICADA, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICOGÊNIO E TREALOSE	52
III.8.1. Manutenção do fungo	52
III.8.2. Produção de trealose semipurificada	52
III.8.3. Extração e quantificação simultânea de Trealose e Glicogênio	52
III.9. Reprodutibilidade	53
IV. RESULTADOS	55
IV.1. Estudos realizados com diferentes fontes de carbono e de nitrogênio	56
IV.1.1. Estudos com diferentes concentrações de glicose	56
IV.1.2. Estudos com diferentes concentrações de galactose	66
IV.1.3. Estudos com diferentes concentrações de maltose	72
IV.1.4 .Análise comparativa dos parâmetros fermentativos entre as leveduras de cervejaria e vinícula	82
IV.2. A influência do aumento da concentração da fonte de nitrogênio no desempenho das linhagens A3 e L52 e Fiso	85
IV.2.1. Estudos com diferentes concentrações de glicose	85
IV.2. 2. Estudos com diferentes concentrações de galactose	89
IV.2.3. Estudos com diferentes concentrações de maltose	93
IV.3. O estudo com frações peptídicas isoladas da peptona pelas leveduras industriais	100

IV.3.1. Estudos com diferentes frações da peptona em glicose	100
IV.3.2. Estudos com diferentes frações da peptona em maltose	100
IV.4. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no perfil dos níveis de glicogênio e trealose em células de leveduras industriais crescidas em diferentes açúcares	106
IV.4.1 .Perfil dos níveis de glicogênio em células crescidas em glicose	107
IV.4.2. Perfil dos níveis de glicogênio em células crescidas em maltose	111
IV.4.3. Perfil dos níveis de glicogênio em células crescidas em galactose	115
IV.4.4. Perfil dos níveis de trealose em células crescidas em glicose	119
IV.4.5. Perfil dos níveis de trealose em células crescidas em maltose	123
IV.4.6. Perfil dos níveis de trealose em células crescidas em galactose	127
IV.4.7. A influência da fonte de carbono e nitrogênio no acúmulo dos níveis de glicogênio e trealose em células de levedura	131
IV.4.7.1. Influência da fonte de carbono e nitrogênio no acúmulo dos níveis de glicogênio de trealose em células de leveduras – peptona	132
IV.4.7.2. Influência da fonte de carbono e nitrogênio no acúmulo dos níveis de trealose em células de leveduras – casaminoácidos	133
IV. 4.7.3. Influência da fonte de carbono e nitrogênio no acúmulo dos níveis de trealose em células de leveduras – sulfato de amônio.	134
V. DISCUSSÃO	136
VI. REFERÊNCIAS	147
VII. ANEXOS	157

Introdução

I.1 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

A exploração de organismos vivos tais como plantas, animais e microrganismos são sabiamente explorados pelos seres humanos por vários séculos, com aplicações que abrangem desde a indústria de alimentação, de medicamentos e de diferentes processos industriais. O reino dos fungos é um dos mais numerosos, são organismos unicelulares, de vida livre e algumas espécies são importantes devido a sua grande biodiversidade no planeta. Por isto há um enorme potencial a ser explorado por estes microrganismos que possuem uma das mais fascinantes e importantes propriedades, que é a habilidade de converter substratos em produtos de interesse biotecnológico (OSTERGAARD *et al.*, 2000). E neste universo estão inseridas as leveduras as quais representam aproximadamente 700 espécies descritas, sendo que algumas têm sido bem caracterizadas, fazendo com que este grupo de microrganismos seja qualitativamente e economicamente importante nos processos industriais (STEWART & RUSSELL, 1998).

Os fungos leveduriformes, do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, são organismos eucariotos unicelares extremamente versátil no seu metabolismo, que se reproduzem por esporos e brotamento (Figura 1), possui 16 cromossomos lineares e a seqüência genômica indica que aproximadamente 6000 genes são funcionais (GOFFEAU *et al.*, 1996), sendo que dois terços dos genes possuem funções baseadas no fenótipo ou mutações com nenhuma homologia com proteínas conhecidas (WU *et al.*, 2002). São tradicionalmente utilizados na indústria de panificação, na produção de bebidas alcoólicas e etanol combustível. Milhares de toneladas de leveduras são produzidos somente para a indústria de panificação, fazendo destes microrganismos um dos mais importantes produtos da biotecnologia (BEUDEKER *et al.*, 1990). Outras aplicações de leveduras incluem a produção de enzimas, nucleotídeos, vitaminas, glicoproteínas, coenzimas, ácidos nucléicos e lipídios.

Espécies selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* e os seus mutantes com características genéticas definidas têm sido selecionadas e usadas para a elucidação de mecanismos de sinalização celular e de regulação metabólica. Várias técnicas são aplicadas no estudo e na caracterização destes organismos, tais como: a genética clássica, as novas ferramentas da biologia molecular, bem como os parâmetros fisiológicos. As técnicas da genética clássica consistem em fusão por protoplastos, cariogamia, entre outras (SPENCER *et al.*, 1987; COX, 1995; GEORGIEVA &

ROTHSTEIN, 2002). Uma das importantes aplicações das novas ferramentas da biologia molecular consiste no isolamento do gene de interesse e a transferência deste para outros organismos. Uma das estratégias utilizadas no melhoramento de organismos tem sido a indução randômica de mutações e subsequente seleção dos mutantes mais promissores, os quais são identificados por processos de "screening".

No entanto, o rápido desenvolvimento da genética molecular, principalmente da tecnologia do DNA recombinante, e a melhor compreensão dos processos de sinalização celular e de regulação vêm possibilitando o desenvolvimento de uma nova área científica, conhecido como engenharia metabólica (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998), que permite o aprimoramento genético de microrganismos visando a sua melhor adequação aos processos biotecnológicos. O aprimoramento dos microrganismos é associado a estudos complexos do metabolismo, que incluem as análises de fluxos metabólicos (AFM), que consideram o conjunto de todos os processos químicos que ocorrem numa célula (MADIGAN *et al.*, 1997). Isto é importante para entender como devemos manipular o genoma e as condições de cultivo de um organismo, no sentido de melhorar os processos de obtenção de produtos de interesse para o homem. Atualmente, encontram-se disponíveis protocolos experimentais para praticamente qualquer manipulação genética a ser introduzida em organismos de importância industrial. No entanto, ainda não está tão bem resolvida a questão de qual a melhor forma de se aplicar estes protocolos, ou seja, quais genes devem ser modificados e de que maneira. A dificuldade reside no fato de que as células vivas são extremamente complexas, e que uma determinada modificação genética raramente produz um único e exclusivo efeito desejado. Desta forma, é importante que se compreenda a complexa relação existente entre as várias vias metabólicas e os seus mecanismos regulatórios, quando se objetiva obter um organismo produtor com características melhoradas.

O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado com linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na indústria de panificação, na produção de cervejas e de vinhos. A escolha destas leveduras deveu-se ao fato de possuírem origens diferentes e por fermentarem substratos com composição complexa de fonte de carbono e de nitrogênio, e que são importantes do ponto de vista biotecnológico. Pelas razões acima expostas, as leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* tem sido alvo de vários estudos com fins científicos e aplicados e se tornou sinônimo de levedura. Nesta tese, a palavra levedura será usada na maioria das vezes no lugar de *Saccharomyces cerevisiae*.



Figura 1 – Células de *Saccharomyces cerevisiae*, reprodução por brotamento.
Fonte: *Saccharomyces cerevisiae*. Disponível em < www.med.sc.edu:85/mycology/micology-3.htm>. Acesso em 27 Julho 2006.

I.2. EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DOS MICRORGANISMOS

Em todos os processos industriais em que é utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, os meios devem conter necessariamente uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, além de sais e vitaminas (COOPER, 1982). Assim, os principais elementos utilizados pela levedura quanto à quantidade são carbono e nitrogênio. Isto implica que os fluxos de carbono e nitrogênio tanto quanto suas interações constituem parâmetros importantes na regulação do crescimento celular. A coordenação dos fluxos de carbono e nitrogênio pode ser regulada ao nível de assimilação ou do metabolismo, dependendo das condições de crescimento e da natureza da fonte de carbono e nitrogênio (ter SCHURE *et al.*, 1995, HORÁK, 1997, SCHNEPER *et al.*, 2004).

Na natureza e nos mostos industriais os nutrientes estão disponíveis de forma complexa e variável. Por exemplo, os mostos de cervejaria e vinícola contêm uma mistura diversificada de compostos: os monossacarídeos (glicose e frutose) e os dissacarídeos (maltose e sacarose) e outros açúcares como fonte de carbono; e um outro constituinte essencial é a fonte de nitrogênio, que nos mostos industriais, se constituem numa mistura de aminoácidos, peptídeos e uma quantidade de amônio livre (PIERCE *et al.*, 1987 ; STEWART & RUSSEL, 1998; MORENO-ARRIBAS *et al.*, 2002).

Para selecionar os nutrientes necessários a serem utilizados, as leveduras desenvolveram mecanismos celulares os quais são desencadeados por eventos de regulação conhecidos como repressão catabólica induzida pelo **carbono** (“Carbon catabolite repression”) ou pelo **nitrogênio** (“Nitrogen catabolite repression”), e estes impõem à levedura uma seqüência ordenada de utilização de fontes de carbono e de 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; THEVELEIN, 1994; SCHNEPER *et al.*, 2004).

O consumo total de açúcares por leveduras é fator essencial nos processos fermentativos, e é de vital importância selecionar linhagens de levedura que de forma rápida e eficiente utilizem os açúcares do mosto de fermentação. Entretanto, carboidratos não são os únicos nutrientes presentes nos mostos industriais. Considerando que uma quantidade apropriada e diversa de compostos nitrogenados é importante não só para completar com sucesso um processo fermentativo, mas também para se garantir a qualidade do produto, desta forma torna-se necessário

selecionar linhagens que não só utilizem todos os tipos de açúcares de forma rápida, mas que também possam consumir de forma apropriada todos os diferentes compostos nitrogenados com o objetivo de assegurar a qualidade do produto final.

I.2.1. Fontes de carbono

A fonte de carbono preferencial das leveduras é a glicose, e sua presença no meio de cultura desencadeia processos de regulação metabólica e a via de regulação mais conhecida é a repressão catabólica exercida pela glicose, e que pode ser definida como controle da expressão gênica, na etapa de transcrição de um conjunto amplo de genes, que ocorre quando as células são submetidas a diferentes concentrações de glicose. Neste processo de regulação a expressão dos genes envolvidos em diferentes funções celulares é alterada pelos mecanismos de sinalização celular induzidos pela glicose, entre elas estão: a utilização de fontes alternativas de carbono (dissacarídeos, galactose, glicerol e etanol), ciclo dos ácidos tricarbóxicos, respiração (ou cadeia respiratória); gliconeogênese, ciclo do glioxilato e outras (GANCEDO, 1998; THEVELEIN, 1994; SCHNEPER *et al.*, 2004).

No que diz respeito aos açúcares e a outras fontes de carbono, a glicose, através do efeito de repressão catabólica, inibe a expressão dos genes envolvidos com o metabolismo de fontes alternativas, como no caso da maltose e galactose. Este fenômeno exercido pela glicose impõe à levedura uma seqüência ordenada de utilização de fontes de carbono, e durante a fermentação de um meio contendo uma mistura complexa, como é, por exemplo, o mosto de produção de cerveja, a levedura será capaz de consumir, de forma seqüencial, os seguintes açúcares: sacarose, glicose, frutose, maltose e maltriose, podendo existir alguma superposição (STEWART & RUSSELL, 1998). No nosso trabalho, um resultado que está diretamente relacionado com a repressão catabólica, refere-se a diauxia. Em baixas concentrações de açúcar fermentescível (glicose, galactose e maltose), a levedura inicialmente utiliza o açúcar para produzir biomassa e etanol, e após a exaustão da glicose, o microrganismo utiliza aerobicamente o etanol como fonte de carbono.

Apesar de serem objetos de exaustiva investigação, os mecanismos através dos quais ocorrem a repressão catabólica e os outros processos de sinalização e regulação celular não estão totalmente elucidados. Os estudos mostram que as vias de regulação são complexas, envolvem um conjunto considerável de genes e de elementos protéicos

que atuam como elementos ativadores e repressores. Além da complexidade das vias que atuam na sinalização, sensoriamento e regulação do metabolismo do carbono, estão sendo descritos novos estudos que indicam uma possível integração de vários sistemas de sinalização e regulação, inclusive envolvendo a participação de elementos da via do carbono na regulação da utilização de fontes nitrogenadas (SCHNEPER *et al.*, 2004; PETER *et al.*, 2006).

O primeiro mecanismo de regulação de utilização de açúcar por leveduras é sua passagem através da membrana plasmática por transportadores específicos (figura 2). Nos estudos de transporte de glicose, que ocorre através de difusão facilitada, foram identificados dois componentes cinéticos, um de alta afinidade (K_m 1-2 mM) e outro de baixa afinidade ($K_m \sim 20$ mM). A manifestação destes componentes cinéticos depende da disponibilidade e da concentração de açúcar extracelular (BISSON, 1999; BISSON & FRAENKEL, 1983). Já foram identificados pelo menos 18 genes que codificam os transportadores relacionados com as hexoses, além do gene *GAL2* identificado como o transportador de galactose em *S. cerevisiae* (KRUCKEBERG & BISSON, 1990).

A exemplo da glicose, a galactose é transportada para o meio intracelular por difusão facilitada, por uma proteína codificada pelo gene *GAL2*. O metabolismo da galactose é regulado pela glicose, que além de regular a expressão do *GAL2* (galactose permease), controla também os genes *GAL1*, *GAL7* e *GAL10* que codificam, respectivamente as proteínas galactoquinase, galactose-1-fosfato uridiltransferase, UDP-glicose 4-epimerase; e Gal5 fosforoglicomutase (OSTERGAARD *et al.*, 2000). Os estudos cinéticos de transporte de galactose mostram a existência de dois componentes cinéticos: o de alta afinidade e o de baixa afinidade.

Maltose e maltotriose são os açúcares mais abundantes no mosto de cervejaria, portanto, a capacidade das leveduras de cervejaria em utilizar estes açúcares é de vital importância para o processo de produção de cerveja. O metabolismo da maltose também é regulado pela glicose, através do controle da expressão dos complexos gênicos de *MAL1* ao *MAL6*. O complexo mais estudado é o *MAL6*, constituído pelos genes que codificam, respectivamente, as proteínas maltose permease, maltase e uma proteína reguladora, que ativa a expressão dos genes *MAL61*, *MAL62*, e o próprio *MAL63* (GANCEDO, 1998). O transporte, hidrólise e a fermentação da maltose são importantes nas cervejarias, já que a maltose corresponde a 50-60% do açúcar fermentescível do mosto (STEWART & RUSSELL, 1998). O transporte da maltose

ocorre por um mecanismo conhecido como simporte ativo. Acredita-se que o metabolismo da maltotriose seja semelhante ao da maltose.

Uma descrição mais detalhada do controle do metabolismo de açúcares através do mecanismo de repressão catabólica e de outras vias de sinalização celular pode ser encontrada nos artigos de revisão citados em Bibliografia (GANCEDO, 1998; THEVELEIN, 1994; SCHNEPER *et al.*, 2004).

I.2.2. Fontes de nitrogênio

A maioria dos trabalhos realizados sobre o metabolismo do nitrogênio em microrganismos utiliza um meio mínimo com composição conhecida, e um único composto nitrogenado (LARGE, 1986). Outros estudos utilizam meios complexos complementados com diferentes tipos de extratos. Os meios de cultivo industriais apresentam composições complexas, e um exemplo típico é o mosto utilizado na produção de cerveja, que tem como fonte de nitrogênio uma mistura de aminoácidos, peptídeos e pequena quantidade de amônia livre e como fonte de carbono um mistura de carboidratos (PIERCE, 1987; STEWART & RUSSEL, 1998). O consumo de compostos nitrogenados mais complexos, como proteínas, por *Saccharomyces* só ocorre após sua hidrólise a aminoácido simples, dipeptídeos ou tripeptídeos (STEWART & RUSSEL, 1998).

Para selecionar a melhor opção de utilização de nutrientes frente a esta ampla diversidade de fontes de carbono e de nitrogênio, as leveduras desenvolveram mecanismos de sensoriamento, sinalização e regulação, que incluem processos de indução e repressão de vias metabólicas de utilização destes nutrientes (GANCEDO, 1998, THEVELEIN, 1994; SCHNEPER *et al.*, 2004). Como as fontes de carbono e de nitrogênio são os principais nutrientes presentes em mosto para produção de cerveja e vinícola, isto sugere que a interação mútua destes nutrientes pode ter efeitos importantes no metabolismo de leveduras (SCHNEPER *et al.*, 2004; PETER *et al.*, 2006).

O nitrogênio é um elemento essencial encontrado em quase todas as macromoléculas dos organismos vivos (COOPER, 1982). As leveduras podem utilizar uma ampla variedade de compostos nitrogenados como fontes de nitrogênio e entre estes estão o íon amônio, aminoácidos e peptídeos. Como no caso do carbono, um mecanismo conhecido como repressão catabólica induzida por nitrogênio impõe às leveduras a utilização diferencial de fontes de nitrogênio (HOFMAN-BANG 1999,

MAGASANIK, 1992). Foi observado que a amônia, asparagina, glutamina e glutamato são preferencialmente consumidos por leveduras. Estas são consideradas fontes primárias de nitrogênio, e propiciam crescimento igualmente eficiente ao microrganismo. Quando as fontes primárias estão limitadas ou próximas da exaustão, o organismo pode expressar seletivamente genes cujos produtos permitem a utilização de outras fontes de nitrogênio secundárias, incluindo ácidos nucleicos, aminoácidos, peptídeos (COOPER, 1982). A utilização de aminoácidos como fonte de nitrogênio envolve inicialmente seu transporte para o interior da célula, onde pode ser utilizado diretamente na síntese de proteínas que estejam sendo sintetizadas, quer pelo catabolismo, resultando em íons amônio (desaminação) ou glutamato (transaminação).

Um número considerável de permeases de aminoácidos já foi identificado geneticamente, e cada uma delas é específica para um aminoácido ou para alguns L-aminoácidos com semelhança estrutural (HORÁK, 1997). Além dos transportadores específicos, *Saccharomyces cerevisiae* possui uma permease geral de aminoácidos, “general amino acid permease” - Gap, codificada pelo gene *GAP1*, que transporta L e D- isômeros de aminoácidos básicos, neutros e ácidos (HORÁK, 1997). O *GAP1* já foi seqüenciado e a Gap1p apresenta alto grau de homologia seqüencial com outras permeases específicas (JANIAUX & GRENSON, 1990). Outros estudos sugerem a existência de uma nova permease geral de aminoácidos, codificada pelo gene *AGP1*, que juntamente com a permease geral de aminoácidos Gap 1, estaria envolvida na utilização de aminoácidos em *Sacchararomyces* (IRAQUI *et al.*, 1999).

Os peptídeos constituem outra fonte importante de nitrogênio para as leveduras. O transporte de peptídeos em *Saccharomyces cerevisiae*, como amônio e aminoácidos, é dependente de energia e mediado por proteínas específicas distintas daquelas envolvidas com o transporte de aminoácidos (HORÁK, 1997). O transporte de peptídeos deve envolver pelo menos três genes: *PTR1*, *PTR2* e *PTR3* (ISLAND *et al.*, 1991; ALAGRAMAM *et al.*, 1995). O gene *PTR2* foi sequenciado (BARNES *et al.*, 1998) e seu produto gênico, o Ptr2p, pertence a um grupo de proteínas transportadoras de peptídeos: a família Ptr (STEINER *et al.*, 1995). Alguns estudos sugerem a existência de uma permease geral de peptídeos (Gpp) em *Saccharomyces cerevisiae*, que transportaria dipeptídeos e tripeptídeos (e talvez oligopeptídeos), com preferência para resíduos hidrofóbicos e estereoespecífica para L-isômeros (HORÁK, 1997).

O transporte do íon amônio, assim como de aminoácidos e peptídeos, é um processo ativo secundário. Estudos com mutantes indicaram a existência de três

permeases para o íon amônio, codificada respectivamente, pelos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3*. A análise cinética do transporte de amônio utilizando análogo radioativo [^{14}C] –metilamônio mostrou que a proteína Mep 2 é a que apresenta maior afinidade por NH_4^+ (k_m 1 a 2 μM), seguida pela Mep 1 p (K_m 5 a 10 μM) e finalmente a Mep 3p que apresenta afinidade menor (K_m 1,4 a 2 μM) (MARINI *et al.*, 1997). O sequenciamento dos genes *MEP 1*, *MEP 2* e *MEP 3* revelou um alto grau de homologia entre eles e as proteínas codificadas apresentaram características topológicas semelhantes aquelas observadas para os transportadores de amônio em bactérias e fungos (MARINI *et al.*, 1997). Uma vez dentro da célula, a amônia pode reagir com α -cetogluturato e NADPH para formar glutamato ou com glutamato e ATP formando glutamina, que parece ser o destino final dos grupos amino utilizados nos processos biossintéticos. Estas reações são catalisadas pela NADH-glutamato desidrogenase (NADH-GDH) e glutamina sintetase (GS), respectivamente (MAGASANIK, 1992).

1.2.3 Transporte de açúcares e compostos nitrogenados

O primeiro passo da utilização de açúcar por leveduras é a sua passagem através da membrana plasmática (figura 2). Sacarose, glicose, frutose, galactose, maltose e maltotriose são alguns exemplos de açúcares que são utilizados por leveduras. A sacarose é preferencialmente hidrolisada pela enzima invertase e os produtos da hidrólise (glicose e frutose) entram na célula por transportadores específicos. Maltose e maltotriose são transportados por uma permease e uma vez dentro da célula, ambos os açúcares são hidrolizados a unidades de glicose pela enzima α -glicosidase. Os compostos nitrogenados também são transportados por permeases específicas e são utilizados em vários processos celulares, como por exemplo na síntese de proteínas e outros processos metabólicos.

O metabolismo dos carboidratos é importante para a conversão de glicose-6-fosfato ou frutose-6-fosfato em piruvato através da via glicolítica também conhecida como (Embden-Meyerhof-Parnas). A produção de piruvato a partir de glicose produz um total líquido de 2 moléculas de ATP por molécula de glicose e a redução de duas moléculas de NAD^+ , o que supre energeticamente a célula de levedura no metabolismo anaeróbico. O destino metabólico do piruvato é diferente, dependendo da espécie de levedura e condições de cultivo (FLORES *et al.*, 2000).

O metabolismo de compostos nitrogenados que ocorre pela disponibilidade e quantidade adequada de várias formas de nitrogênio assimilável no meio de fermentação foi descrita como importante para o desempenho fermentativo de leveduras, já que aumenta a produção de biomassa e de etanol, com a concomitante manutenção da viabilidade celular (CASEY *et al.*, 1984; THOMAS & INGLEDEW, 1990), e também um importante na definição do aroma de bebidas como a cerveja e o vinho (STEWART & RUSSELL, 1998).

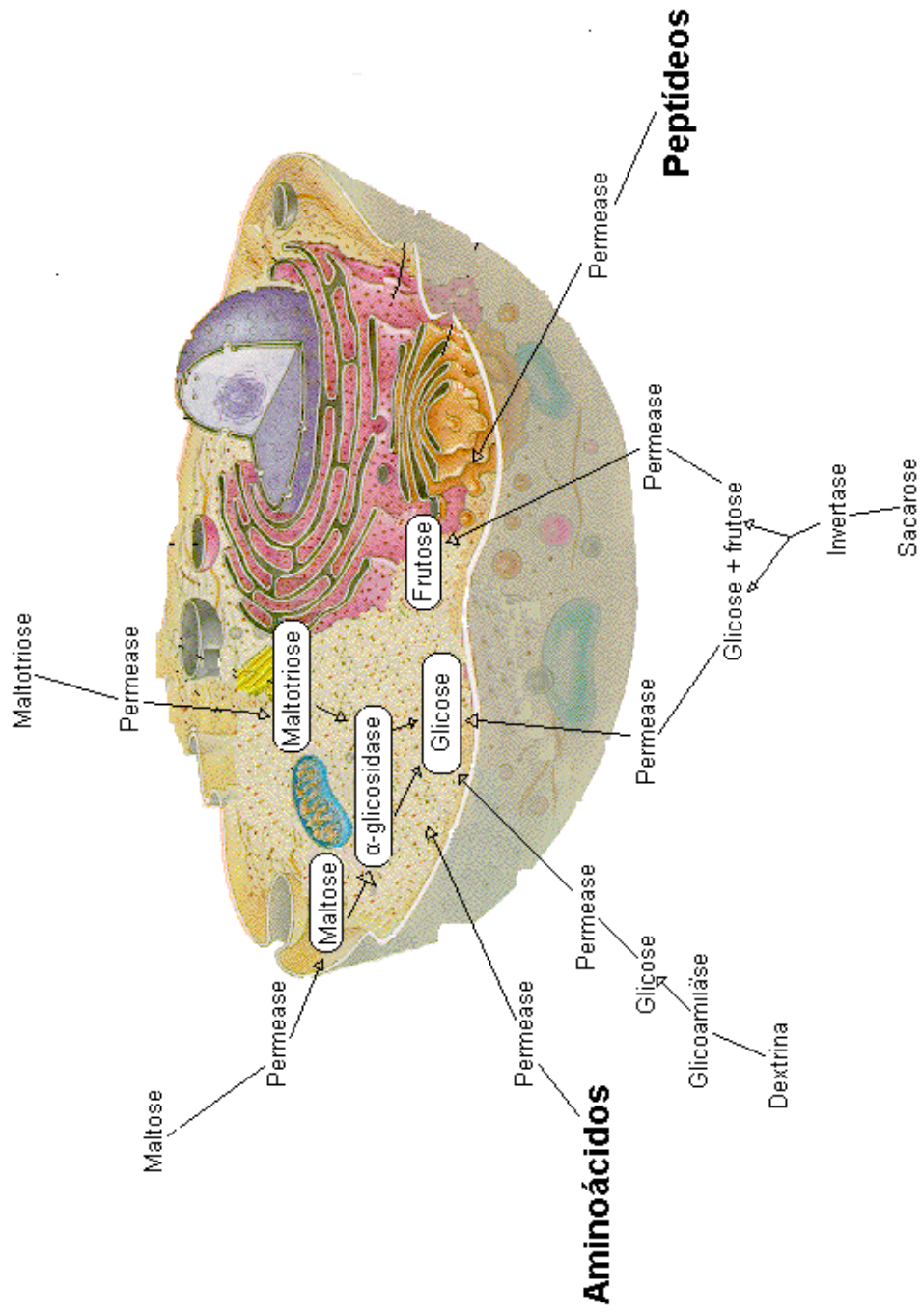


Figura 2 – Esquema modificado de assimilação de açúcar e compostos nitrogenados (reproduzido de STEWART & RUSSEL, 1998).
 Fonte: Organización de la célula eucariótica. Disponível em: < [http:// www.enfenix. webandario. com/biologia/célula/célula.html](http://www.enfenix.webandario.com/biologia/célula/célula.html)>.
 Acesso em: 27 de Julho 2006.

I.3. CARBOIDRATOS DE RESERVA

I.3.1. Glicogênio

I.3.1.1 – Descrição

Polímeros de glicose como amido (plantas) e glicogênio (microrganismos e animais superiores) são amplamente distribuídos na natureza, e são geralmente considerados como reservas intracelulares. A presença do glicogênio em organismos vivos, de bactéria ao homem, aponta a sua importância como fonte universal de energia. Os estudos mais completos e detalhados a respeito do metabolismo de glicogênio em microrganismos eucarióticos tem sido realizados utilizando leveduras como modelo.

O glicogênio é um polímero de glicose, as quais são unidos através de ligações glicosídicas α -1,4 formando cadeias cujo tamanho médio é de 11-14 resíduos. Os pontos de ramificação são resultados das ligações glicosídicas α -1,6 e, de modo geral, tais ramificações acontecem a cada 4 resíduos de glicose. Desse modo, a molécula de glicogênio é caracterizada pela sua massa (relativa ao número total de resíduos de glicose), sua estrutura ramificada confere a esta molécula uma característica altamente compacta o que permite às células acumular uma grande quantidade de glicose intracelular sem aumentar osmolaridade do citoplasma (ROACH *et al.*, 2001).

I.3.1.2 – Funções

No geral, tanto em microrganismos quanto em mamíferos, o glicogênio tem sido considerado uma reserva de glicose, sintetizado em períodos de excesso de nutrientes e degradado posteriormente, em tempos de necessidade, quando as células enfrentam escassez de tais nutrientes (DEVLIN, 1992).

O glicogênio é o principal polissacarídeo de armazenamento de células animais, presente e abundante especialmente no fígado. O glicogênio hepático funciona como reserva de glicose, sendo o responsável pela manutenção da concentração de glicose no sangue. O glicogênio também está presente no músculo esquelético, onde é utilizado, quando necessário, para a produção de energia em uma intensa atividade muscular.

Microrganismos, tais como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* também acumulam glicogênio, este polímero se acumula em condições nas quais o crescimento é restrito, como, por exemplo, durante a fase de transição entre as fases exponencial e a fase estacionária do crescimento em presença de glicose (FRANÇOIS *et al.*, 1987). Em, *N crassa*, o glicogênio se acumula durante a fase exponencial do crescimento e é rapidamente consumido quando a cultura inicia a fase estacionária (FONTANA *et al.*, 1999). Além disso, microrganismos também acumulam glicogênio quando expostos a situações de estresse, tais como choque térmico (PARROU & FRANÇOIS, 1997).

I.3.1.3 – Metabolismo

A glicose é o nutriente preferencial para muitos organismos, sendo sua captura e utilização fortemente reguladas. A glicose livre entra nas células através de transportadores de glicose específicos. Em células hepáticas, os transportadores GLUT-2 possuem alto Km por glicose, o que basicamente permite que tais moléculas entrem livremente nas células quando a concentração de glicose sanguínea for alta. Por outro lado, células musculares expressam transportadores GLUT-4, os quais possuem baixo Km e, portanto limitam a entrada de glicose nestas células (OLSON & PESSIN, 1996).

Em uma visão geral, a glicose uma vez dentro da célula, pode ser convertida a glicose-6-fosfato, uma importante molécula reguladora. A glicose-6-fosfato, por sua vez pode entrar na via glicolítica para fornecer energia através da fermentação e subsequente oxidação, ou pode seguir a via das pentoses-fosfato para fornecer equivalentes redutores, ou ainda, após transformação em UDP-glicose, pode ser convertida a glicogênio, polímero de reserva de unidades de glicose. Assim, quando necessário o carboidrato de reserva glicogênio pode ser degradado para fornecer energia.

I.3.2. Trealose

I.3.2.1 - Descrição

Trealose (1- α -D- glicopiranosil, α -D-glicopiranosídeo) é um dissacarídeo não redutor constituído por dois resíduos de D-glicose, unidos por ligação α -1,1. Este

dissacarídeo tem ampla distribuição na natureza, é encontrado em organismos como bactérias, fungos, algas, plantas e invertebrados como insetos onde a trealose constitui o principal açúcar da hemolinfa (PANEK, 1995), e nematóides (ELBEIN, 1974). Não foram encontrados níveis significativos de trealose em vertebrados, no entanto a presença da enzima trealase, que hidrolisa a trealose em duas moléculas de glicose, presente nos túbulos proximais renais e nas microvilosidades intestinais de mamíferos relatam a função desta enzima na quebra da trealose ingerida. Tal fato poderia contribuir como indicação de doença renal quando a enzima é encontrada na urina (NIWA *et al.*, 1993).

Em fungos, a trealose também é amplamente distribuída, e pode ser encontrada em esporos e conídeos (ELBEIN, 1974). Em *N. crassa*, os ascósporos (SUSSMAN, 1961) e conidiósporo (HANKS & SUSSMAN, 1969) contém 10% a 14%, respectivamente de seu peso seco em trealose. Nos ascósporos de *Saccharomyces cerevisiae*, é o único açúcar presente no citoplasma (THEVELEIN, 1984). Algumas espécies de nematóides e leveduras de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) são capazes de sobreviver à completa dessecação, resistindo a longos períodos de aparente dormência, retornando plena atividade quando a água torna-se disponível no meio (CROWE *et al.*, 1992).

I.3.2.2 – Funções

A trealose é o dissacarídeo mais amplamente distribuído em fungos. É muito comum em ambos os estágios vegetativo e reprodutivo. Na estrutura vegetativa é encontrado juntamente com o glicogênio. Isto também é atribuída para as estruturas reprodutivas, mas neste caso a trealose esta presente em maiores quantidades do que o outro carboidrato de reserva.

O acúmulo de trealose em fungos parece estar, em geral, associado com períodos de taxa de crescimento reduzida. A síntese de trealose, é particularmente, muito intensa durante o processo de diferenciação celular e períodos de jejum, em *Saccharomyces cerevisiae* (THEVELEIN, 1984) e durante a conidiação de *N. crassa* (HANKS & SUSSMAN, 1969). Contrário ao glicogênio, a trealose é sintetizada na ausência de glicose. O acúmulo de trealose ocorre no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento quando quase toda a glicose foi consumida do meio (FRANCOIS *et al.*, 1987).

Também tem sido explorado em diversas aplicações biotecnológicas como: aumento da tolerância ao etanol em leveduras utilizadas em processos de fermentação alcoólica (D'AMORE *et al.*, 1991), crioproteção, mantendo viáveis culturas de células de *Daricus carota* (cenoura) e *Nicotina tabacum* (tabaco) após congelamento (BHANDAL *et al.*, 1985), conservação de enzimas de restrição (COLAÇO *et al.*, 1992), lipossomos liofilizados (RUDOLPH *et al.*, 1993). Um dos mais fascinantes aspectos da presença da trealose em vários organismos é sua participação na proteção contra condições adversas, como estresse térmico (HOTTINGER *et al.*, 1987; DE VIRGILIO *et al.*, 1990), estresse osmótico (CSONKA, 1989) e dessecação (GADD *et al.*, 1987).

I.3.2.3 – Metabolismo

A síntese de trealose em fungos é intensificada durante processos de esporulação e diferenciação celular e também durante períodos de baixo crescimento, como período de jejum (THEVELEIN, 1984). Em levedura, a carência de nitrogênio, enxofre, fostato e fonte de carbono, induzem ao acúmulo de trealose. O aumento dos níveis deste dissacarídeo começa ao final da fase exponencial e contínua durante muitas horas em células na fase estacionária (LILLIE & PRINGLE, 1980).

Em geral, o crescimento reduzido está associado com o acúmulo de trealose, e a indução do crescimento com uma rápida mobilização da mesma. A queda dos estoques de trealose é normalmente um dos principais eventos bioquímicos durante início da germinação em esporos de fungos (THEVELEIN, 1984).

Quando o crescimento é induzido em culturas de fase estacionária de *S cerevisiae*, a trealose previamente acumulada é rapidamente mobilizada (PANEK, 1962). Desta forma durante o ciclo celular, a trealose seria uma reserva energética acumulada durante a fase de maturação e mobilizada antes da divisão celular. O acúmulo de trealose em fungos está somente restrito a período de diferenciação celular, e não de proliferação. Células de leveduras crescidas em maltose ou galactose (PANEK & MATTON, 1977), e germinadas em glicose e expostas a altas temperaturas (GRBA *et al.*, 1979), também acumulam um alto teor de trealose.

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar o efeito da complexidade estrutural de fontes de nitrogênio no fluxo metabólico do carbono em leveduras, observando como as possíveis interações mútuas entre as fontes de carbono e nitrogênio interferem com o fluxo metabólico destes nutrientes. Especificamente, os principais objetivos foram:

1 - Identificar as etapas ou estados fisiológicos importantes que determinam o desempenho fermentativo de leveduras industriais em meios de cultivo suplementado com fontes de nitrogênio com diferentes graus de complexidade estrutural. Para isto foram utilizadas leveduras empregadas nas indústrias de panificação e na produção de cerveja e vinho.

2 - Estudo do efeito da utilização de diferentes frações peptídicas isoladas da peptona no desempenho fermentativo das leveduras industriais.

3 - Determinar os níveis dos carboidratos de reserva glicogênio e trealose em diferentes condições de cultivo em leveduras de panificação e cervejaria.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química - UNESP de Araraquara.

III.1. MICROGANISMOS UTILIZADOS

Os microrganismos utilizados nesse estudo são cinco diferentes linhagens de leveduras industriais:

Fiso, *Saccharomyces cerevisiae*, levedura da 'Fleischmann e Royal Produtos Alimentícios Ltda';

A3, *Saccharomyces cerevisiae*, tipo 'Ale'; e **L52**, *Saccharomyces cerevisiae - uvarum (carlsbergensis)*, tipo 'Lager', ambas de cervejaria, cedidas pela Labatt Brewery of Canada.

VIN7 e **VIN13**, *Saccharomyces cerevisiae*, ambas de vinícola, cedidas pelo Dr. I. Pretorius, do The Australian Wine Research Institute, Austrália.

Humicola grisea, fungo termófilico do solo brasileiro, *Humicola grisea* variedade thermoidea, gentilmente cedido pelo Dr. João Atílio Jorge, Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto.

III.2. MEIOS DE CULTIVO

As células de levedura foram mantidas em meio YPD contendo 1,0% (p/v) de extrato de levedo; 1,0% (p/v) de peptona; 2,0% de glicose; 2,0 % (p/v) de ágar e água destilada.

O meio básico de cultivo foi preparado; duas vezes concentrado, contendo YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. A fonte de carbono foi preparada separadamente, também duas vezes concentrada. Ambas as soluções tiveram o pH ajustado para 5,0 e foram esterilizados em autoclave por 20 min a 120°C e 1 atm.

Para a obtenção do meio de cultura completo, foram adicionadas assepticamente quantidades adequadas de meio mínimo e da solução de açúcar, a fim de se obter as concentrações finais desejadas de cultivo: 0,17% (p/v) de YNB, 1% (p/v) da fonte de nitrogênio e diferentes concentrações de açúcar (2% e 15%). Neste trabalho o meio básico de cultivo contendo 0,17% (p/v) de YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônio e 1% (p/v) da fonte de nitrogênio foi denominado de YNB.

As fontes de nitrogênio utilizadas são preparações comerciais de hidrolisados enzimáticos de proteínas (Peptona – com predominância de aminoácidos na forma de peptídeos), e hidrolisados ácidos de proteínas (Casaminoácidos – com predominância de aminoácidos na forma livre) e sulfato de amônio (NH₄SO₄).

III.3. MANUTENÇÃO DA CULTURA E PREPARO DO INÓCULO

As culturas estoques das leveduras foram mantidas em meio YPD Agar. Após o período de incubação por 48 horas a 30°C, as culturas foram armazenadas a 4°C, sendo utilizadas no máximo após 7 dias.

O inóculo utilizado foi uma suspensão de células recém crescidas, coletadas da superfície da cultura estoque com alça de platina e transferida para tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada.

III.4. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS

O crescimento celular foi realizado em Erlenmeyer de 125 mL, com volume de meio de 25mL, 5 vezes menor que o volume do Erlenmeyer. Após a inoculação de 0,025 mg de células/mL de meio, os frascos foram incubados a 30°C, sob agitação, a 250 rpm, em mesa agitadora New Brunswick Scientific Co.

III.4.1. Obtenção da suspensão de células

Os parâmetros fermentativos foram obtidos através da determinação da produção de biomassa, utilização de açúcar, produção e consumo de etanol, viabilidade celular e pH. Para isto, periodicamente, foram coletadas 0,3 mL de amostra do meio de cultura para a determinação de biomassa, análise da viabilidade celular e pH. Outra alíquota de 0,5 mL foi retirada e centrifugada sendo que o sobrenadante foi estocado a - 5°C para posteriores análises da utilização da fonte de carbono, nitrogênio e produção de etanol. A biosíntese de trealose e glicogênio, em diferentes condições de cultivo, também foram estudadas (ver item III. 8).

III.6. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

III.6.1. Determinação do crescimento celular

As análises do crescimento celular foram realizadas periodicamente através de medidas turbidimétricas a 570 nm, de uma suspensão de células com diluição conhecida, relacionando-a com a massa celular, através da seguinte equação:

$$[\text{células}] (\text{mg/mL}) = \Delta A_{570} \times \text{diluição} \times f.$$

onde f , fator de conversão de absorbância em massa seca, para a levedura *S. cerevisiae* é 0,6711. O fator f foi determinado a partir da medida de absorbância de suspensões com diferentes concentrações de células comparada com a massa seca obtida, colocadas em estufa a 100°C de 1,0 mL de cada suspensão filtrada em membrana Millipore por duas horas

III.6.2. Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi periodicamente acompanhada através do método de coloração com azul de metileno (LEE *et al.*, 1981).

Na determinação da viabilidade celular, 10 μL de amostra foram transferidos para 90 μL da solução padrão de azul de metileno (0,025g de azul de metileno; 0,9 g NaCl; 0,042g KCl; 0,048g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,02g NaHCO_3 para 100 mL de solução aquosa) e agitados. Após 10 minutos, tempo necessário para que as células absorvam o corante, procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentam-se incolores, enquanto as não viáveis coloridas.

III.6.3. Determinação do açúcar residual

A utilização de nutrientes (fonte de carbono) foi determinado através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959).

As análises dos monossacarídeos foram realizadas pelo método DNS, que baseia-se no poder redutor de açúcares, originando um composto colorido, 3-amino 5-

nitro salicílico. (ácido 3,5-dinitrosalicílico – 1g; tartarato de sódio e potássio – 30g, NaOH 1M – 40 mL , e o volume completado a 100mL).

Para a dosagem do açúcar, as amostras obtidas foram adequadamente diluídas e a 0,5 mL da amostra adicionou-se 2,0 mL do reagente DNS nos respectivos tubos de ensaio. O tubo contendo o branco foi preparado adicionando-se 0,5 mL de água no lugar da amostra. Os tubos foram transferidos para banho de água a 100°C por 5 minutos. Em seguida foram transferidos para um banho de gelo para resfriamento. As leituras de absorbância foram realizadas a 546nm. Foi utilizada solução de glicose como padrão.

III. 6.4. Determinação de etanol

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa, no cromatógrafo CG, modelo 37-022, acoplado a um integrador – processador CG-300, utilizando-se coluna cromatográfica CG nº PAD/2499, operada isotermicamente á 90°C. A temperatura do detector de ionização de chama e do vaporizador foi de 135°C. Utilizou-se o nitrogênio como gás de arraste, com vazão de 30mL/mim. A vazão do hidrogênio foi de 30mL/min e do ar sintético de 300mL/min. O etanol foi utilizado como padrão externo e a curva de calibração foi obtida com soluções de etanol 0,5 e 1% (v/v).

III. 7. PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS A PARTIR DE PEPTONA

Para a separação das frações peptídicas a partir da peptona foi utilizada uma coluna cromatográfica clássica com resina Sephadex G-25, acoplado a uma bomba de vácuo e um coletor de frações. Foi aplicada uma solução de peptona contendo 0,5 g/mL, e a coluna foi eluída com uma solução de acetato de amônio, pH 3,0. Foram selecionadas duas frações: uma designada fração 4-8, resultante do material eluído nos tubos de 4 a 8, contendo somente peptídeos; e outra designada fração 9-14, resultante do material eluído nos tubos de 9 a 14, contendo uma fração de peptídeos menores e aminoácidos livres. A presença de peptídeos e de aminoácidos nas frações selecionadas foi verificada através de HPLC e análise no equipamento de analisador de aminoácidos.

III.8. PRODUÇÃO DE TREALASE SEMI-PURIFICADA, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLICOGÊNIO E TREALOSE

III. 8.1. Manutenção do fungo

O fungo termófilo *Humicola grisea*, variedade thermoidea foi inoculado em meio sólido de farinha de aveia composto por 4 % (p/v) de aveia e 1,8% (p/v) Agar. Incubado a temperatura de 40^oC por 10 dias. Após o período de incubação as culturas foram transferidas para câmara fria, a 4^oC por 5 dias, pois este tratamento aumenta a atividade específica da trealase.

III. 8.2. Produção de trealase semipurificada

A trealase semipurificada utilizada na dosagem de trealose foi obtida segundo método descrito por Neves *et al* (1994).

Na obtenção dos conídios os frascos de cultura foram ressuspensos em água destilada (10,0 mL de água por frasco), através da raspagem da superfície do meio com o auxílio de um bastão de vidro. Para a extração da enzima a suspensão conidial foi colocada em banho de gelo por 30 minutos, sob agitação, e a seguir foi aquecida a 60^oC por 30 minutos. O aquecimento promove a desnaturação de outras hidrolases, sem afetar a atividade trealásica. A suspensão foi então filtrada e dialisada. E a preparação da enzima (2.0mg/mL) foi então utilizada nos ensaios de quantificação da trealose.

III.8.3. Extração e quantificação simultânea de Trealose e Glicogênio

Para a determinação simultânea de trealose e glicogênio 1,5 mL da cultura foram coletados e lavados por 3 vezes com solução salina (0,85%). Para a extração da trealose as células foram ressuspensas em 400 µL de Na₂CO₃ 0,25mM e a suspensão incubada por 20 minutos em banho fervente. A seguir, as amostras foram centrifugadas e a uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi adicionada 100 µL de ácido acético 1M e 100 µL de tampão acetato de sódio 300mM, contendo 15 mM de CaCl₂ em pH 5,5. Iniciou-se a reação enzimática com 100 µL da enzima trealase. A mistura da reação foi incubada por uma hora a 40^oC, e foi interrompida em banho

fervente por 10 minutos. A glicose proveniente da hidrólise da trealose foi dosada por um kit comercial (Labtest, Brasil) contendo o sistema enzimático Glicose oxidase/Peroxidase. A quantidade de trealose foi expressa em nmoles de glicose/mg de células-massa seca.

O material remanescente da análise da trealose foi mantido em banho de água fervente por mais duas horas para a extração do glicogênio. Uma alíquota de 100 μ L da suspensão destinada á determinação do glicogênio, foi neutralizada com 100 μ L de tampão acetato de sódio 0,3 mM contendo 30mM de cloreto de cálcio em pH 5,5. A reação enzimática foi iniciada com a adição de 20 μ L da enzima (amiloglicosidase 3,0 mg/mL, Sigma). As amostras foram incubadas durante três horas a 37⁰C e a reação interrompida em banho fervente por 10 minutos. A preparação foi centrifugada e a glicose produzida, presente no sobrenandante foi dosada pelo sistema enzimático glicose oxidase/peroxidase. A quantidade de glicogênio foi expressa em μ gramas de glicogênio/mg de células-massa seca.

III. 9. REPRODUTIBILIDADE

Os dados apresentados nesta tese representam a média de pelo menos três experimentos repetidos de forma idêntica.

Resultados

Neste trabalho estudou-se o efeito da complexidade estrutural das fontes de nitrogênio no metabolismo das linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. As fontes de nitrogênio utilizadas foram: peptona (hidrolisado enzimático de proteína, com predominância de aminoácidos na forma de peptídeos), casaminoácidos (hidrolisado ácido de caseína, com predominância de aminoácidos livres) e sulfato de amônio. A composição da tabela de aminoácidos livres presentes em casaminoácidos e peptona antes e após hidrólise ácida está em anexos. Estas fontes nitrogenadas foram escolhidas por serem comumente empregadas como constituintes de meios de cultura e por apresentarem diferentes graus de complexidade estrutural devendo interferir diferentemente no metabolismo das leveduras quanto à assimilação e utilização como fonte de nitrogênio, e também na mutua interação que deve ocorrer com a fonte de carbono. Glicose, galactose e maltose foram utilizadas como fonte de carbono. Além das fontes de carbono e nitrogênio, os meios utilizados neste trabalho, continham vitaminas, sais e elementos traços obtidos da Base Nitrogenada YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônio. Nestas condições foram realizados estudos com diferentes cepas de leveduras industriais, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Fiso (panificação), A3 e L52 (cervejaria), VIN7 e VIN13 (vinícola).

Os resultados apresentados sobre o efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no metabolismo das leveduras industriais estão organizados nos seguintes itens:

IV. 1. Estudos realizados com diferentes fontes de carbono e de nitrogênio;

IV. 2. A influência do aumento da concentração da fonte de nitrogênio;

IV. 3. A utilização de frações peptídicas isoladas de peptona como fonte de nitrogênio;

IV. 4. O efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no acúmulo de carboidratos de reserva trealose e glicogênio em leveduras industriais.

IV.1. ESTUDOS REALIZADOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO

Nos resultados descritos neste item os meios de cultura continham as concentrações dos açúcares glicose, galactose e maltose 2% e 15% (p/v) e a concentração de fonte de nitrogênio de 1% (p/v).

IV.1.1. Estudos com diferentes concentrações de glicose

No estudo do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio sobre o metabolismo de leveduras industriais A3, L52, VIN7 e VIN13, os meios de cultivo contendo glicose foram complementados com uma fonte de nitrogênio na forma de hidrolisado enzimático (peptona), hidrolisado ácido de proteína (casaminoácidos) ou sulfato de amônio. As figuras de 3 a 10 apresentam acúmulo de biomassa, utilização de açúcar, produção e consumo de etanol e viabilidade celular das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo glicose 2% (p/v) (Figuras de 3 a 6) e 15% (p/v) (Figuras de 7 a 10), complementados com diferentes fonte de nitrogênio na concentração de 1% (p/v).

A análise do perfil do crescimento das linhagens em glicose 2% (p/v) indica a ocorrência de diauxia: inicialmente a levedura utiliza glicose para crescer e produzir etanol, e após a exaustão da glicose, o etanol é utilizado como fonte de carbono. A produção de biomassa pelas linhagens é aproximadamente igual nos meios complementados com peptona e casaminoácidos, mas a velocidade de crescimento e o acúmulo final de biomassa são diferentes. As linhagens A3 e VIN13 crescem mais rápido e acumulam mais biomassa que as linhagens L52 e VIN7. A linhagem VIN7 comporta-se diferentemente, produzindo mais biomassa no meio complementado com casaminoácido. A tabela 1 (página 83), mostra um resumo dos parâmetros obtidos para as diferentes linhagens após 20 e 60 horas de crescimento em glicose 2% (p/v).

Em concentração mais alta de glicose (15%) observa-se que, no geral, o melhor desempenho fermentativo para as linhagens acontece no meio complementado com peptona, com maior produção de biomassa e etanol, consumo de açúcar eficiente e com a manutenção da viabilidade celular (Figuras 7-10). O desempenho no meio complementado com sulfato de amônio foi sempre inferior. O comportamento das linhagens assemelha-se aos descritos para a linhagem Fiso (CRUZ *et al.*, 2002), exceto pelo fato das linhagens A3 e VIN13 de produzirem quantidades de etanol

aproximadamente iguais nos meios com peptona e casaminoácidos. A tabela 1 também mostra um resumo dos parâmetros obtidos para as diferentes linhagens após 20 e 60 horas de crescimento em glicose 15% (p/v).

A variação de pH durante o crescimento das linhagens também foi constantemente monitorado. Os meios com peptona e casaminoácidos apresentaram queda de 5,0 pH inicial, para valores próximo a 3,0 ao final do experimento. O meio contendo sulfato de amônio é o que apresentou maior variação de pH, atingindo o valor de 2 ao final da curva de crescimento. Estudos com cultivos controlados de pH mostraram que os parâmetros fermentativos não sofreram alteração significativa daqueles sem controle de pH.

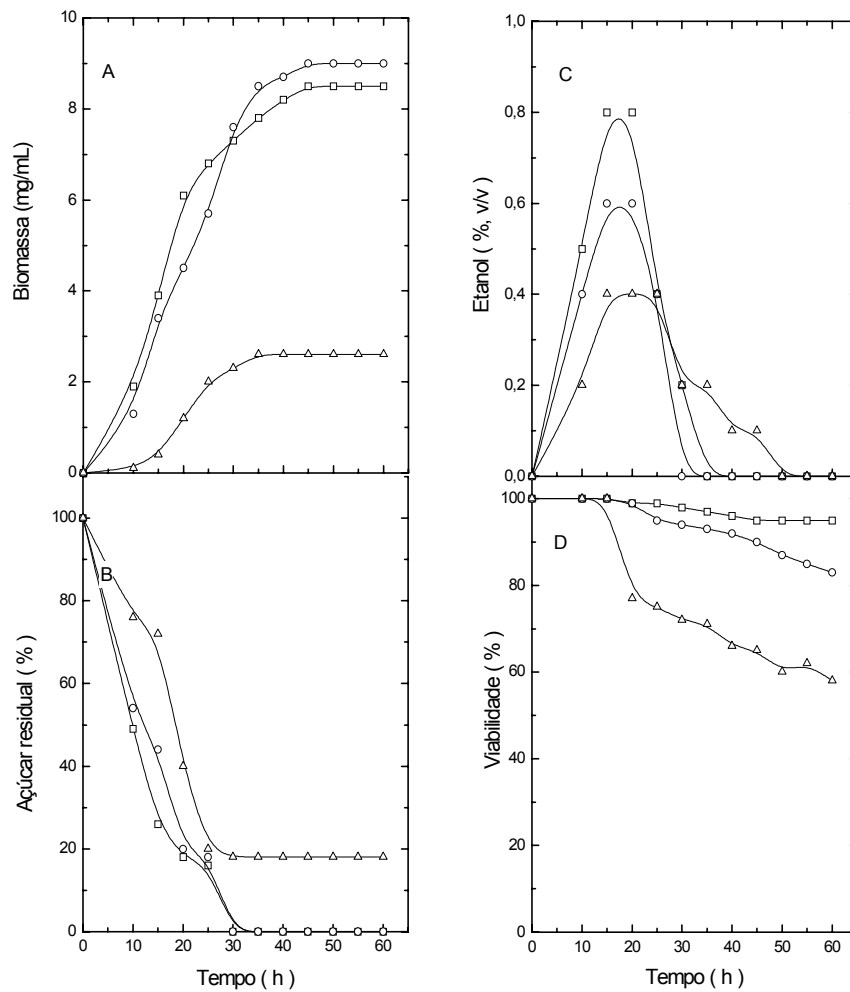


Figura 3. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C) e viabilidade celular (D). Linhagem (A3), crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 2% (p/v) de glicose. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0

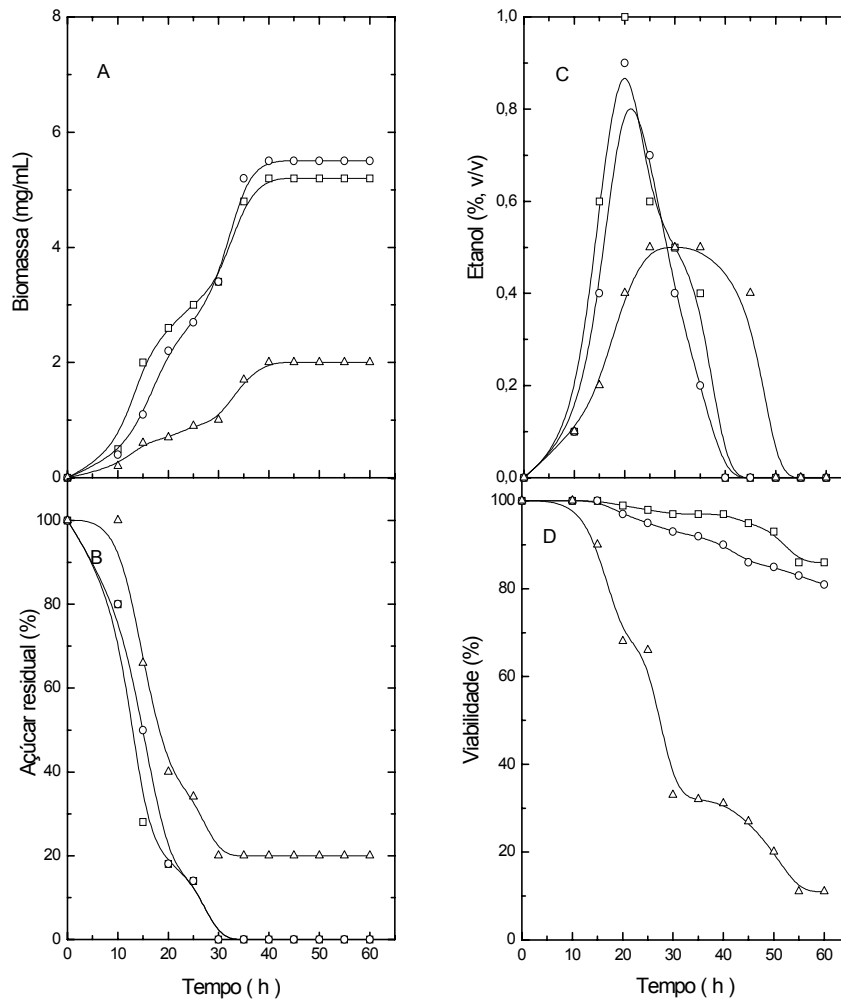


Figura 4. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C) e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 2% (p/v) de **glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0

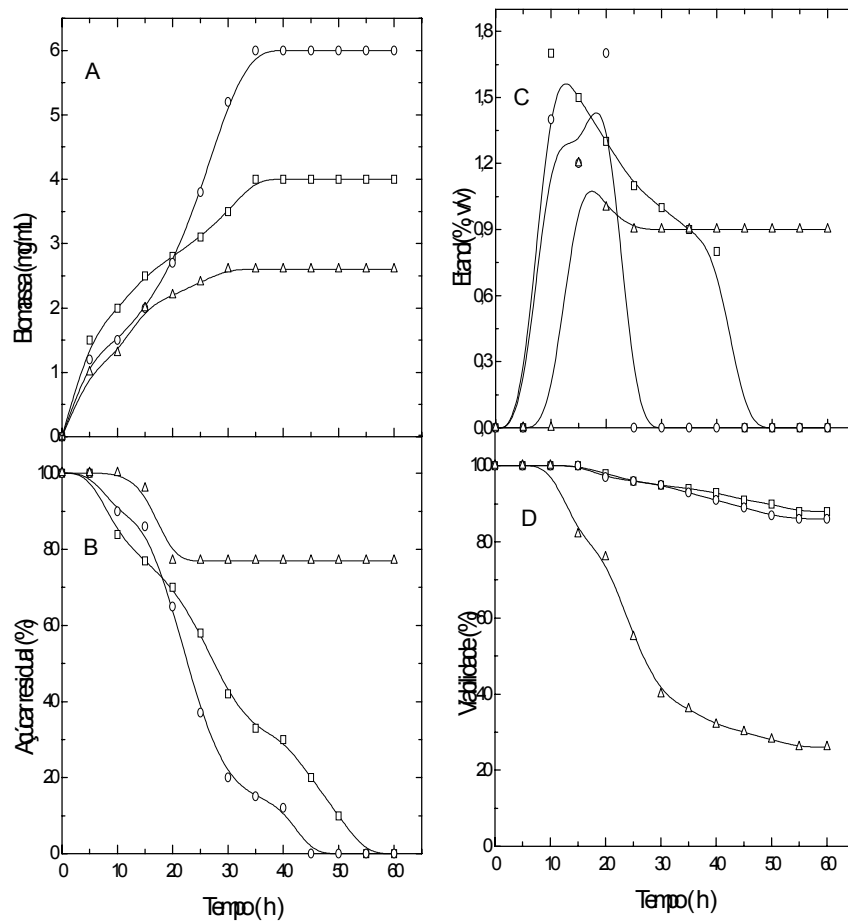


Figura 5. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **VIN7**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 2% (p/v) de **glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

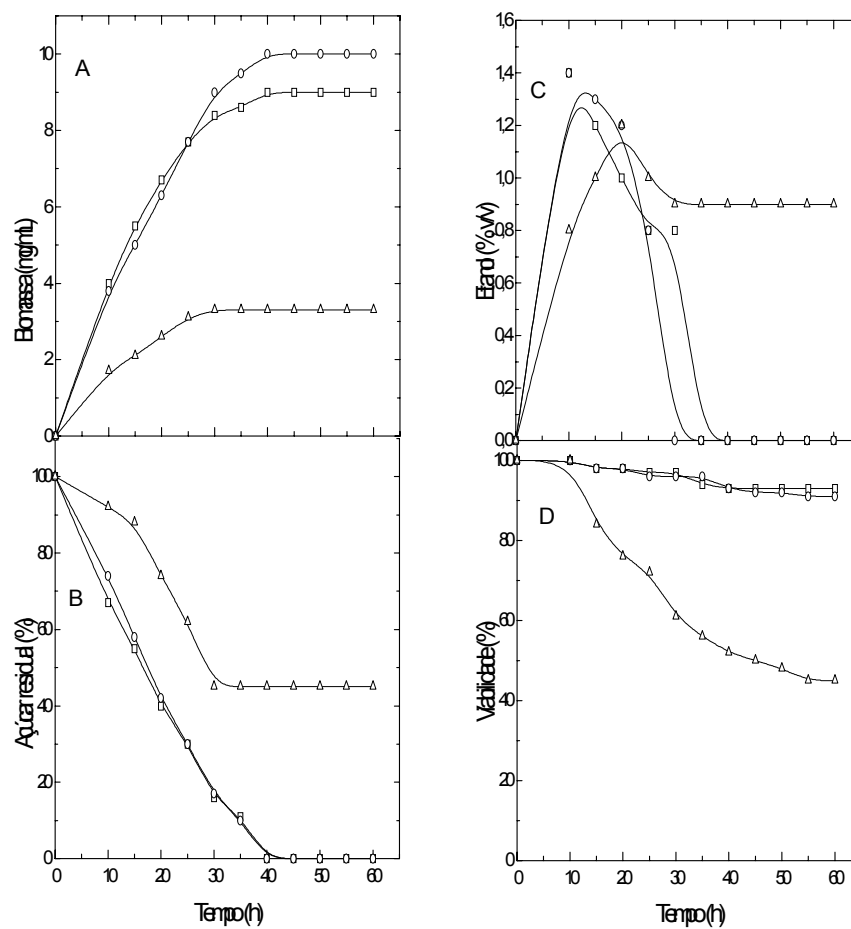


Figura 6. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **VIN13**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 2% (p/v) de **glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

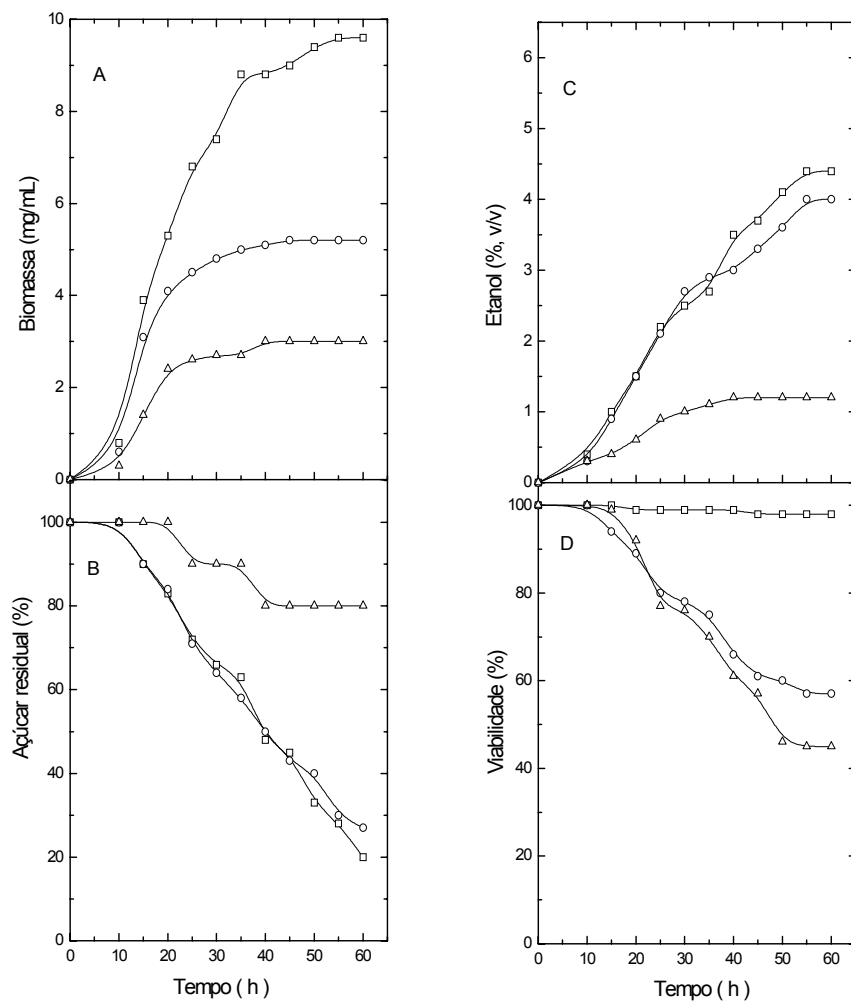


Figura 7. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem (**A3**), crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 15% (p/v) de **glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

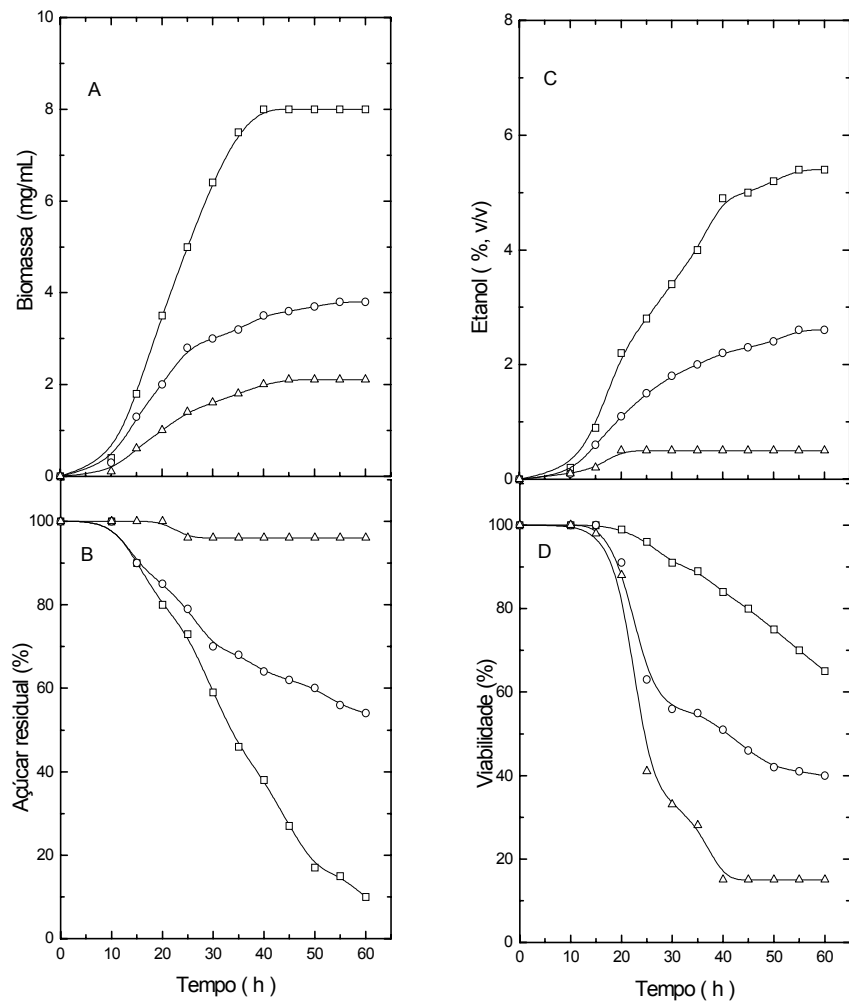


Figura 8. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

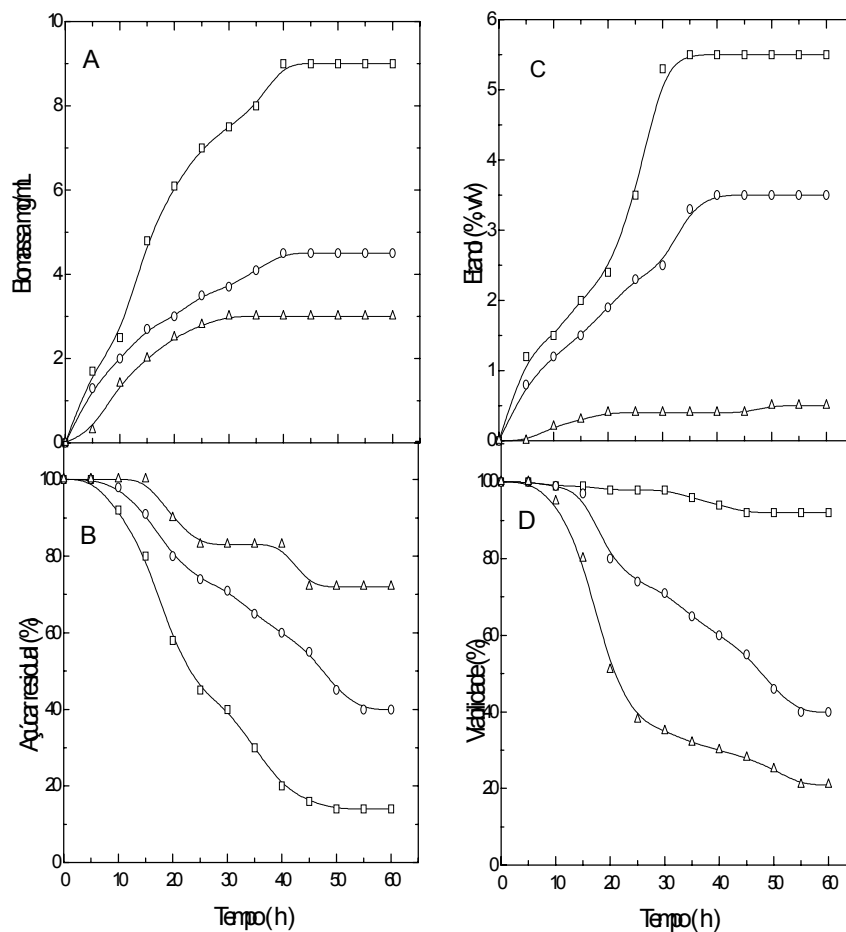


Figura 9. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **VIN7**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 15% (p/v) de glicose. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

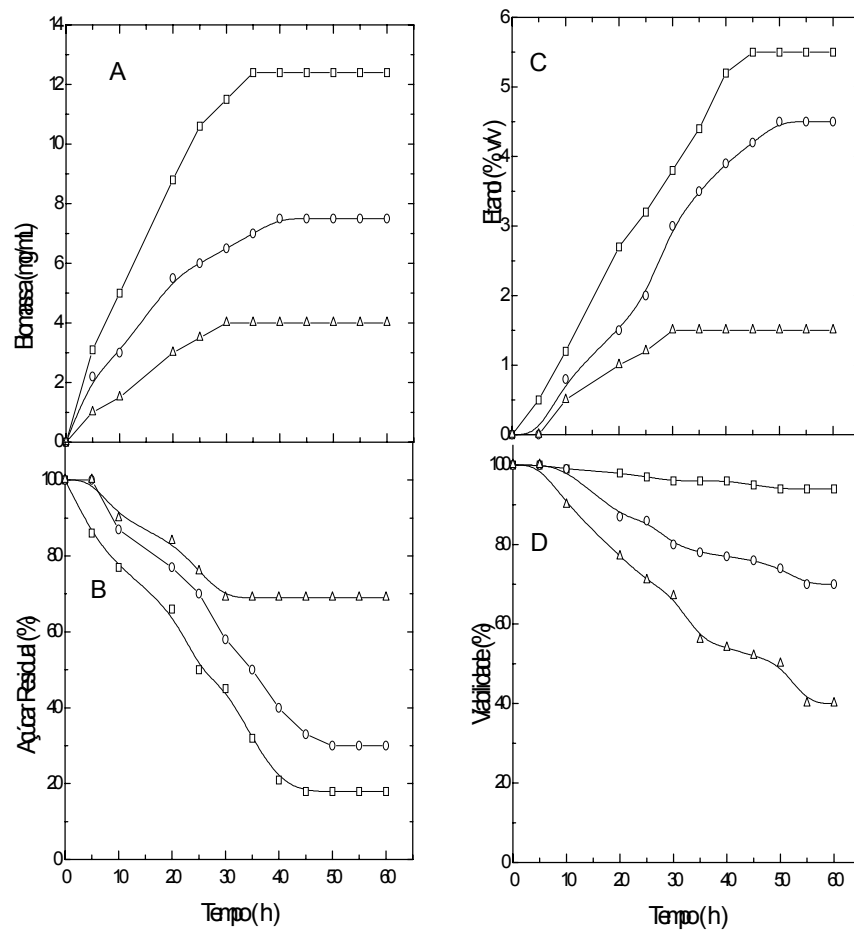


Figura 10. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **VIN13**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 15% (p/v) de **glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5.

IV.1.2. Estudos com diferentes concentrações de galactose

A influência da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no metabolismo das linhagens A3 e L52 em diferentes concentrações de galactose, um açúcar considerado “não repressor”, está apresentado nas Figuras 11 e 12 (2%) e 13 e 14 (15%), que mostram o acúmulo de biomassa, a utilização de açúcar, a produção de etanol e viabilidade celular.

A análise do perfil do crescimento, consumo de açúcar, produção e consumo de etanol das duas linhagens que indica, em galactose 2% (p/v), como no caso da glicose, a ocorrência de diauxia. Inicialmente, a levedura utiliza galactose para crescer e produzir etanol, e após a exaustão da galactose, o etanol é utilizado como fonte de carbono. A produção de biomassa pela linhagem A3 é semelhante nos meios complementados com peptona e casaminoácidos. Para a linhagem L52 observa-se que o acúmulo de biomassa é pouco superior no meio contendo casaminoácidos. A produção de biomassa e o consumo de açúcares são sempre inferiores no meio complementado com sulfato de amônio para as duas linhagens.

O fenômeno de repressão catabólica é sempre associado à glicose. A observação do perfil diáuxico no meio com galactose mostra, inequivocadamente, que a repressão catabólica também ocorre na presença de galactose, como já descrito por Gancedo (1998).

Na concentração de galactose 15% (p/v) é que as diferenças entre as duas linhagens se acentuam. A Figura 13 mostra que a linhagem A3 apresenta crescimento considerável nos meios complementados com peptona e casaminoácidos, entretanto a análise dos perfis de consumo de galactose e produção de etanol indica que a linhagem A3 só é capaz de utilizar eficientemente a galactose e de produzir etanol no meio complementado com casaminoácidos. Para a linhagem L52 a peptona é o melhor complemento nitrogenado.

Os estudos com galactose foram iniciados em outro estudo do nosso laboratório.(CRUZ *et al*, 2001). A linhagem Fiso também tem melhor desempenho fermentativo no meio com casaminoácidos, e um consumo de açúcar e a produção de etanol, mais limitados, no meio com peptona.

No meio com sulfato de amônio, para todas as linhagens, se observa baixa produção de biomassa, o consumo de galactose é mínimo, comprometendo a produção

de etanol. Os resultados obtidos com galactose já foram publicados e estão na referência (CRUZ *et al.*, 2003).

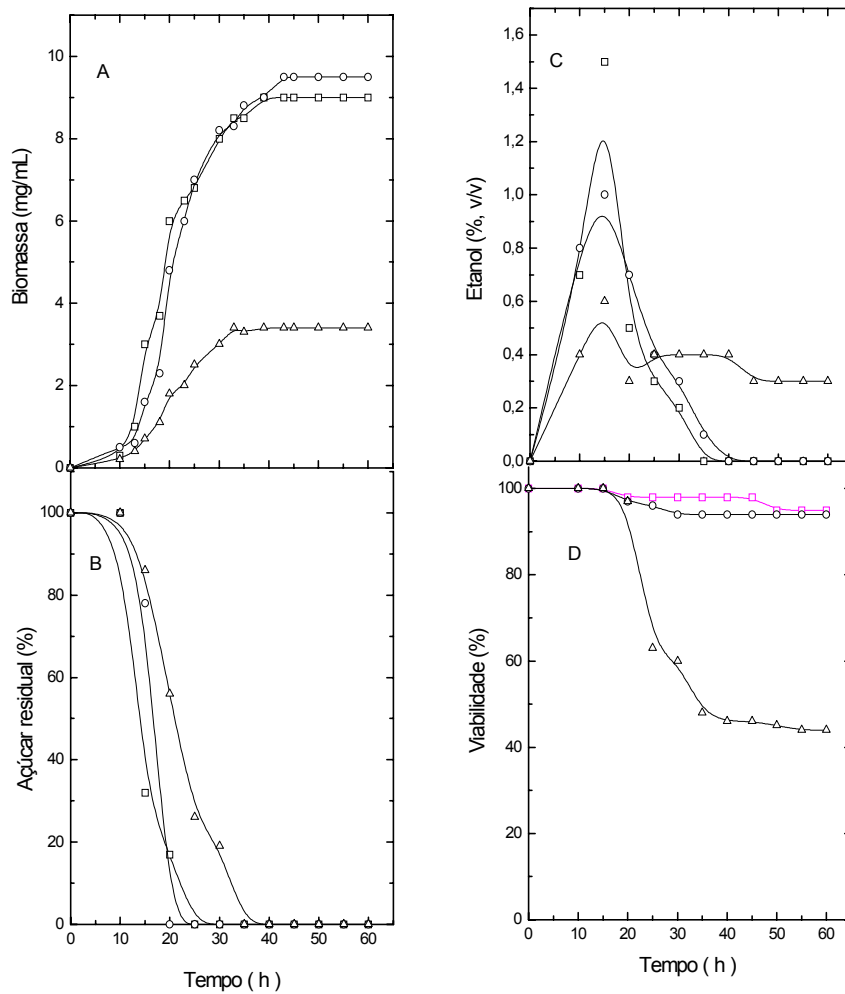


Figura 11. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **A3**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 2% (p/v) de galactose. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

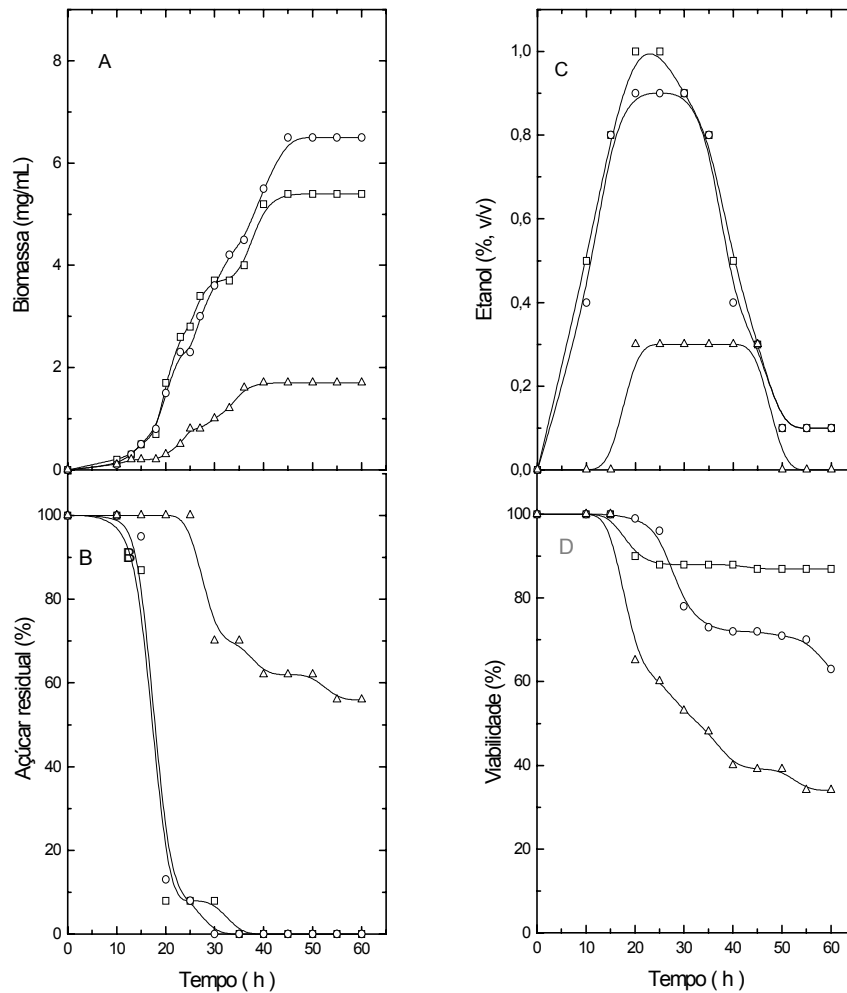


FIGURA 12. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C) e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona(□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) **2% (p/v) de galactose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

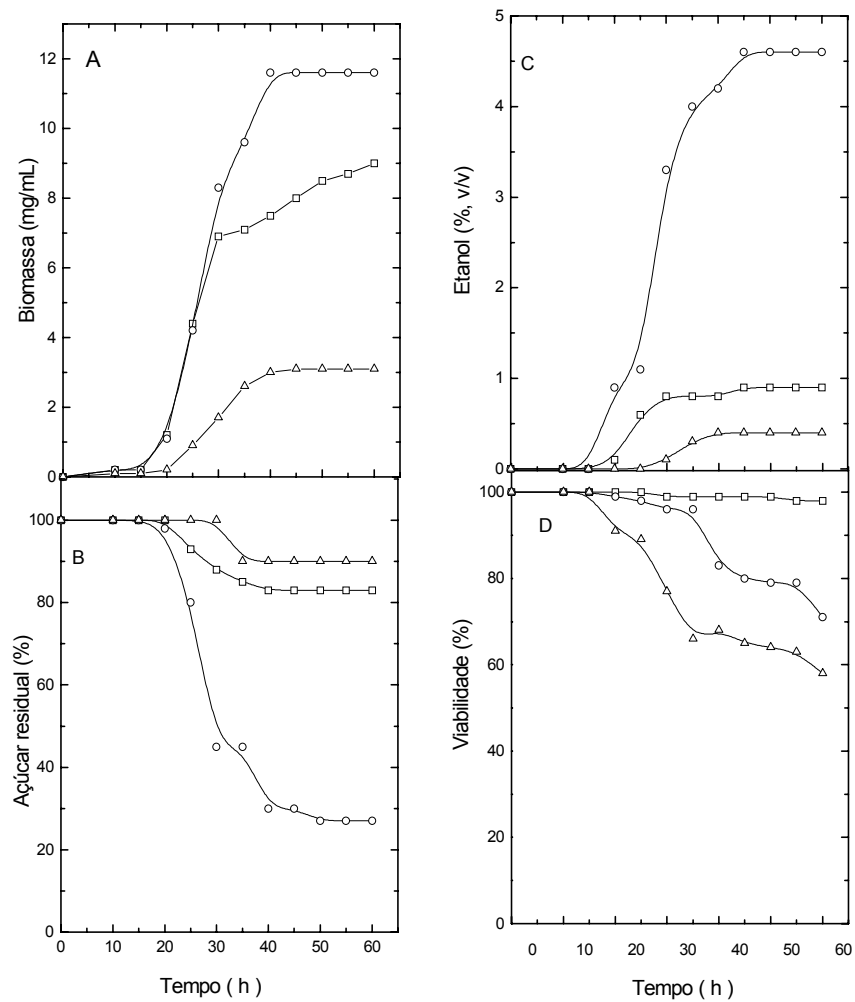


Figura 13. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **A3**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de galactose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

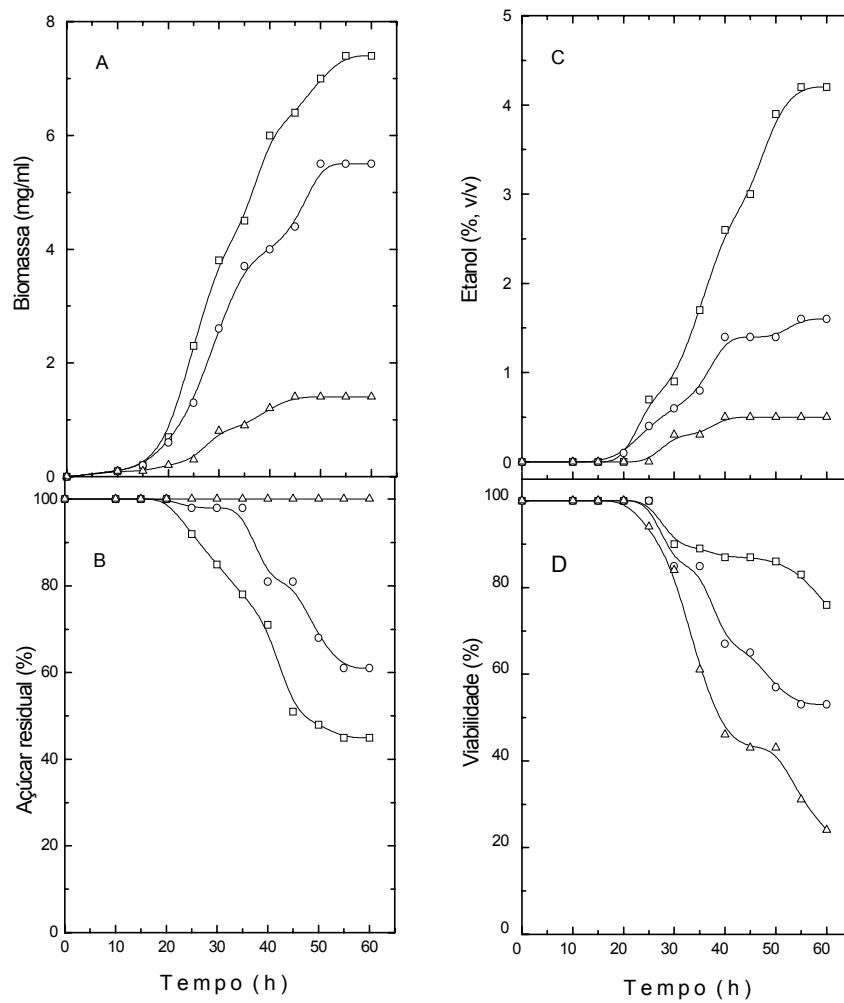


Figura 14. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de galactose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

IV.1.3. Estudos com diferentes concentrações de maltose.

Os estudos com maltose são importantes na medida em que este açúcar corresponde de 50 a 60% do açúcar fermentescível dos mostos das cervejarias na América do Norte (STEWART E RUSSELL, 1998). As figuras 15 a 22 mostram os parâmetros fermentativos das linhagens A3, L52, VIN7 e VIN13 no meio YNB contendo 2 e 15% (p/v) de maltose e complementados com diferentes fontes de nitrogênio.

Como já descrito para os açúcares glicose e galactose, através da análise do perfil do crescimento, o consumo de açúcar e produção e consumo de etanol das linhagens indicam, em maltose 2% (p/v), a ocorrência de diauxia. As linhagens apresentam acúmulo de biomassa pouco superior no meio suplementado com casaminoácidos em relação ao meio com peptona. As linhagens A3 e VIN13 apresentam crescimento mais rápido e maior produção de biomassa. No meio com sulfato de amônio o desempenho fermentativo das linhagens é bem inferior, o que se reflete na baixa utilização de açúcares e perda da viabilidade celular.

Em concentração mais alta de maltose é que se acentuam as diferenças no comportamento fermentativo das linhagens. As linhagens A3 e VIN13 têm crescimento considerável nos meios complementados com peptona e casaminoácidos, mas a utilização eficiente de maltose e sua conversão em etanol só são observadas no meio contendo casaminoácidos.

As linhagens L52 e VIN7 crescem (acumulam biomassa) e fermentam (produzem etanol) maltose nos meios complementados com peptona e casaminoácidos, e o desempenho fermentativo é um pouco superior no meio com peptona.

O comportamento fermentativo de A3 e L52 em maltose assemelha-se ao que foi observado na fermentação de galactose.

Os dados obtidos com as linhagens de cervejaria e de vinícola em relação aos parâmetros fermentativos mostram que apesar de serem selecionadas para processos industriais diferentes e de origem diferentes, apresentaram parâmetros fermentativos semelhantes (A3 e VIN13, L52 e VIN7) quando crescidas em meio contendo maltose e glicose 2% e 15% (p/v), em relação as diferentes fontes nitrogenadas.

A comparação dos dados mostrados nas tabelas 1 e 2 sugerem que a intensidade de repressão catabólica exercido pelos açúcares podem ter um impacto acentuado no comportamento fermentativo das linhagens industriais, que se reflete não

só no perfil de crescimento e no acúmulo final de biomassa, mas também na produção de etanol e na viabilidade celular. Estes efeitos são mais evidentes em concentração de açúcar mais elevada (15% p/v). A tabela 2 (página 84) também mostra um resumo dos parâmetros obtidos para as diferentes linhagens após 20 e 60 horas de crescimento em maltose 2% e 15% (p/v).

Estes resultados têm implicações na pesquisa básica e aplicada na medida que as alterações nos parâmetros fermentativos assemelham-se aos descritos para o que se convencionou chamar na indústria de produção de cerveja e de vinhos de “slugguish” (fermentação lenta, no sentido de muito longa) ou “stuck” (interrompida) “fermentations” (ALEXANDRE e CHARPENTIER, 1998; BISSON, 1999).

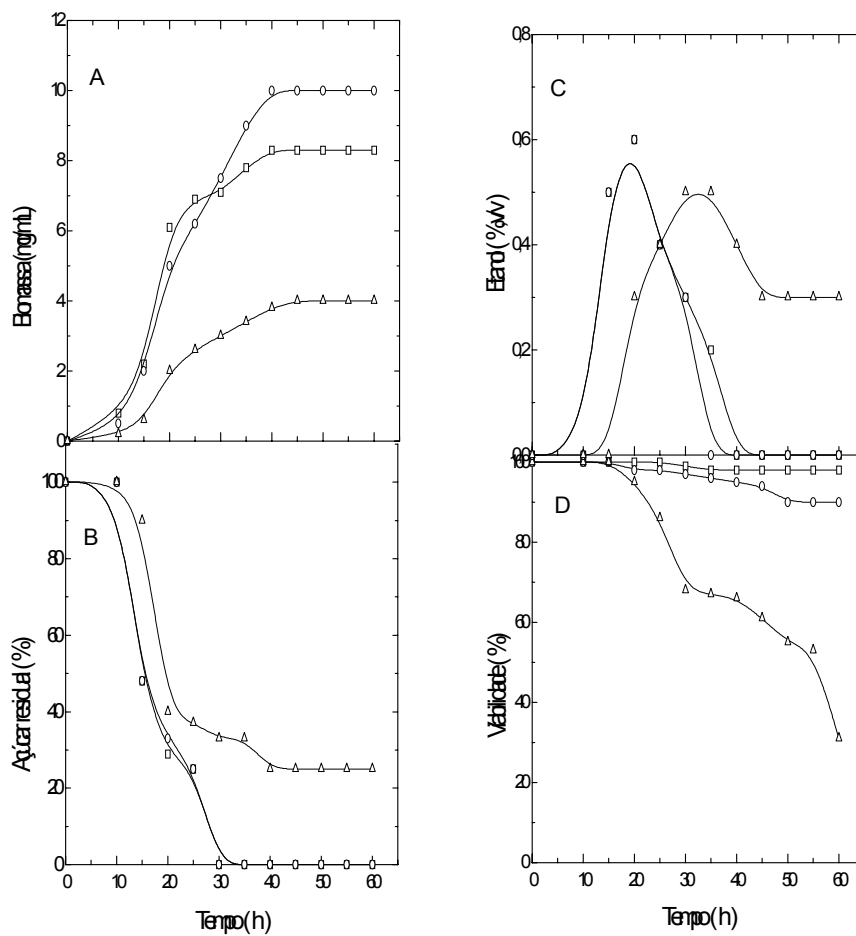


Figura 15. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **A3**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 2% (p/v) de maltose. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

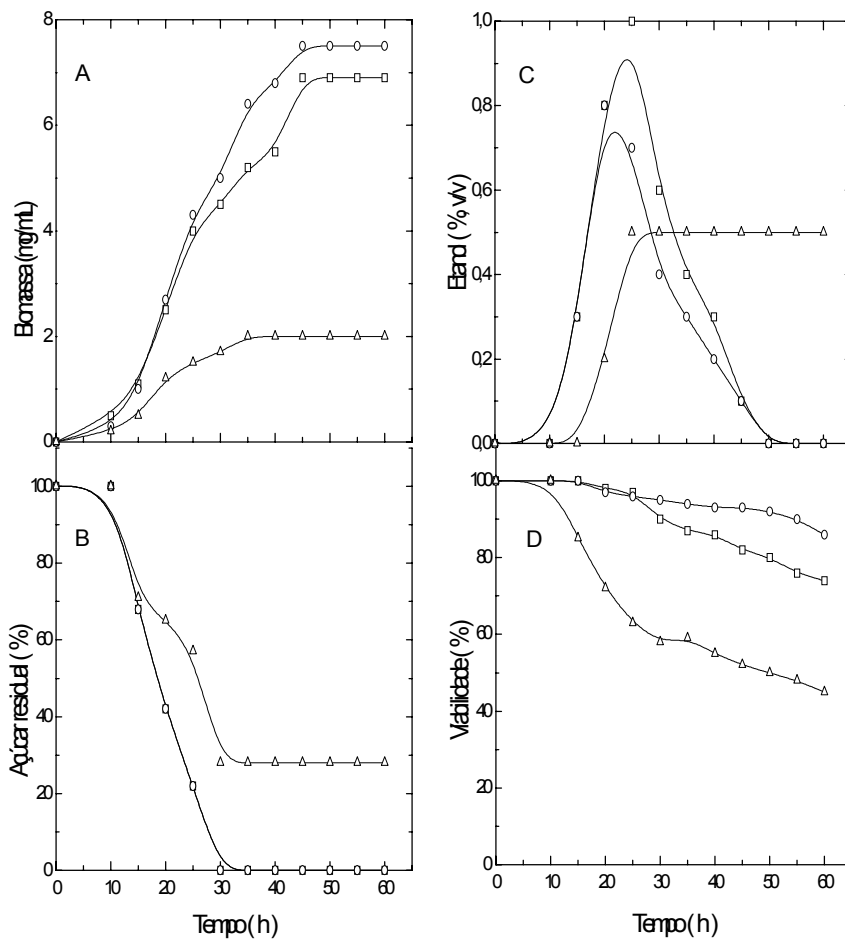


Figura 16. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 2% (p/v) de maltose. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

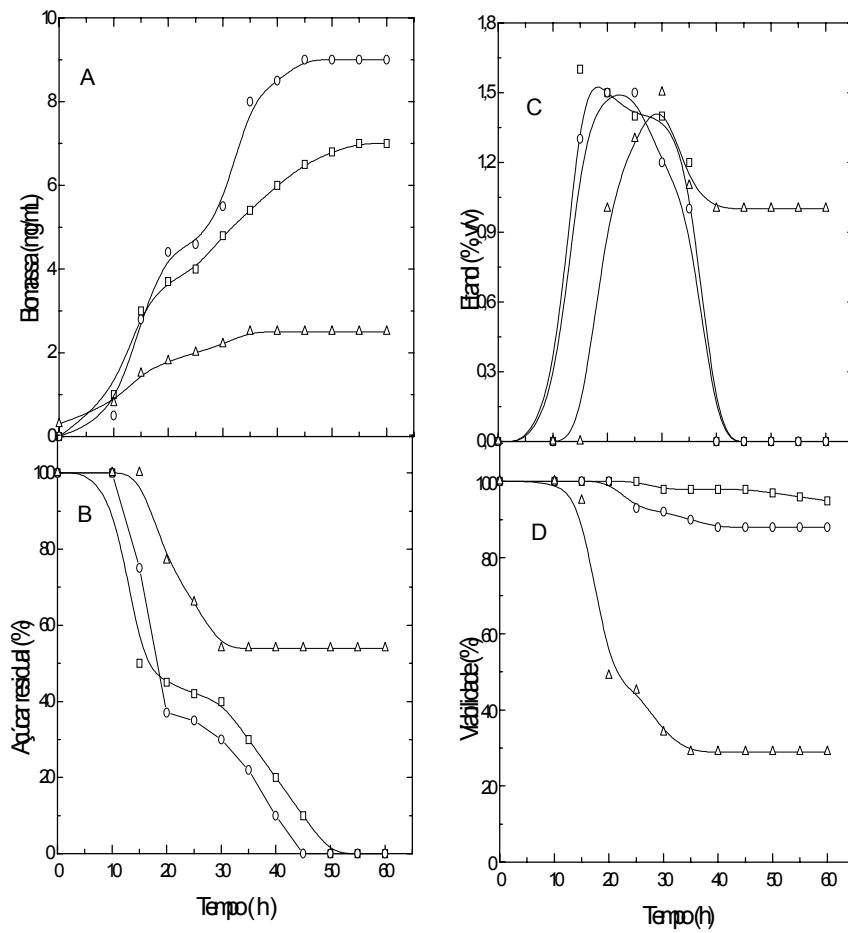


Figura 17. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **VIN7**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e 2% (p/v) de **maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

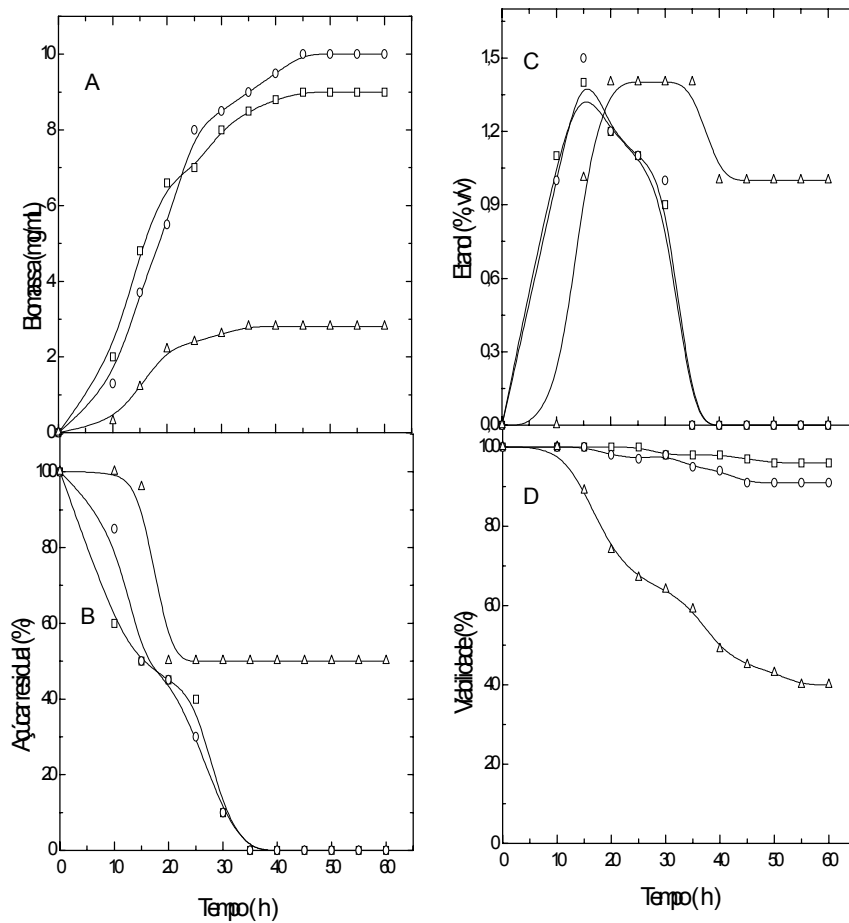


Figura 18. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **VIN13**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **2% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

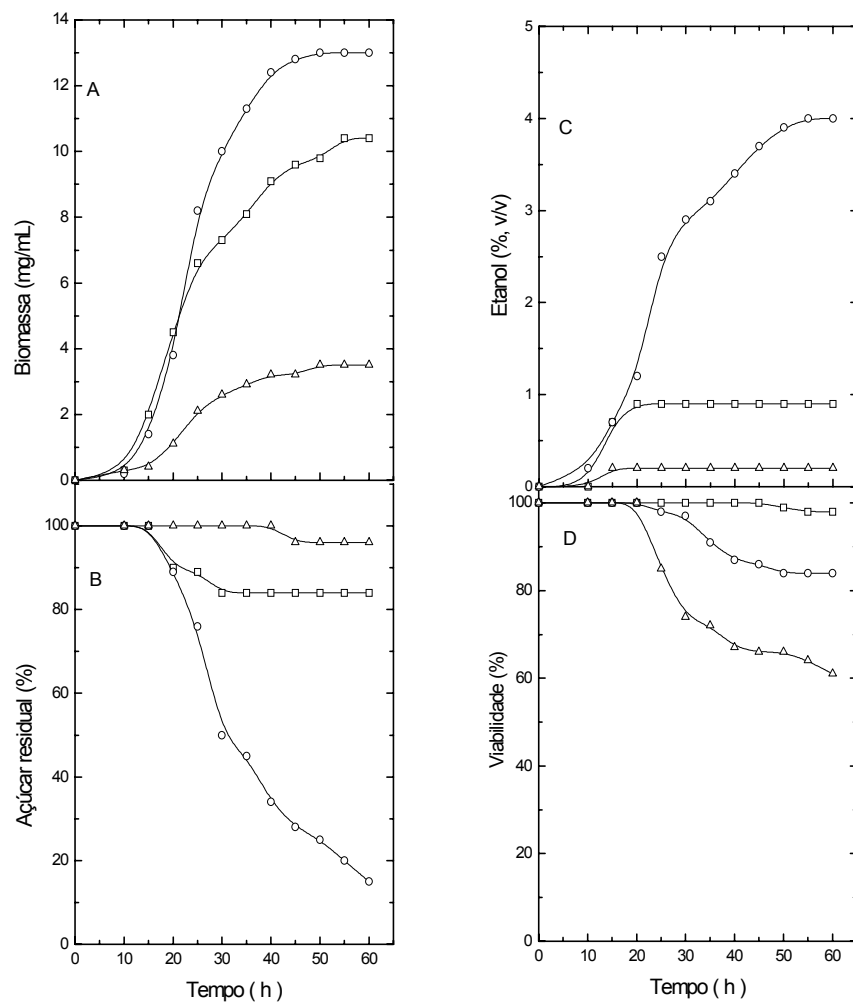


Figura 19. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **A3**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

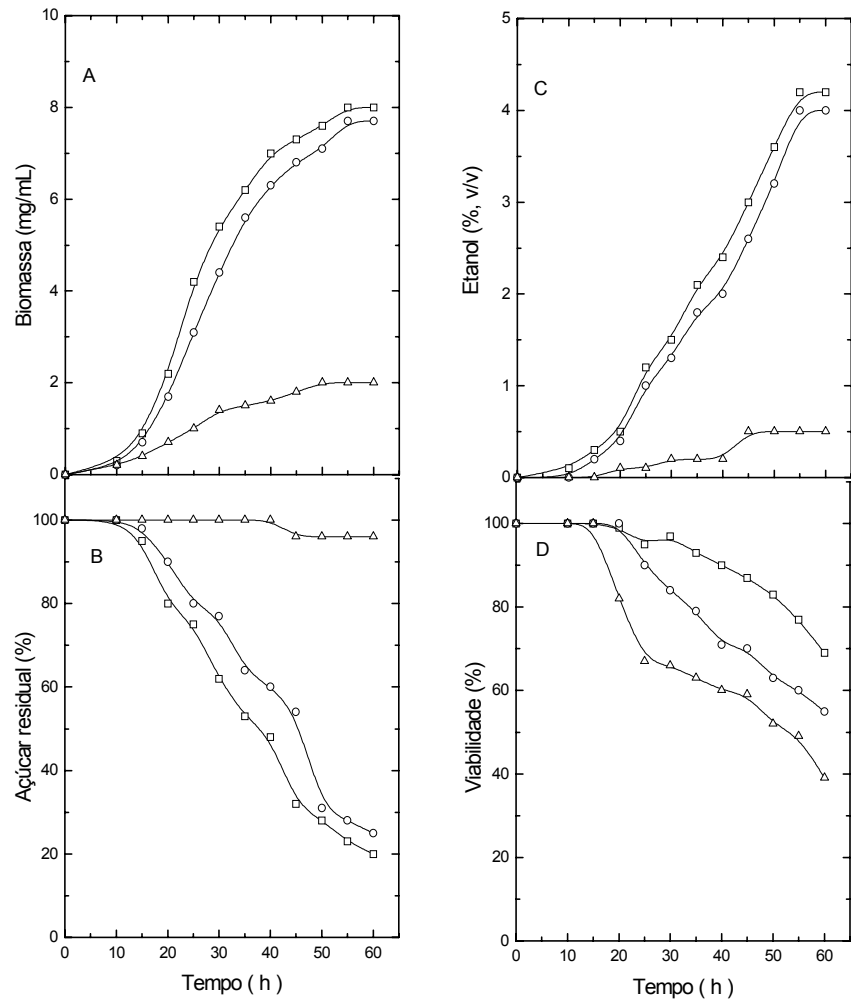


Figura 20. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

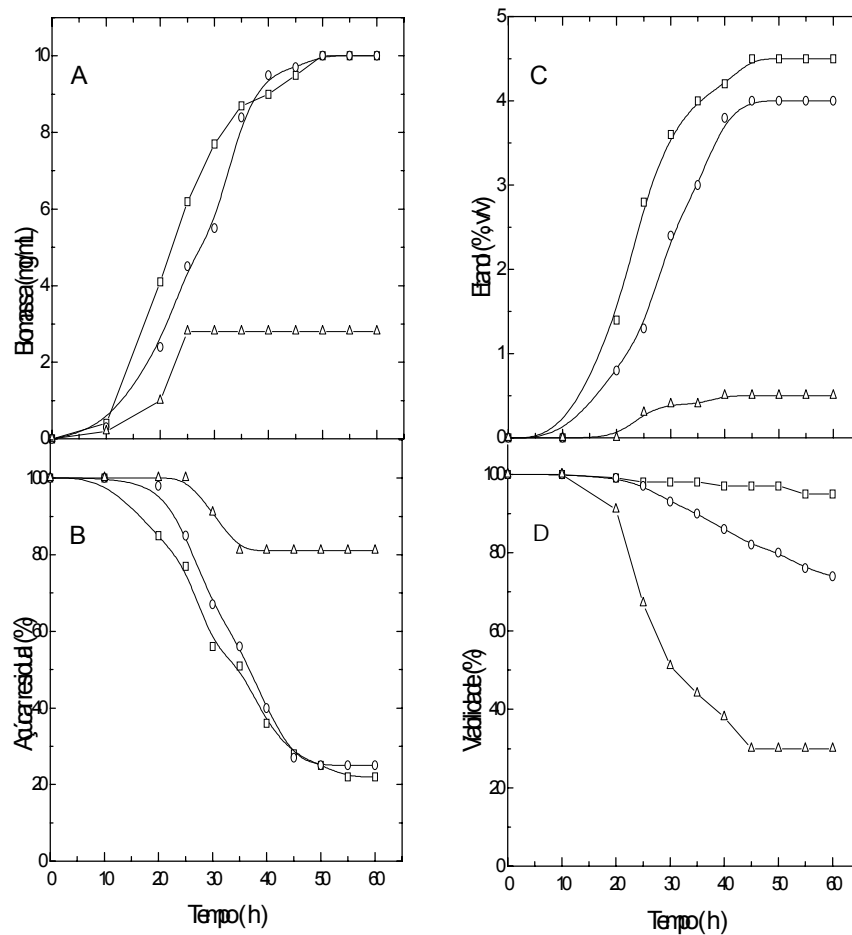


Figura 21. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **VIN7**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

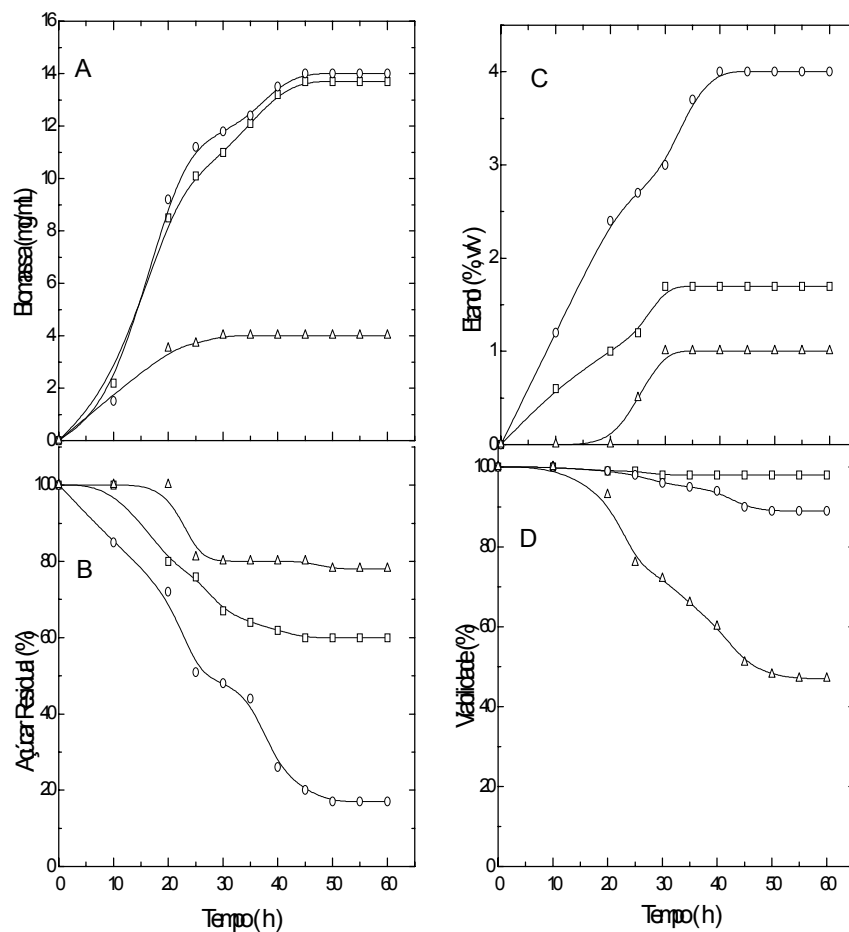


Figura 22. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **VIN13**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

IV.1.4. Análise comparativa dos parâmetros fermentativos entre as leveduras de cervejaria e vinícola.

As tabelas 1 e 2 mostram um resumo dos valores de produção de biomassa, etanol e viabilidade celular formado em diferentes concentrações de glicose (tabela 1) e maltose (tabela 2) em diferentes condições de cultivo. Os dados da tabela 1 são representativos das linhagens crescidas em glicose 2% e 15%, onde a glicose exerce intenso fenômeno de repressão catabólica sobre vários processos em *Saccharomyces cerevisiae*. A comparação dos dados das tabelas são mostrados nas figuras 3 a 10 e 15 a 22, que apresentam os parâmetros fermentativos das células de leveduras crescidas nas fontes de carbono glicose e maltose em diferentes fontes nitrogenadas, para as quatro linhagens analisadas.

Estes resultados refletem as diferenças metabólicas das leveduras, presentes em diferentes processos industriais de produção de cerveja e vinho, indicando que as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* mostram perfis diferenciadas em relação a interferência da natureza da fonte nitrogenada e de carbono nos parâmetros fermentativos analisados. Uma vez que os fluxos destes nutrientes são os principais elementos a serem considerados nos processos fermentativos industriais, o estudo da inter relação destes nutrientes podem se constituir em importante mecanismo de compreensão dos processos bioquímicos e metabólicos das diferentes *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 1. Produção de biomassa, etanol e viabilidade celular de linhagens de cervejaria e vinícola cultivadas em meio YNB contendo 2% e 15% glicose e diferentes fontes de nitrogênio.

Fonte de Carbono	Linhagens	Tempo (h)	Peptona			Casaminoácidos			Sulfato de Amônio		
			Biomassa (mg/mL)	Etanol (%)	Viabilidade (%)	Biomassa (mg/mL)	Etanol (%)	Viabilidade (%)	Biomassa (mg/mL)	Etanol (%)	Viabilidade (%)
Glicose 2%	A3	20	6.0	0.8	99	4.5	0.6	99	1.3	0.4	77
		60	8,5	0.0	95	9.0	0.0	83	2.7	0.0	58
	VIN13	20	6.5	1.0	100	6.3	1.2	100	2.6	0.0	76
		60	9.0	0.0	93	9.4	0.0	92	3.3	0.9	45
	L52	20	2.5	1.0	99	2.3	0.9	97	0.75	0.4	68
		60	6.2	0.0	86	5.5	0.0	81	2.0	0.0	11
VIN7	20	2.8	1.3	98	3.0	1.9	97	2.2	1.0	100	
	60	4.0	0.0	86	6.5	0.0	86	2.6	0.9	26	
Glicose 15%	A3	20	5.3	1.5	99	4.1	1.5	89	2.4	0.6	92
		60	9.6	4.4	98	5.2	4.0	57	3.0	1.2	45
	VIN13	20	8.8	2.7	98	5.5	1.5	87	3.0	1.0	77
		60	12.4	5.5	94	7.5	4.5	70	4.0	1.5	40
	L52	20	3.5	2.2	99	2.0	1.1	91	1.0	0.5	88
		60	8.0	5.4	70	3.8	2.6	40	2.1	0.5	15
VIN7	20	6.1	2.0	99	3.0	1.2	80	2.5	0.0	80	
	60	9.0	5.5	92	4.5	3.5	40	3.0	0.5	21	

Condições de fermentação: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0, em meio YNB contendo 1% (p/v) de diferentes fontes de nitrogênio em 2% e 15% de glicose.

Tabela 2. Produção de biomassa, etanol e viabilidade celular de linhagens de cervejaria e vinícola cultivadas em meio YNB contendo 2% e 15% maltose e diferentes fontes de nitrogênio.

Fonte de Carbono	Linhagens	Tempo (h)	Peptona				Casaminoácidos				Sulfato de Amônio				
			Biomassa (mg/mL)	Etanol (%)	Viabilidade (%)	Biomassa (mg/mL)	Etanol (%)	Viabilidade (%)	Biomassa (mg/mL)	Etanol (%)	Viabilidade (%)	Biomassa (mg/mL)	Etanol (%)	Viabilidade (%)	
Maltose 2%	A3	20	6.0	0.6	100	5.5	0.6	98	2.0	0.0	95	2.0	0.0	95	
		60	8.1	0.0	98	10.0	0.0	90	4.0	0.3	31	4.0	0.3	31	
	VIN13	20	6.6	1.2	100	5.5	1.2	97	2.2	1.3	74	2.2	1.3	74	
		60	9.0	0.0	95	10.0	0.0	94	2.8	1.0	40	2.8	1.0	40	
	L52	20	2.7	0.8	98	2.7	0.8	97	1.2	0.2	72	1.2	0.2	72	
		60	7.0	0.0	74	7.7	0.0	86	1.8	0.5	45	1.8	0.5	45	
	VIN7	20	3.7	1.5	100	4.4	1.5	100	1.5	1.0	95	1.5	1.0	95	
		60	6.8	0.0	95	9.5	0.0	88	2.2	1.0	29	2.2	1.0	29	
	Maltose 15%	A3	20	4.5	0.9	100	3.8	1.2	100	1.1	0.2	100	1.1	0.2	100
			60	10.4	0.9	98	13.0	4.0	84	3.5	0.2	61	3.5	0.2	61
		VIN13	20	8.5	1.0	99	9.2	2.4	99	3.5	0.0	93	3.5	0.0	93
			60	13.7	1.7	98	14.0	4.0	89	4.0	1.0	47	4.0	1.0	47
L52		20	2.2	0.5	99	1.7	0.4	100	0.70	0.1	82	0.70	0.1	82	
		60	8.0	4.2	70	7.7	4.0	55	2.0	0.5	39	2.0	0.5	39	
VIN7		20	4.1	1.4	100	2.4	0.8	99	1.0	0.0	91	1.0	0.0	91	
		60	10.0	4.5	95	10.0	4.0	74	2.8	0.5	28	2.8	0.5	28	

Condições de fermentação: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0, em meio YNB contendo 1% (p/v) de diferentes fontes de nitrogênio em 2% e 15% de maltose.

IV.2. A INFLUÊNCIA DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NO DESEMPENHO DAS LINHAGENS A3 E L52 E FISO.

Devido aos resultados obtidos com o cultivo das linhagens A3 (tipo “Ale”) e L52 (tipo “Lager”), ambas de cervejaria, as quais mostraram comportamento fermentativo muito diferenciado nos meios contendo galactose e maltose de 15% (p/v), foram realizados experimentos nos quais os meios de cultura foram complementados com fonte de nitrogênio na concentração de 3% (p/v). As figuras 23 a 31 apresentam acúmulo de biomassa, utilização de açúcar, produção de etanol e viabilidade celular das linhagens A3 , L52 e Fiso durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo 15% (p/v) nas fontes de carbono glicose, galactose e maltose, respectivamente.

IV.2.1. Estudos com concentrações de glicose 15%

O estudos com glicose e da complexidade das fontes de nitrogênio sobre o metabolismo das linhagens A3, L52 e Fiso estão nas figuras 23 a 25, que mostram o acúmulo de biomassa, utilização de açúcar, produção de etanol e viabilidade celular, de células das linhagens industriais.

Em glicose 15% (p/v) e 3% da fonte nitrogenada as amostras A3 e L52 e Fiso apresentam melhor desempenho fermentativo no meio complementado com peptona, com maior produção de biomassa, consumo de açúcar eficiente, produção de etanol e manutenção da viabilidade celular. O perfil de variação dos parâmetros fermentativos é semelhante com a fonte nitrogênio na concentração de 1% (p/v), exceto pelo fato de ter corrido maior produção de biomassa e de etanol. Isto é, a maior disponibilidade de compostos nitrogenados assimiláveis melhora o desempenho fermentativo de leveduras, como já previamente descrito (CASEY *et al.*,1984).

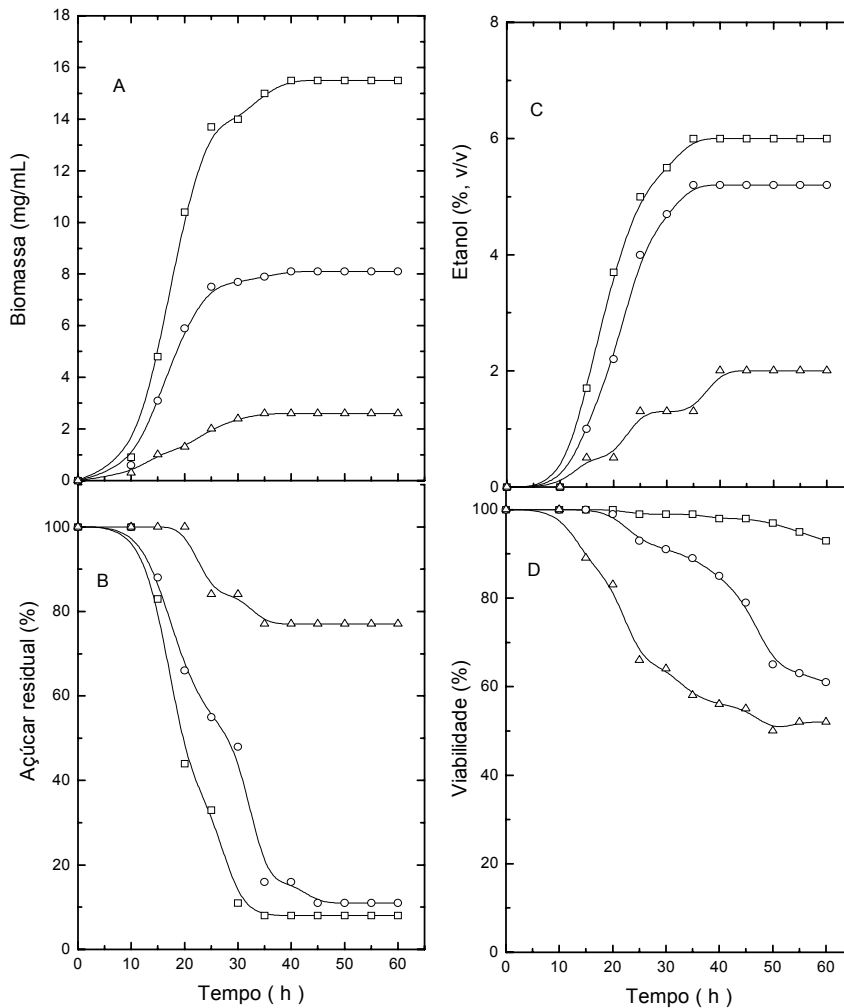


Figura 23. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **A3**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

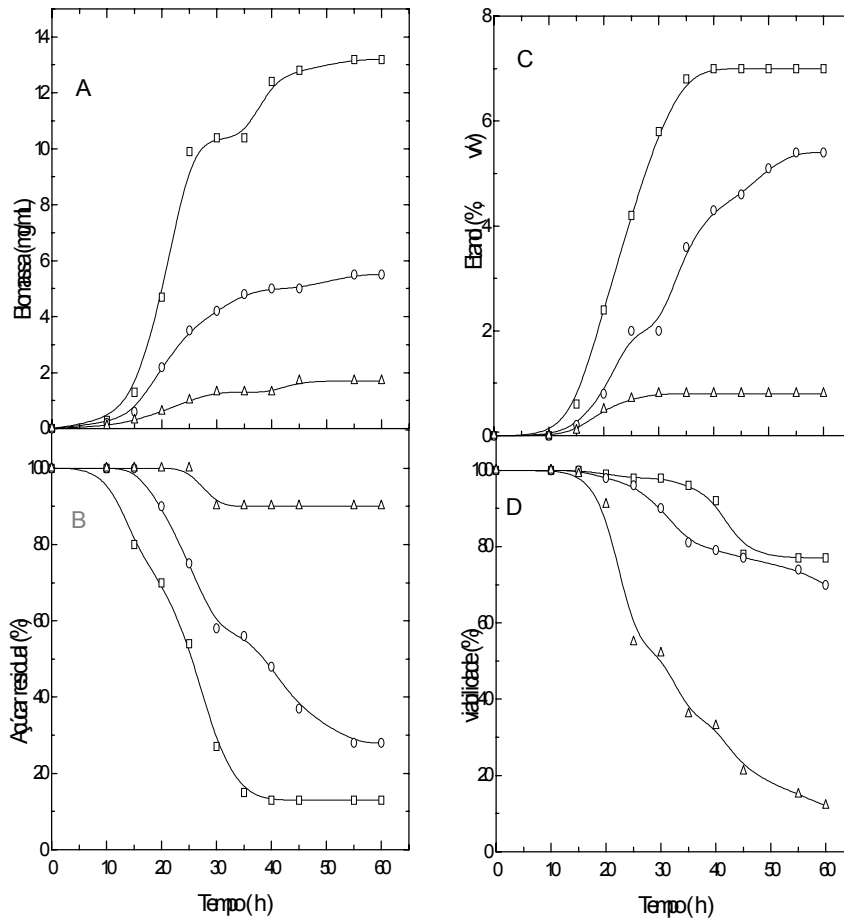


Figura 24. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (△) e **15% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

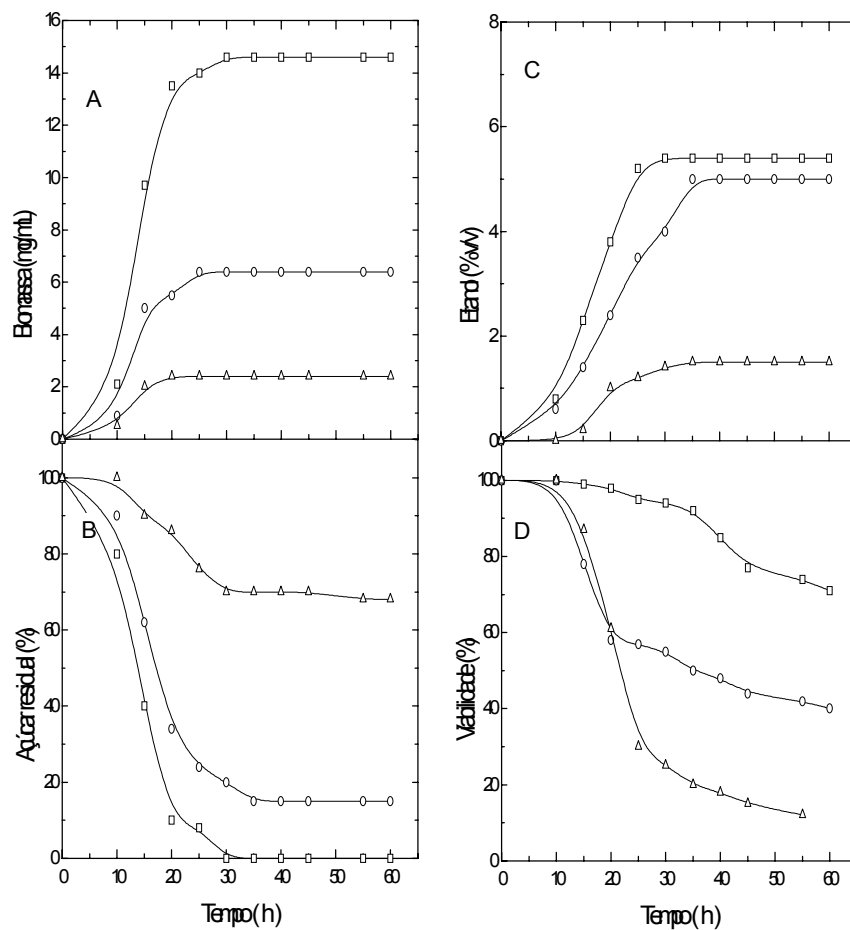


Figura 25. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **Fiso**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

IV.2.2. Estudos com concentrações de galactose 15%

A análise do perfil de crescimento, consumo de açúcar, produção de etanol e viabilidade celular das linhagens A3, L52 e Fiso, em galactose 15% (p/v), e fonte de nitrogênio 3% (p/v), mostra que ocorre, como no caso da glicose, uma melhora no desempenho fermentativo nos meios complementados com peptona e casaminoácidos.

A figura 26 mostra que a linhagem A3 retoma a sua capacidade de consumir o açúcar e de produção de etanol no meio complementado com peptona, apresentando um comportamento diferente em relação a fonte de nitrogênio 1% (p/v) .

O aumento da concentração de peptona e casaminoácidos para 3% melhora o desempenho fermentativo da linhagem L52, quando comparado com a concentração de 1%, e a peptona continua a ser o suplemento nitrogenado superior a casaminoácidos.

A linhagem Fiso, na presença de maior disponibilidade de compostos nitrogenados, como observado para as outras linhagens, também melhora o seu desempenho fermentativo, e neste caso a peptona se torna o melhor suplemento nitrogenado, diferentemente do que foi observado na concentração de 1%, onde peptona e casaminoácidos propiciou condições semelhantes de crescimento (CRUZ *et al.*, 2003).

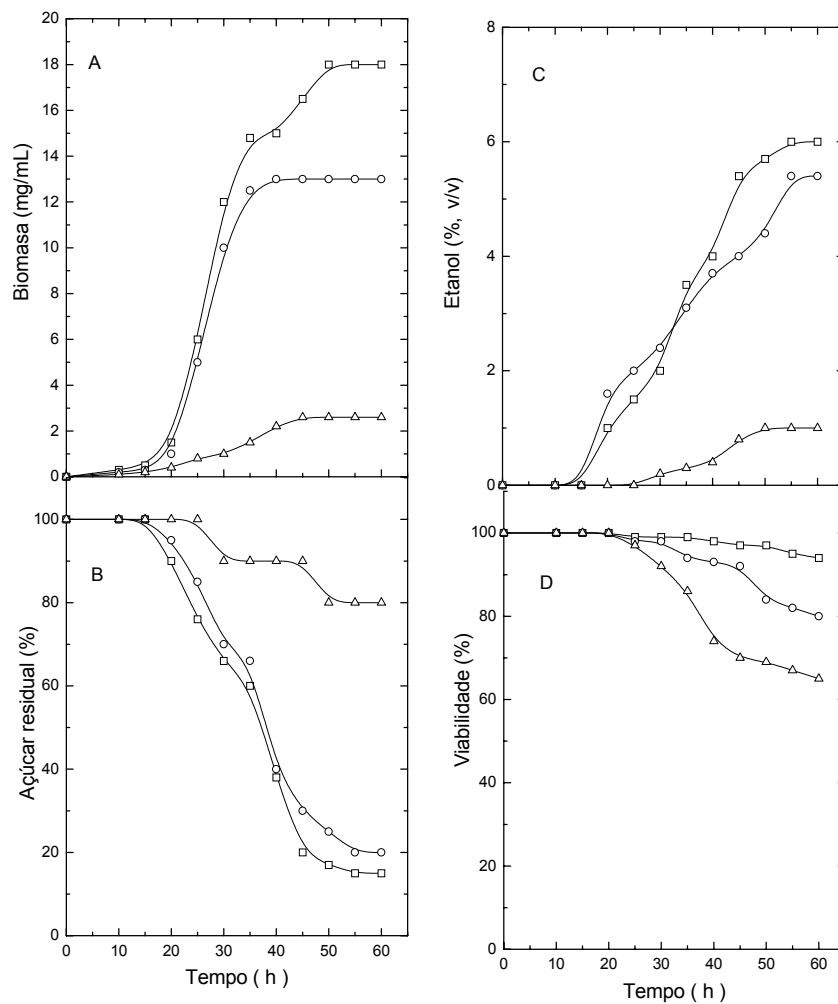


Figura 26. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **A3**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de galactose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

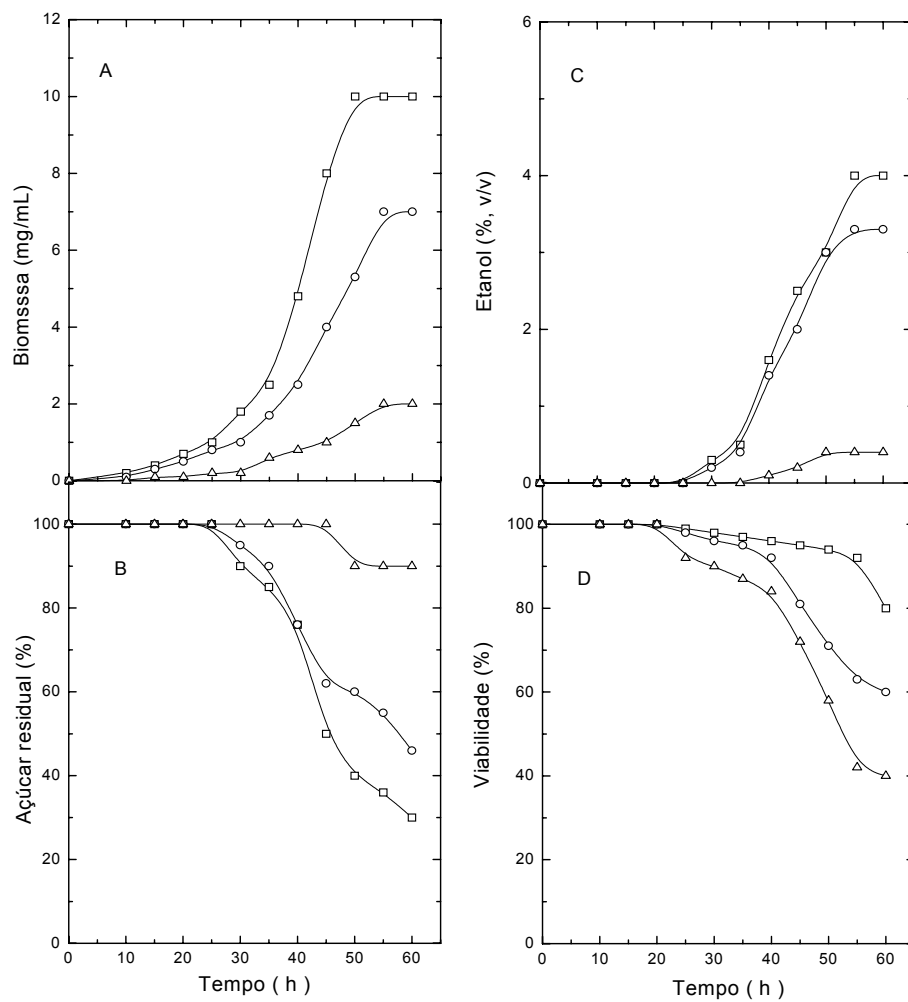


Figura 27. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de galactose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

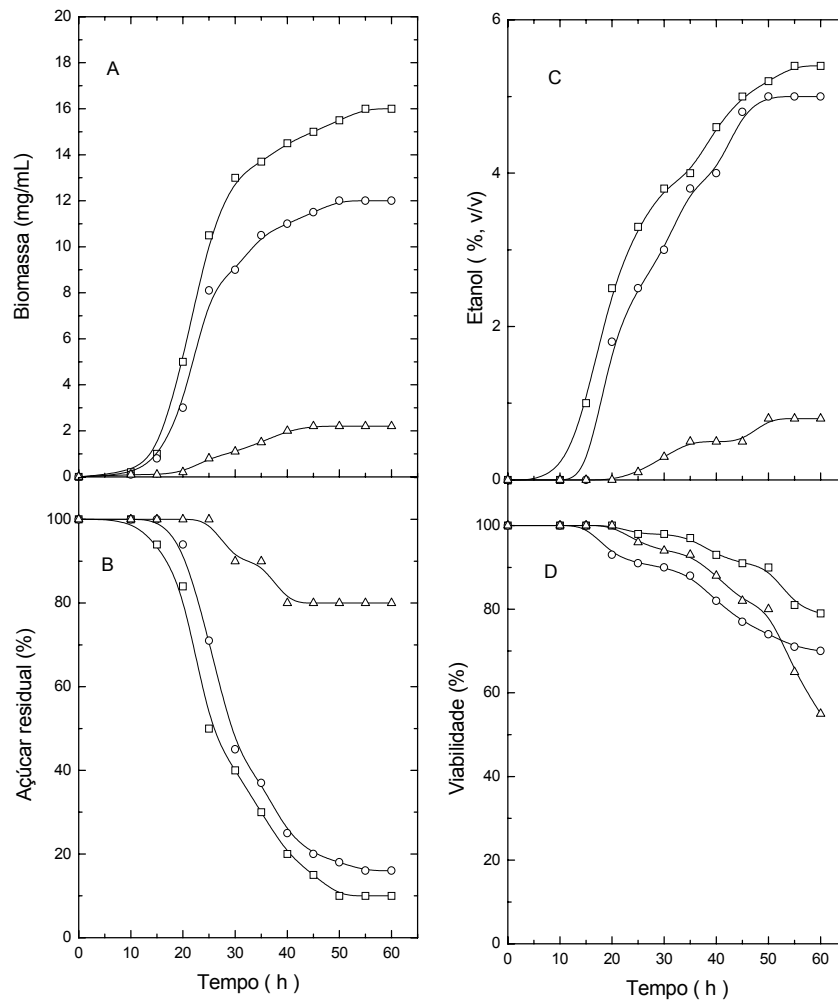


Figura 28. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **Fiso**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de galactose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

IV.2.3. Estudos com concentrações de maltose 15%

A figura 29 apresenta os resultados da linhagem A3 no meio complementado com peptona 3% (p/v), e mostra que a linhagem retoma o consumo de açúcar e a produção de etanol, apresentando um perfil diferente daquele apresentado quando o meio é suplementado com a fonte de nitrogênio 1% (p/v).

O aumento da concentração da fonte de nitrogênio, como observado para outros açúcares, melhora o desempenho fermentativo das linhagens L52 e Fiso, entretanto a linhagem Fiso fermenta maltose mais rapidamente. Sulfato de amônio é o que induz condição menos favorável de fermentação, e o aumento na sua concentração têm um impacto negativo quando comparado com 1%.

A Tabela 3 compara os valores dos parâmetros fermentativos obtidos para as linhagens Fiso, L52 e A3 na fermentação de diferentes açúcares e na presença de fontes nitrogenadas com diferentes complexidades estruturais. Pode-se observar que, no geral, a produção de biomassa e de etanol é maior no meio com fonte de nitrogênio 3%, exceto para a complementação com sulfato de amônio. Como já comentado este fato decorre da maior disponibilidade de compostos nitrogenados assimiláveis no meio de cultura (CASEY *et al.*, 1984). Pode-se explicar o fato da linhagem A3 retomar a capacidade de fermentar maltose e galactose na presença de peptona, como um aumento na disponibilidade de aminoácidos na forma livre na concentração de 3%.

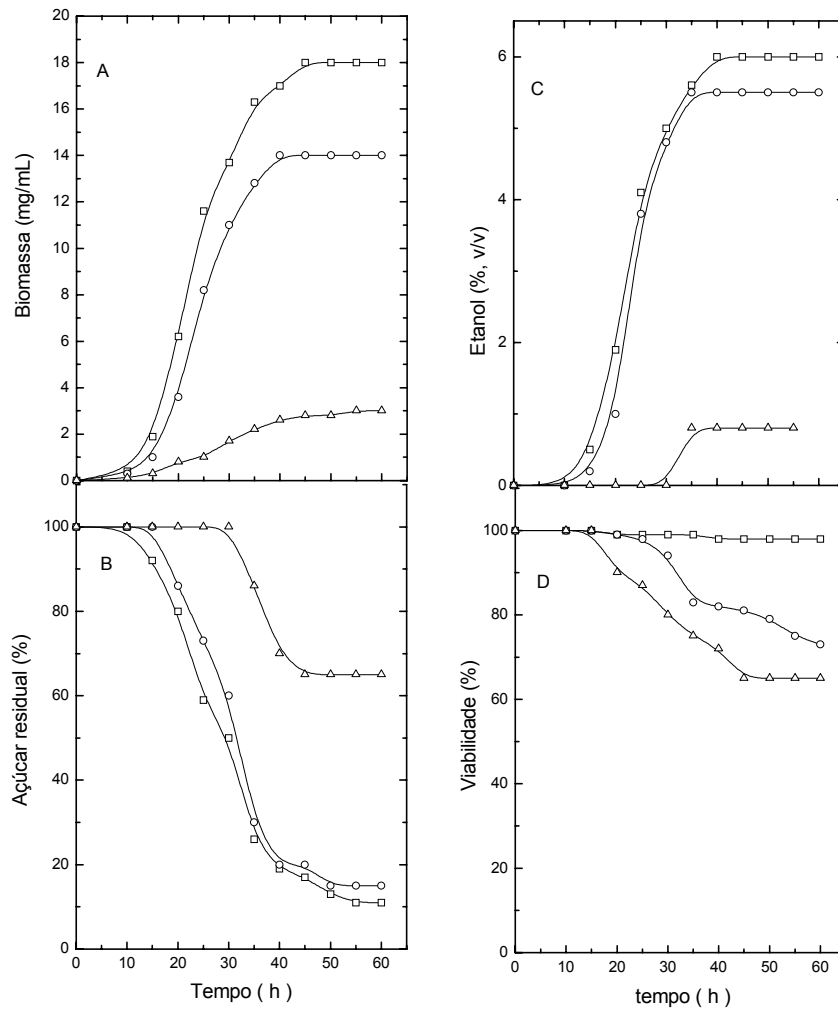


Figura 29. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **A3**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

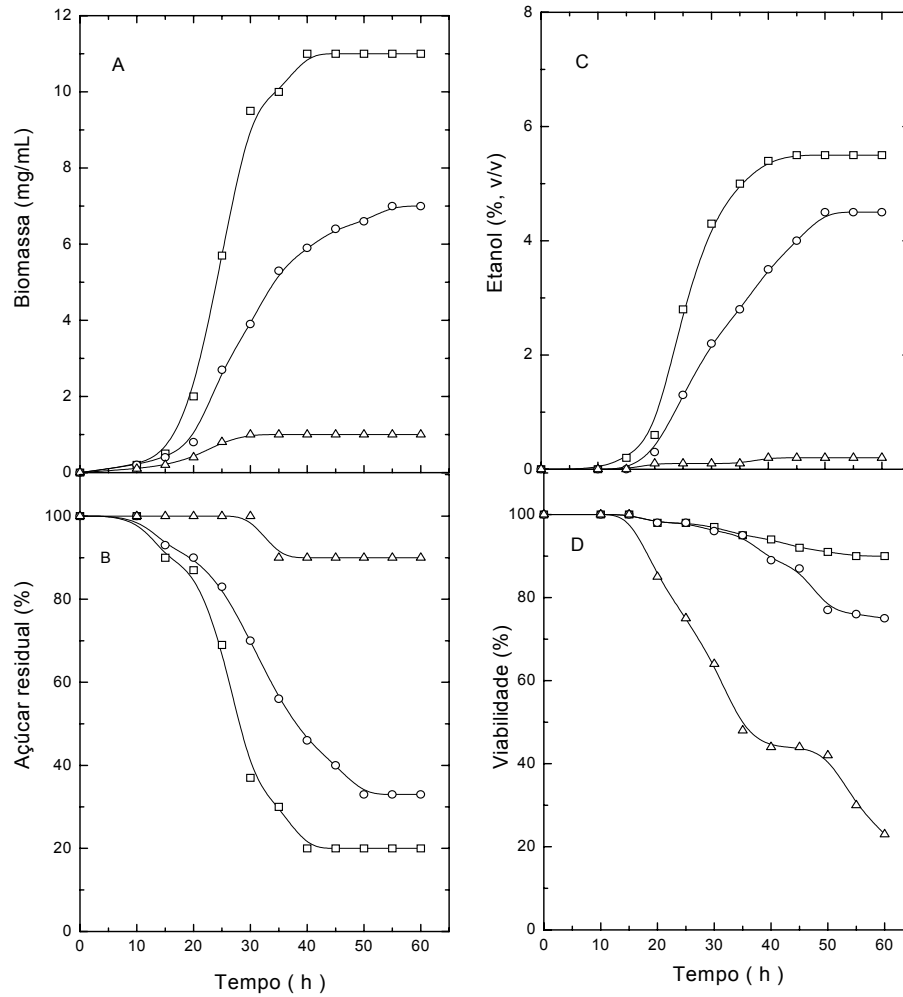


Figura 30. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **L52**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

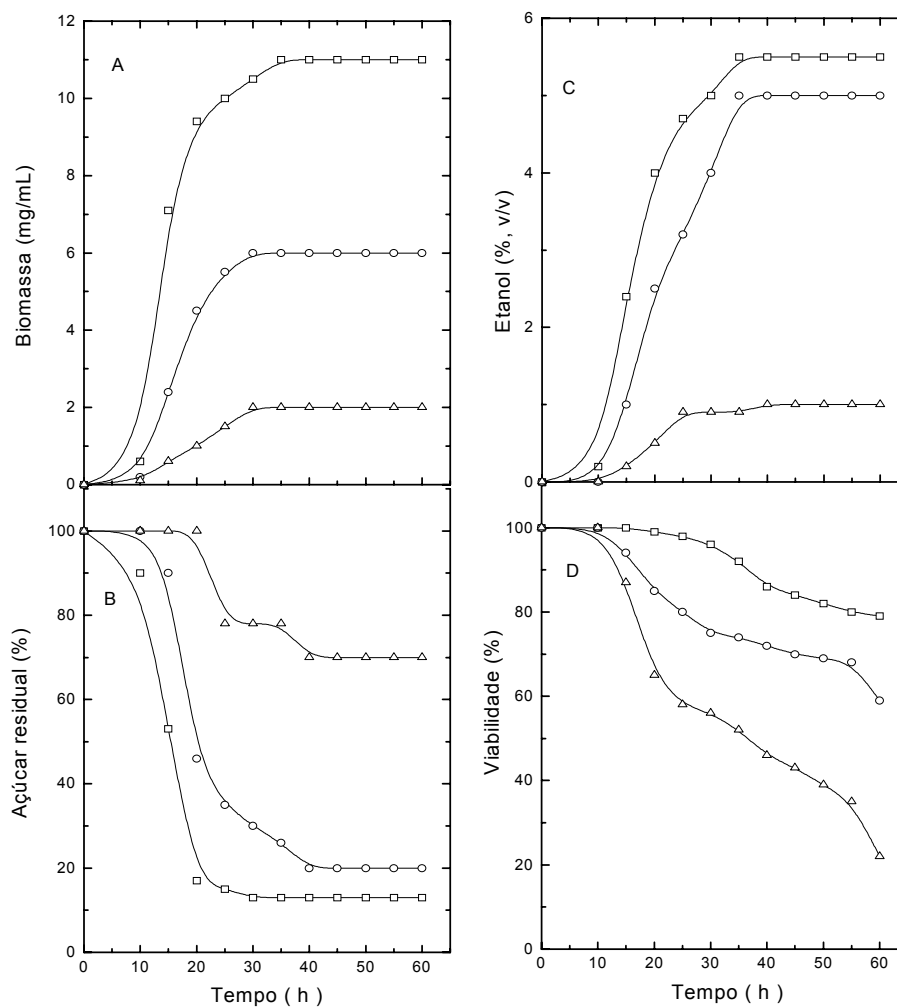


Figura 31. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), produção de etanol (C), e viabilidade celular (D). Linhagem **Fiso**, crescimento aeróbico em meio YNB contendo 3% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (O) ou sulfato de amônio (Δ) e **15% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

A Tabela 3 mostra os dados de produção de biomassa e etanol pelas linhagens A3, L52 e Fiso nos meios contendo glicose, galactose ou maltose 15% p/v, complementados com fonte de nitrogênio nas concentrações de 1% e 3%. A análise comparativa dos dados mostrados na tabela indica diferenças significativas no comportamento das linhagens frente às diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. Por exemplo:

1. Fermentação em glicose - No geral se observa que a peptona é a fonte de nitrogênio que propicia melhores condições de fermentação: com maior produção de biomassa e etanol, e ainda com a preservação da viabilidade celular (dado não mostrado na tabela). Como já foi citado anteriormente (CRUZ *et al.*, 2002), a complementação com casaminoácidos parece eliminar possível fase de crescimento aeróbico, provavelmente devido a perda de viabilidade celular. O aumento da concentração da fonte de nitrogênio de 1 a 3%, tanto na complementação com peptona como com casaminoácidos, sempre induziu um efeito favorável ao processo fermentativo, aumentando-se a produção de biomassa e etanol, e com valores de viabilidade mais altos. A complementação com sulfato de amônio sempre propiciou condições desfavoráveis de fermentação. Há uma acentuada acidificação do meio, e mesmo com o ajuste de pH, ou trabalhando em condições tamponante a produção de biomassa e de etanol sempre foram inferiores no meio com sulfato de amônio.

2. Fermentação em galactose - A galactose, apesar de exercer o efeito de repressão catabólica, de alguma forma é considerado um açúcar “não repressor”, aparentemente devido a um efeito mais atenuado quando comparado com a glicose (GANCEDO, 1998). Com galactose, já foi observado um comportamento diferenciado das linhagens, na concentração de 1% da fonte de nitrogênio (CRUZ *et al.*, 2002). A linhagem L52 mostrou um perfil semelhante ao observado para a glicose, sendo a peptona o melhor complemento nitrogenado. Com as linhagens Fiso e A3 o melhor complemento nitrogenado é o casaminoácidos, a tal ponto da linhagem A3 crescer, mas não produzir etanol, isto é, não fermentar galactose no meio complementado com peptona (CRUZ *et al.*, 2003).

3. Fermentação em maltose - Os resultados mais interessantes e, ao mesmo tempo intrigantes, são os obtidos com maltose, na medida em que este dissacarídeo é o mais abundante em mostos industriais de produção de cerveja. A linhagem A3 cresce bem nos meios complementados com peptona e casaminoácidos, mas só consegue produzir grande quantidade de etanol no meio complementado com casaminoácidos, a

exemplo do observado para o caso da galactose. Este comportamento da linhagem A3 pode sugerir que a mesma apresenta uma capacidade limitada em utilizar peptídeos. A linhagem L52 também se destaca na medida em que apresenta desempenho fermentativo semelhante nos meios complementados com peptona e casaminoácidos.

Os dados da Tabela 3 são exemplos de como a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio pode interferir com o metabolismo de leveduras. Os efeitos sobre os parâmetros fermentativos não são só sensíveis à complexidade estrutural da fonte de nitrogênio, mas também ao tipo de açúcar e sua concentração, e varia entre as diferentes linhagens.

O aumento da concentração da fonte de nitrogênio para 3%, não só melhora os parâmetros fermentativos, como restitui a capacidade da linhagem A3 de produzir etanol na presença de maltose e galactose 15%, no meio complementado com peptona. Uma explicação deste fato é que ao se aumentar a concentração de peptona, aumenta-se também a quantidade de aminoácidos livres no meio em quantidade suficiente para propiciar condições adequadas para a linhagem A3 crescer e fermentar maltose e galactose.

Tabela 3: Produção de biomassa (mgcels/mL) e de etanol (% v/v, valor entre parênteses) produzidos por linhagens industriais em meios com diferentes açúcares 15% e nas concentrações de 1 e 3% (p/v) de fonte de nitrogênio.

Linhagem		Fiso		L52		A3	
		FN 1% *	FN 3%	FN 1% *	FN 3%	FN 1% *	FN 3%
Glicose	Pep	9,7 (4,8)	15,0 (5,5)	8,0 (5,5)	13,0 (7,0)	9,8 (4,4)	15,8 (6,0)
	Cas	4,0 (3,0)	6,2 (5,0)	3,9 (3,6)	5,8 (5,5)	5,2 (4,0)	8,0 (5,2)
	Am	2,5 (2,5)	2,5 (2,0)	2,0 (0,3)	1,8 (0,4)	3,0 (1,2)	2,5 (2,0)
Galactose**	Pep	14,2(2,7)	16,0 (5,5)	7,5 (4,2)	10,0 (4,0)	9,0 (0,8)	18,0 (6,0)
	Cas	13,8(5,0)	12,0 (5,0)	5,5 (1,7)	7,0 (3,3)	11,7(4,5)	13,0 (5,5)
	Am	3,0 (1,1)	2,0 (0,70)	1,4 (0,6)	2,0 (0,4)	3,2 (1,0)	2,2 (1,0)
Maltose	Pep	13,8(5,0)	11,0 (5,5)	8,0 (4,4)	11,0 (5,5)	10,5 (1,0)	18,0 (5,6)
	Cas	6,0 (3,5)	6,0 (5,0)	7,8 (4,0)	7,0 (4,5)	13,0 (4,0)	13,5 (6,0)
	Am	2,5 (1,0)	2,0 (2,0)	2,0 (1,0)	1,0 (0,3)	2,8 (0,2)	3,0 (1,0)

*Os dados com glicose e FN 1% (fonte de nitrogênio) estão publicados em (CRUZ *et al.*, 2002).

**Os dados com galactose e FN 1% estão publicados em (CRUZ *et al.*, 2003).

IV.3. O ESTUDO DO EFEITO DE FRAÇÕES PEPTÍDICAS ISOLADAS DA PEPTONA NO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS

Com o objetivo de observar se o comportamento fermentativo diferenciado das linhagens industriais em peptona e casaminoácidos eram devido à presença de aminoácidos na forma de peptídeos, realizou-se estudos com frações peptídicas isoladas de peptona. Para este estudo foram selecionadas duas frações: uma designada fração (4-8), resultante do material eluído nos tubos de 4 a 8, contendo somente peptídeos; e outra designada fração (9-14), resultante do material eluído nos tubos de 9 a 14, contendo uma fração de peptídeos menores e aminoácidos. Estas frações foram utilizadas como fonte de nitrogênio.

As figuras 32 a 35 mostram os dados fermentativos obtidos com a utilização de diferentes frações peptídicas isoladas da peptona como fonte de nitrogênio pelas leveduras A3 e L52 (ambas de cervejaria) e Fiso (linhagem de panificação), em meio YNB contendo glicose e maltose 2% (p/v).

IV.3.1. Estudos com diferentes frações da peptona em glicose

A figura 32 mostra o efeito da presença da fração peptídica (4-8), como fonte de nitrogênio, no crescimento e utilização de glicose. Pode-se observar que maior acúmulo de biomassa ocorreu para a linhagem Fiso, seguido pela L52. A linhagem A3 foi a que apresentou menor acúmulo de biomassa. Na presença da fração (9-14), na figura 33 todas as linhagens crescem bem, sendo a A3 que apresenta maior acúmulo de biomassa.

IV.3.2. Estudos com diferentes frações da peptona em maltose

A figura 34 mostra os dados obtidos quando as linhagens industriais são cultivadas em meio YNB contendo maltose e a fração (4-8) como fonte de nitrogênio. Observa-se que as linhagens Fiso e L52 apresentam crescimento semelhante em maltose, e que o crescimento da linhagem A3, mesmo em maltose, é menor e assemelha-se ao detectado no meio com glicose. No meio contendo a fração (9-14) como fonte de nitrogênio na figura 33 o crescimento das linhagens industriais é intenso, sendo que a linhagem A3 é a que produz mais biomassa.

Os dados mostrados nas figuras 32 e 35 indicam que as linhagens apresentam diferentes capacidades de utilizarem peptídeos como fonte de nitrogênio. Os dados obtidos através da análise da utilização das frações peptídicas isoladas da peptona como fonte de nitrogênio, corroboram, em parte com os resultados obtidos com as linhagens industriais em experimentos com células crescidas em glicose e maltose 15% na fonte de nitrogênio 1%.

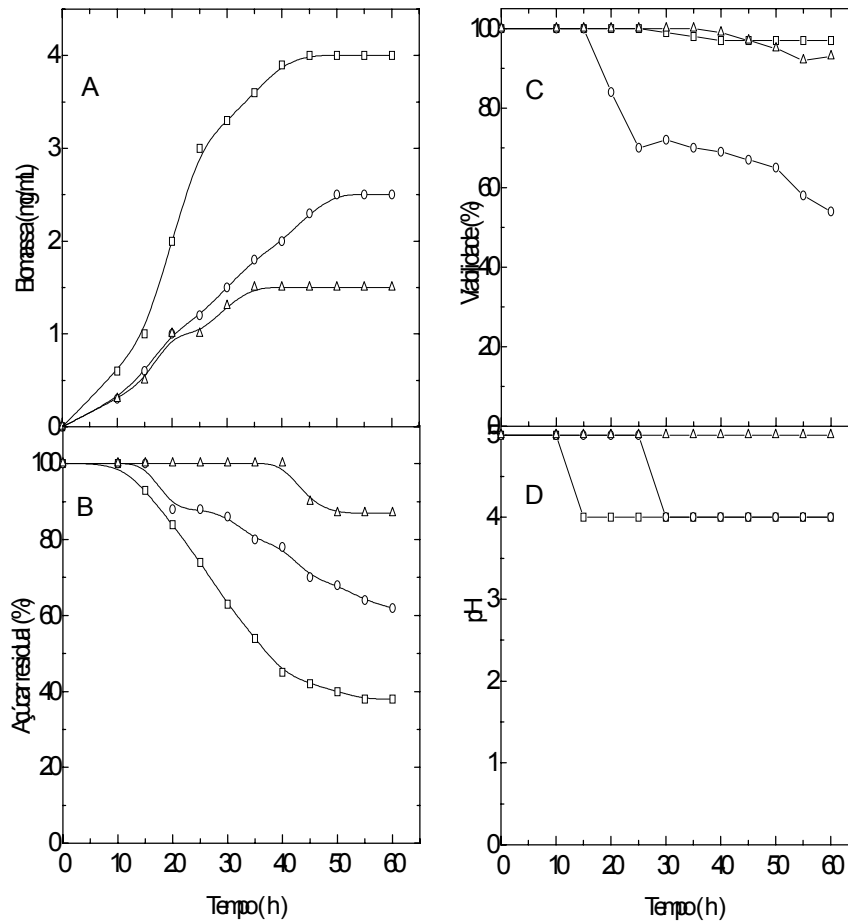


Figura 32. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), viabilidade celular (C) e pH (D). Linhagem **A3** (Δ), **L52** (o) e **Fiso** (\square), crescimento em meio **YNB** contendo 1% (p/v) da fração (4 – 8) em 2% (p/v) de glicose. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

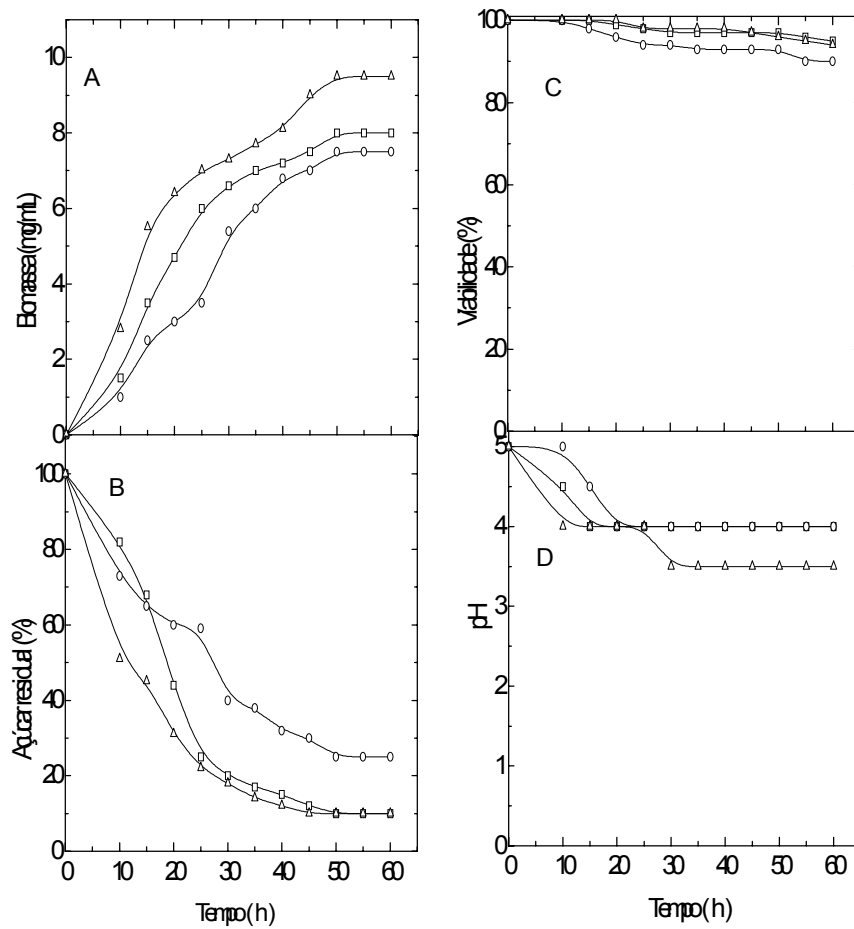


Figura 33. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), viabilidade celular (C) e pH (D). Linhagem **A3** (Δ), **L52** (o) e **Fiso** (\square), crescimento em meio **YNB** contendo 1% (p/v) da fração (9 – 14) em **2% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

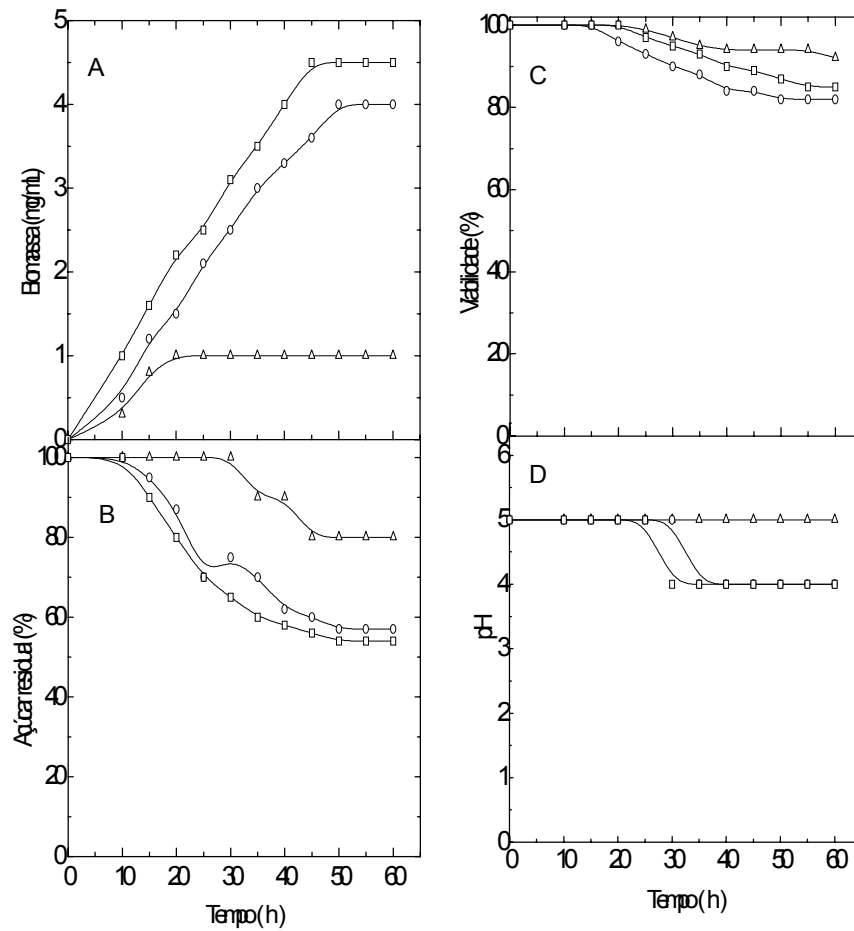


Figura 34. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), viabilidade celular (C) e pH (D). Linhagem **A3** (Δ), **L52** (o) e **Fiso** (\square), crescimento em meio **YNB** contendo 1% (p/v) da fração (4 - 8) em **2% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

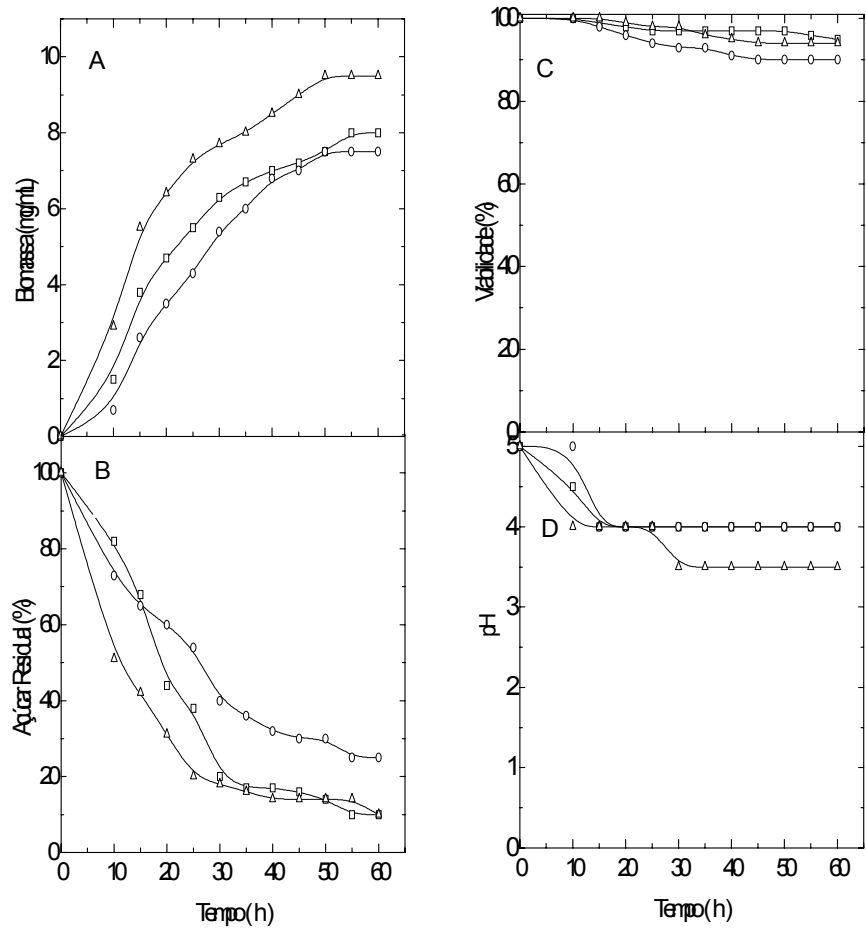


Figura 35. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), viabilidade celular (C) e pH (D). Linhagem **A3** (Δ), **L52** (o) e **Fiso** (\square), crescimento em meio **YNB** contendo 1% (p/v) da fração (9 - 14) em **2% (p/v) de maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0

IV.4. O EFEITO DA COMPLEXIDADE ESTRUTURAL DA FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO NO PERFIL DOS NÍVEIS DE GLICOGÊNIO E TREALOSE EM CÉLULAS DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS CRESCIDAS EM DIFERENTES AÇÚCARES.

Este estudo refere-se aos efeitos da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no acúmulo de glicogênio e trealose pelas leveduras industriais: A3, L52 e Fiso. Glicogênio e trealose são, primariamente, considerados como carboidratos de reserva, mas que também podem estar envolvidos em outras atividades fisiológicas (FRANÇOIS & PARROU, 2001). A glicose é uma importante fonte de energia para os processos fisiológicos e apresenta um forte mecanismo de repressão catabólica. Assim, o estudo das possíveis interferências da glicose e de outros açúcares no perfil dos níveis de glicogênio e trealose em leveduras, possa fornecer informações que permitam melhor entendimento dos eventos metabólicos diferenciados que ocorrem nas leveduras industriais, quando crescidas na presença de fontes de nitrogênio com diferentes complexidades estrutural. As figuras 36 a 71 mostram o acúmulo de glicogênio e trealose durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 2% e 15% (p/v) das fontes de carbono (glicose, maltose e galactose), complementadas com diferentes fontes de nitrogênio na concentração de 1% (p/v).

A análise das curvas de crescimento das linhagens industriais em glicose 2% mostrou a ocorrência de diauxia, e que em torno de 24 horas observa-se a exaustão da glicose e a transição do metabolismo fermentativo para o oxidativo. Estudos recentes (PARROU *et al.*, 1999) mostraram que o acúmulo de glicogênio acontece no estágio final da fase exponencial de crescimento, ainda na presença de glicose, e utilizado na fase estacionária, em condições limitantes de nutrientes.

Neste estudo escolhemos três diferentes tempos de cultivo para avaliar a quantidade de glicogênio e trealose presentes nas células de leveduras: 25, 40 e 60 horas. O primeiro (25 horas) é na região de exaustão do açúcar, e também quando se observa a transição diáuxica. Os outros tempos representam a região inicial (40 horas) e mais tardia (60 horas) da fase estacionária. Em cultivo na presença de 15% de açúcar as condições são diferentes, mas mesmo assim as linhagens devem responder metabolicamente às imposições das condições de cultivo, com reflexo no acúmulo de carboidratos de reserva.

IV.4.1. Perfil dos níveis de glicogênio em células crescidas em glicose

O efeito da complexidade estrutural das fontes de nitrogênio sobre o metabolismo de glicogênio das linhagens A3, L52, Fiso estão nas figuras 36 a 41, as quais mostram o acúmulo deste carboidrato de reserva durante o crescimento de células *S. cerevisiae*, em glicose nas concentrações de 2% e 15% (p/v).

A análise dos perfis da quantidade de glicogênio para todas as linhagens, nos diferentes tempos de cultivo, mostra que eles apresentam a mesma característica: a concentração do carboidrato variou, mas foi sempre menor em peptona e maior em sulfato de amônio, exceto para a linhagem A3, quando crescida em glicose 2%. Neste caso as quantidades de glicogênio em peptona e casaminoácidos são próximas. Os dados mostram nas tabelas 4, 5 e 6, que no geral, em glicose, a linhagem Fiso acumula maior quantidade de glicogênio quando comparada com as outras linhagens. Outro aspecto a se comentar é que a concentração de glicogênio é maior em 25 horas de cultivo, o que está de acordo com a função de carboidrato de reserva, que se acumula no final da fase exponencial e é mobilizado na fase estacionária. Este fenômeno melhor observado na presença de glicose 2%.

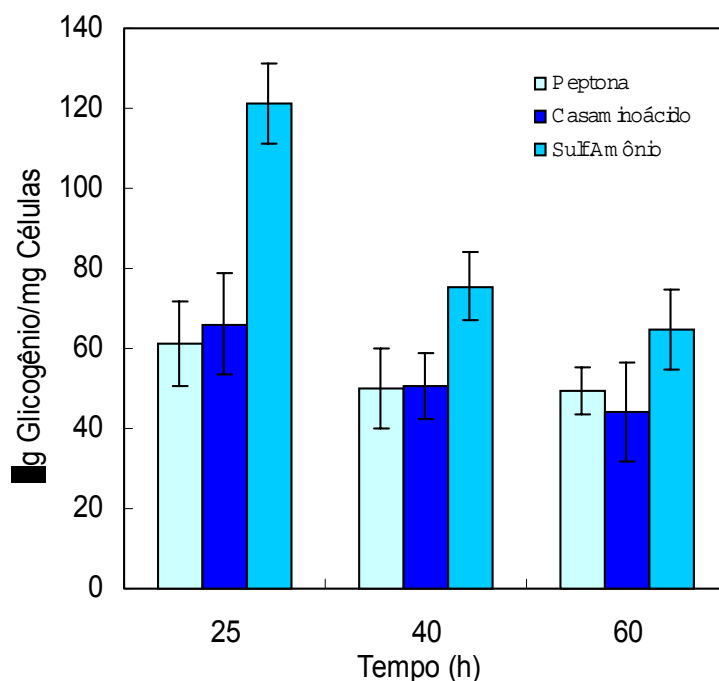


Figura 36. Perfil dos níveis de glicogênio em células *S. cerevisiae* da linhagem **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de glicose** suplementados com 1% (p/v) peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

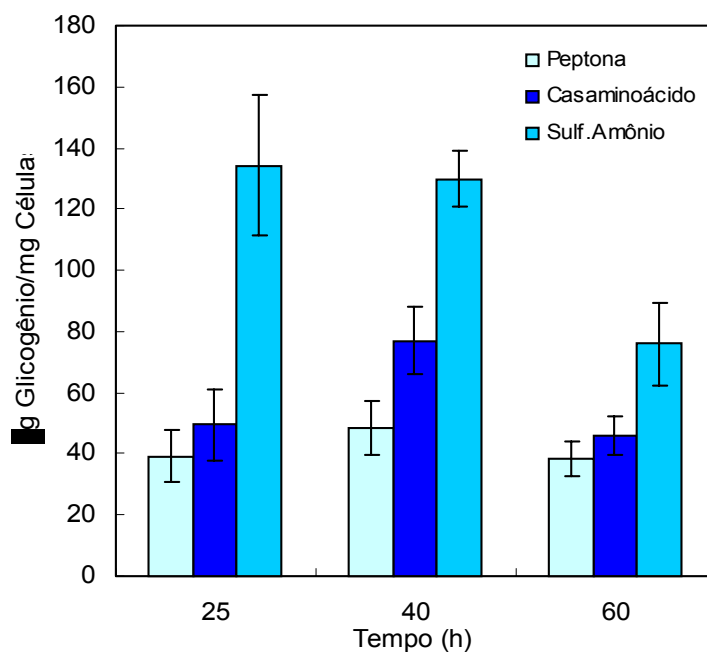


Figura 37. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de glicose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0

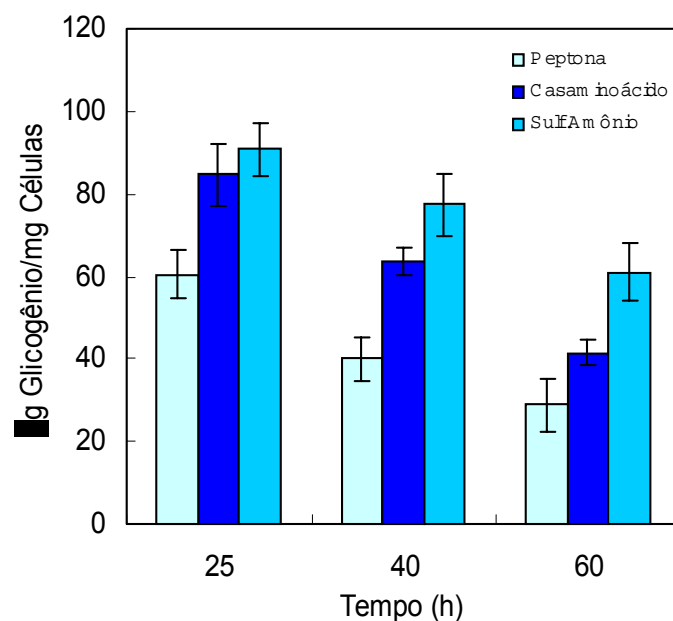


Figura 38. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de glicose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0

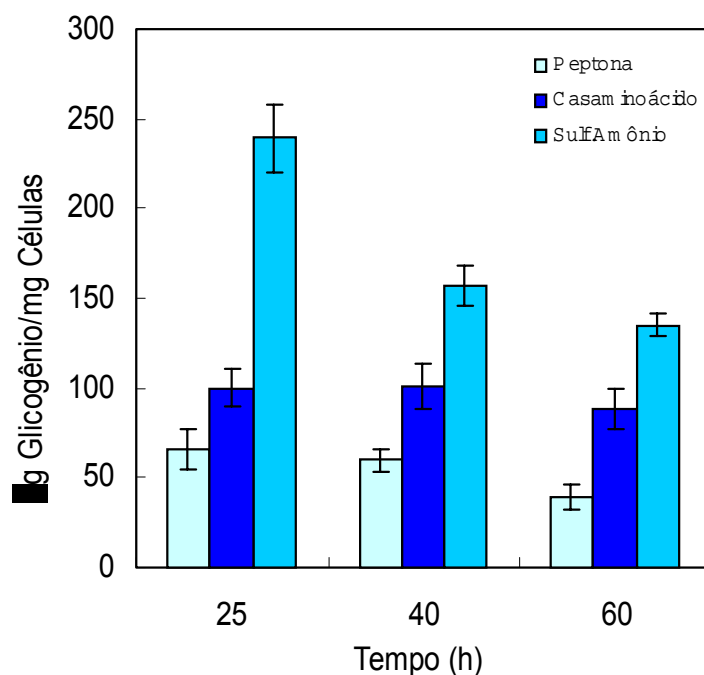


Figura 39. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de glicose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0

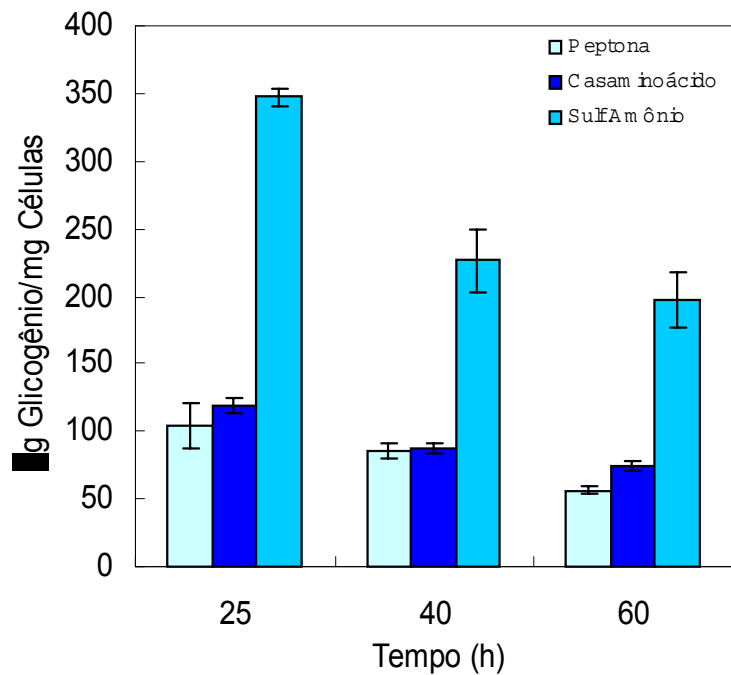


Figura 40. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* **Fiso**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de glicose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

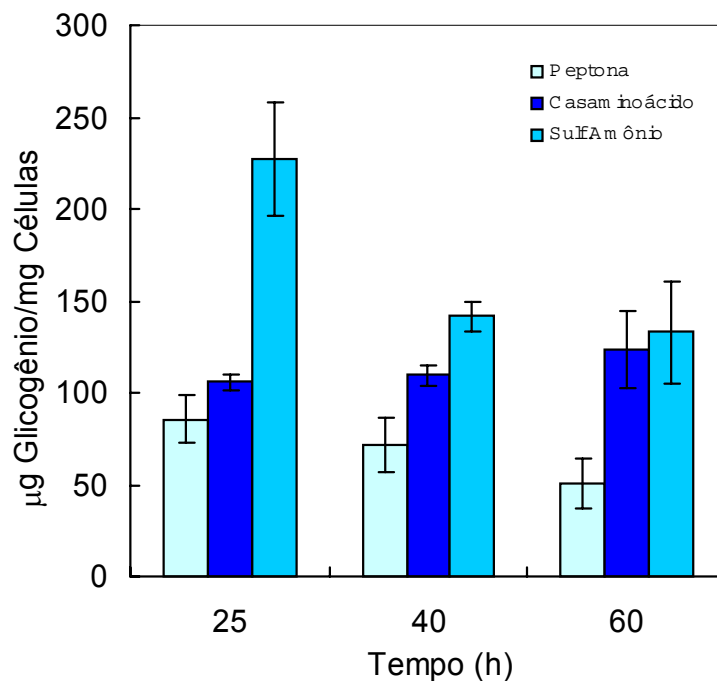


Figura 41. Perfil dos níveis de glicogênio em células de *S. cerevisiae* **Fiso**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de glicose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo 30°C, 250 rpm, pH inicial 5.0.

IV.4.2. Perfil dos níveis de glicogênio em células crescidas em maltose

A produção de glicogênio pelas linhagens A3, L52 e Fiso, em maltose 2% e 15% (p/v), estão mostradas nas figuras 42 a 47. A análise dos perfis da quantidade de glicogênio para todas as linhagens, nos diferentes tempos de cultivo, mostra a mesma característica observada em glicose: a concentração do carboidrato variou, mas foi sempre menor em peptona e maior em sulfato de amônio, exceto para a linhagem A3, quando crescida em maltose 2% e 15%. Nestas condições as quantidades de glicogênio em peptona são maiores do que no meio com casaminoácidos. Os dados mostrados nas tabelas 4, 5 e 6 mostram, que no geral, em maltose, maior acúmulo de glicogênio acontece em 15% do açúcar; e em 25 horas de cultivo a quantidade de glicogênio é sempre maior que em 60 horas; o que é de alguma forma condizente com a função de reserva atribuído ao glicogênio: se acumulando no final da fase exponencial e mobilizado na fase estacionária.

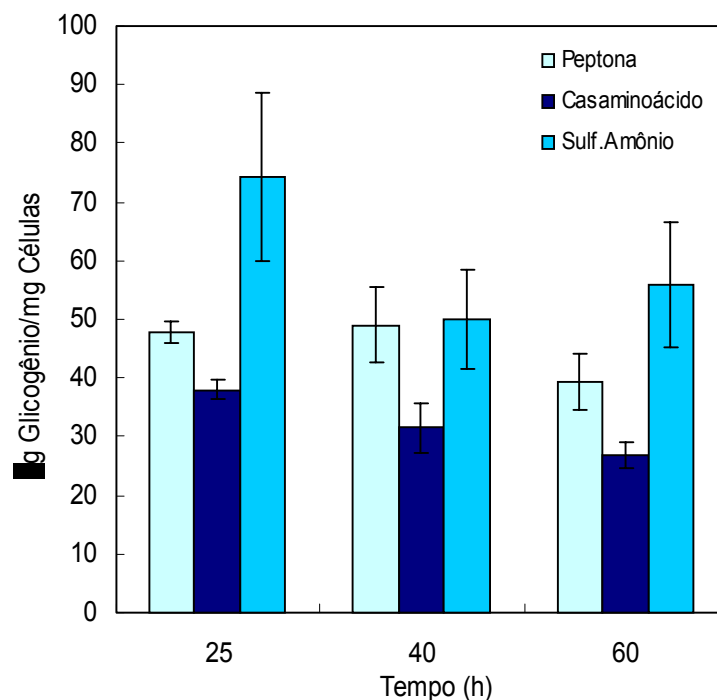


Figura 42. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae* **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de maltose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

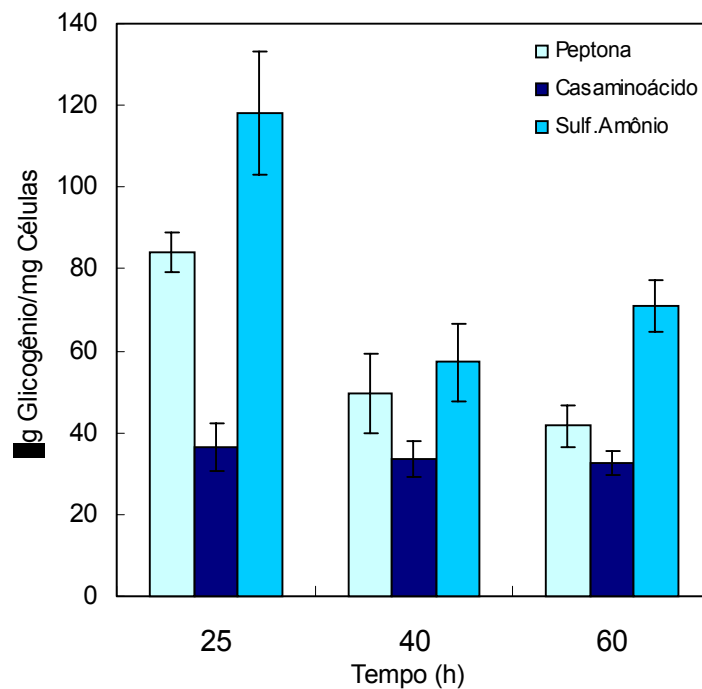


Figura 43. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células *S. cerevisiae* **A3**, durante o crescimento em meio YNB contendo **15% (p/v) maltose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

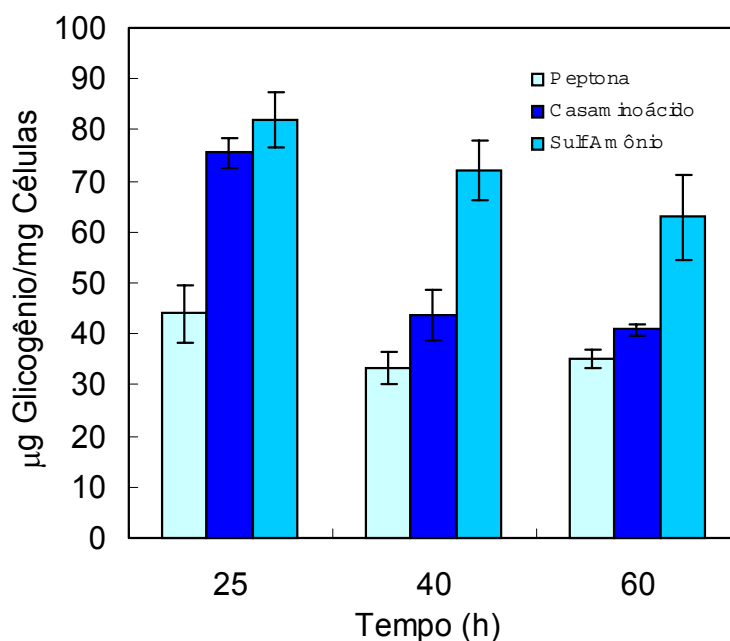


Figura 44. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S. cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de maltose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

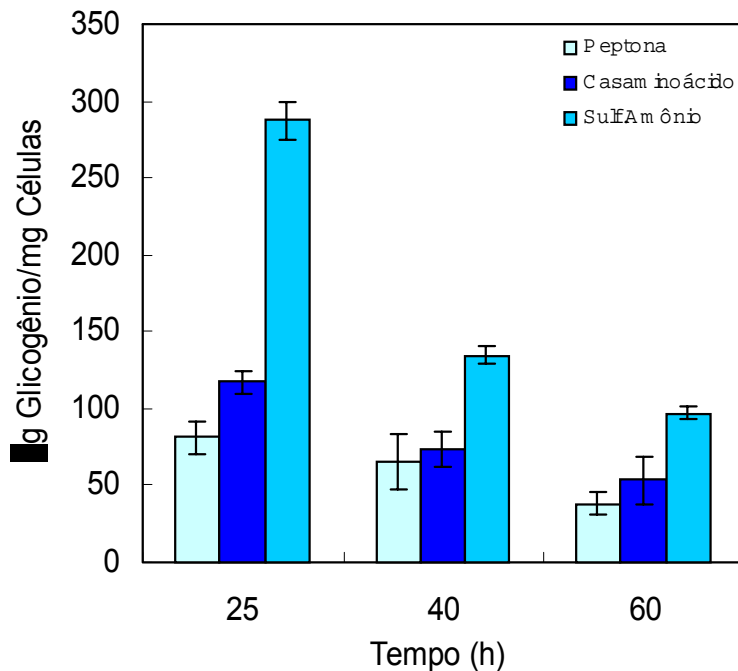


Figura 45. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células *S. cerevisiae* L52, durante o crescimento em meio YNB contendo **15% (p/v) maltose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

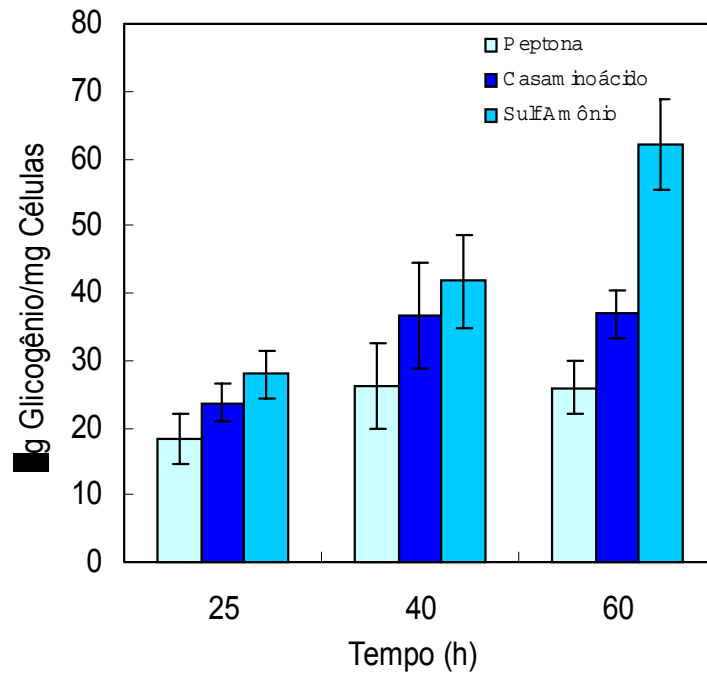


Figura 46. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae Fiso*, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de maltose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

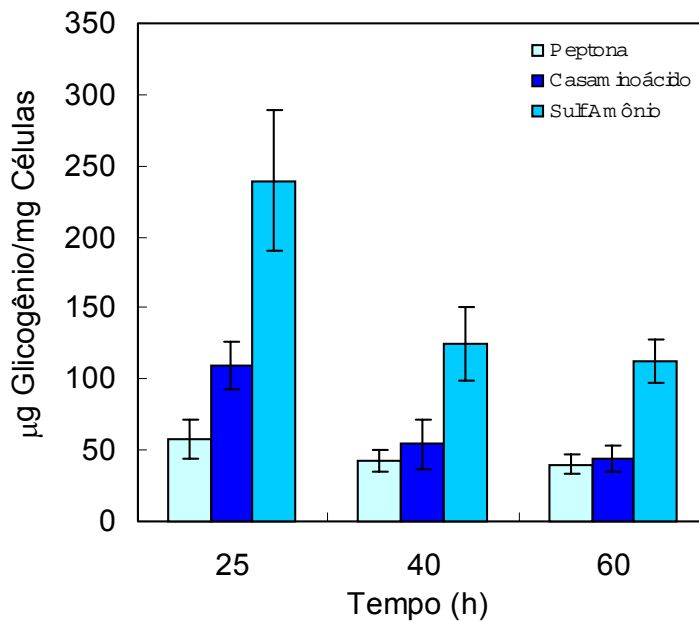


Figura 47. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae Fiso*, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de maltose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

IV.4.3 Perfil dos níveis de glicogênio em células crescidas em galactose

O efeito da complexidade estrutural das fontes de nitrogênio sobre o metabolismo de glicogênio das linhagens A3, L52, Fiso na presença de galactose 2% e 15% (p/v) estão nas figura 48 a 53.

A análise dos perfis da quantidade de glicogênio para todas as linhagens, nos diferentes tempos de cultivo, apresentou característica semelhante à observado em glicose e maltose: a concentração do carboidrato variou, mas foi sempre menor em peptona e maior em sulfato de amônio.

Em concentrações mais altas da fonte de carbono o maior acúmulo deste carboidrato ocorre no meio suplementado com casaminoácidos. Os dados mostrados nas tabelas 4, 5 e 6 mostram, que no geral, em galactose, maior acúmulo de glicogênio acontece em 15% do açúcar, e em 25 horas de cultivo a quantidade de glicogênio é sempre maior que em 60 horas, o que condiz, como já comentado no caso da glicose e maltose, com a função de reserva atribuída a este composto.

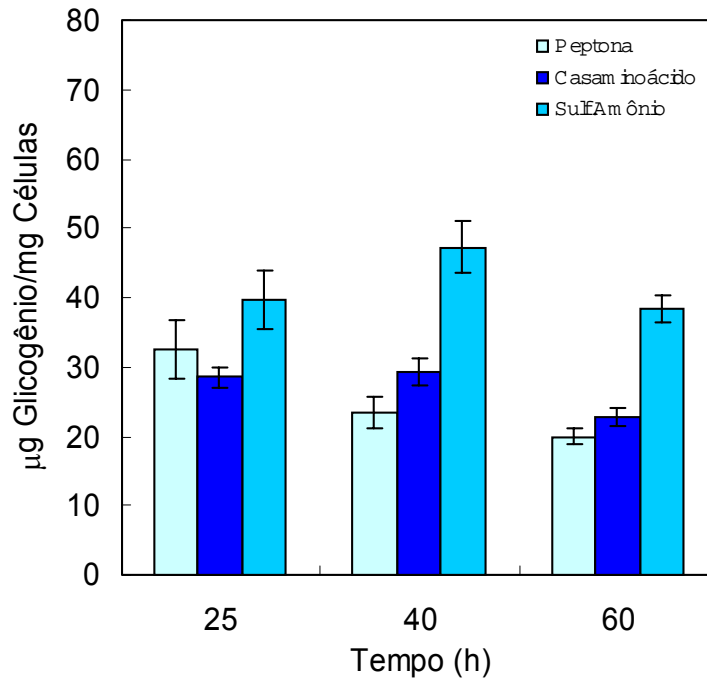


Figura 48. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae* A3, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de galactose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

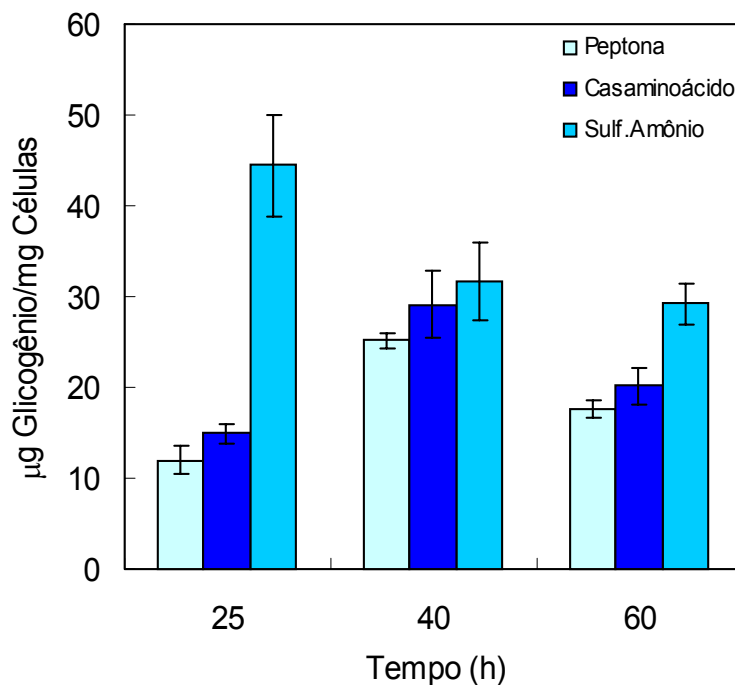


Figura 49. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae* A3, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de galactose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

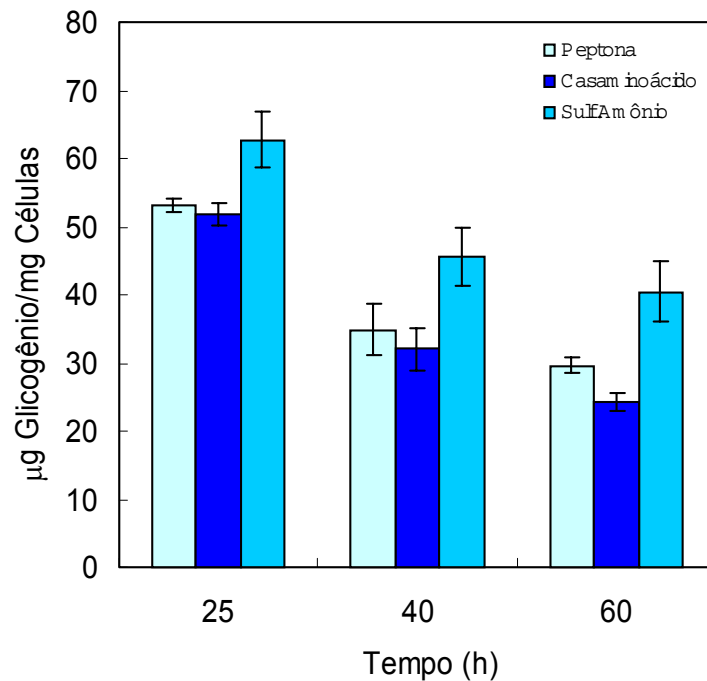


Figura 50. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de galactose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

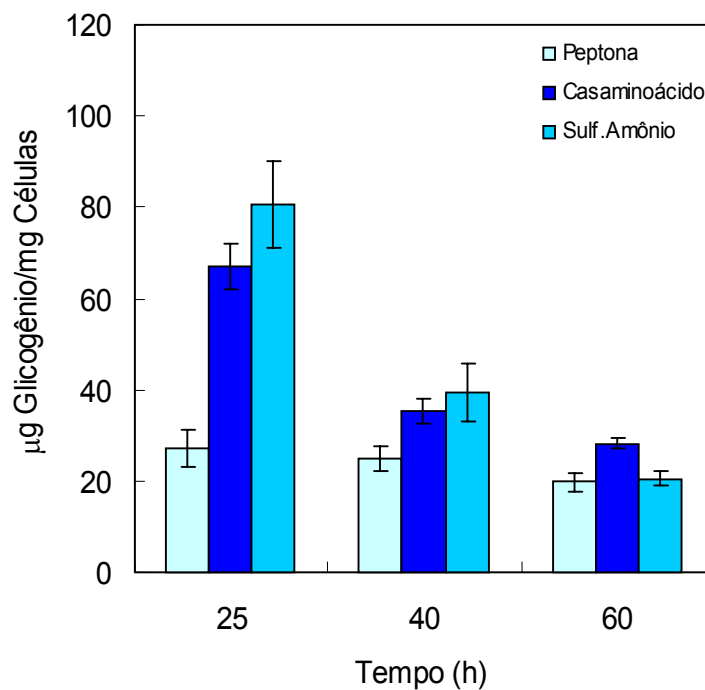


Figura 51. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de galactose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 5,0.

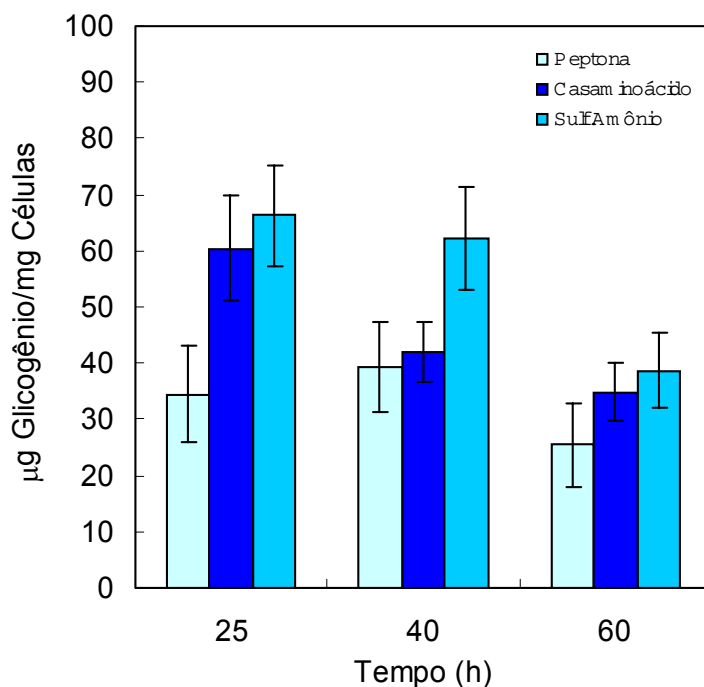


Figura 52. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae* Fiso, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de galactose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 50.

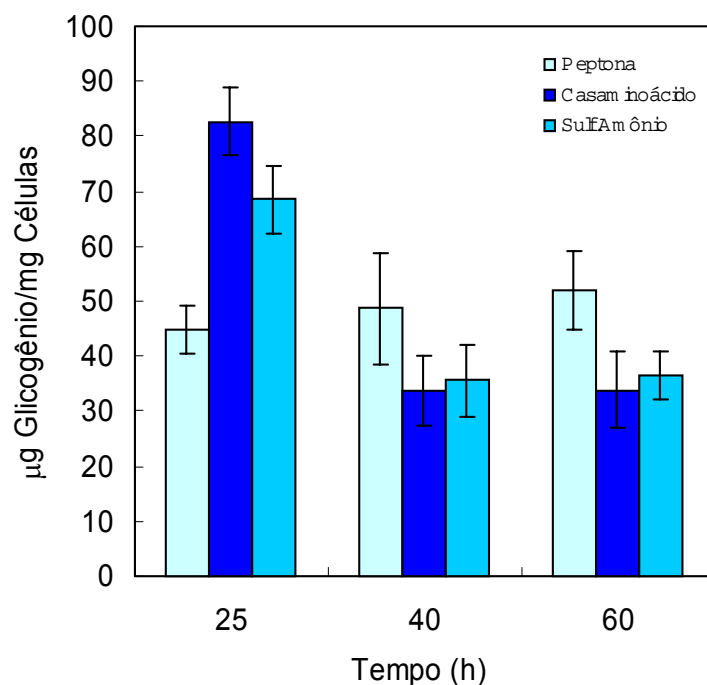


Figura 53. Perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio em células de *S.cerevisiae* Fiso, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de galactose**, suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm, pH inicial 50.

IV.4.4 Perfil dos níveis de trealose em células crescidas em glicose

O efeito da complexidade estrutural das fontes de nitrogênio sobre a produção de trealose pelas linhagens A3, L52 e Fiso quando crescidas em glicose 2% e 15% estão nas figuras 54 a 71, e nas tabelas 4 a 6.

A análise dos perfis da quantidade de trealose para todas as linhagens, no meio com glicose, nos diferentes tempos de cultivo, apresenta a mesma característica: a concentração do carboidrato variou, mas foi sempre menor em peptona e maior em sulfato de amônio. A única exceção é a produção de trealose pela linhagem L52, em glicose 15%. As figuras também mostram que, independente do complemento nitrogenado, a maior produção do carboidrato ocorre após 25 horas de cultivo. Inequivocadamente, os dados das figuras e os das tabelas 6-8 indicam que a linhagem Fiso, de panificação, é aquela que produz menor quantidade de trealose, em glicose; mesmo em condições de estresse fermentativo, como o que ocorre no meio complementado com sulfato de amônio. As linhagens A3 e L52 acumulam quantidades de trealose consideravelmente superiores à linhagem Fiso, e no meio com sulfato de amônio é que fica mais evidente a questão do estresse fermentativo.

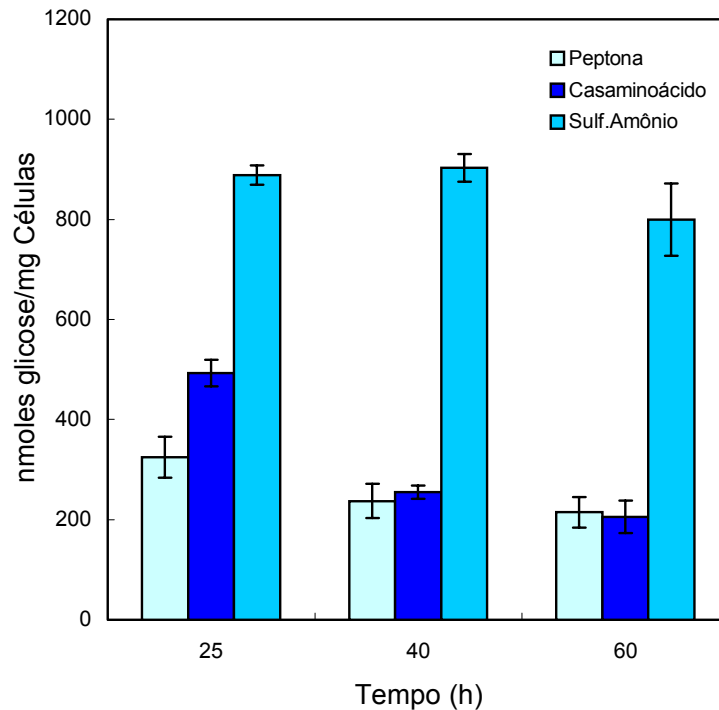


Figura 54. Perfil dos níveis de trealose em células *S.cerevisiae* **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) glicose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

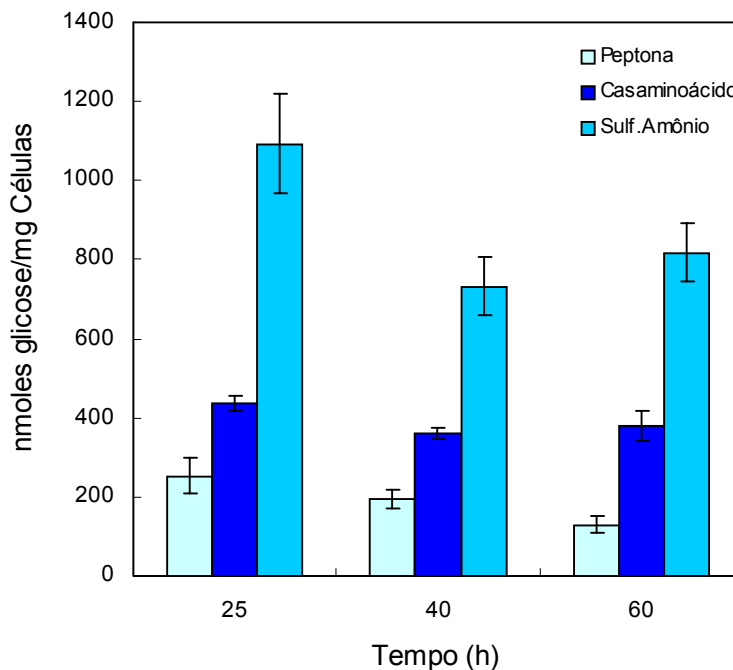


Figura 55. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) glicose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH 5,0.

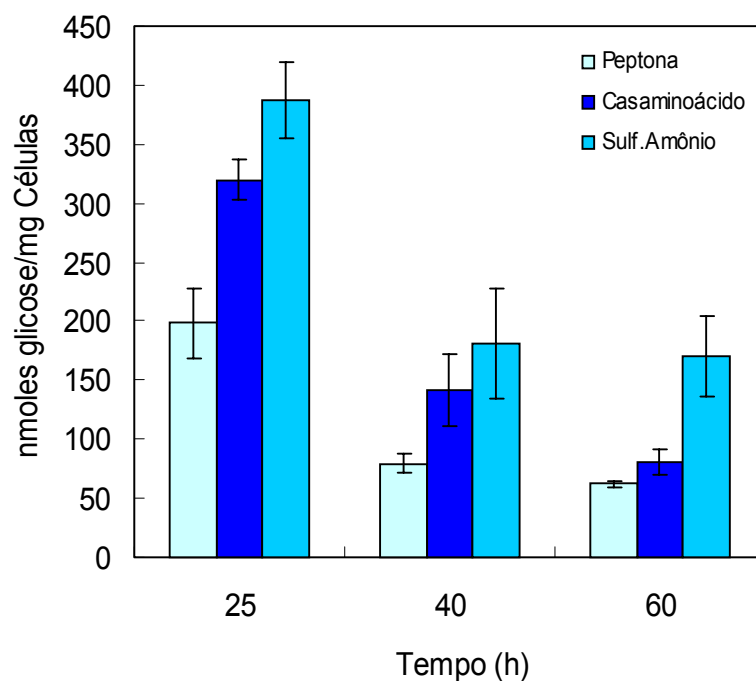


Figura 56. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) glicose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH 5,0.

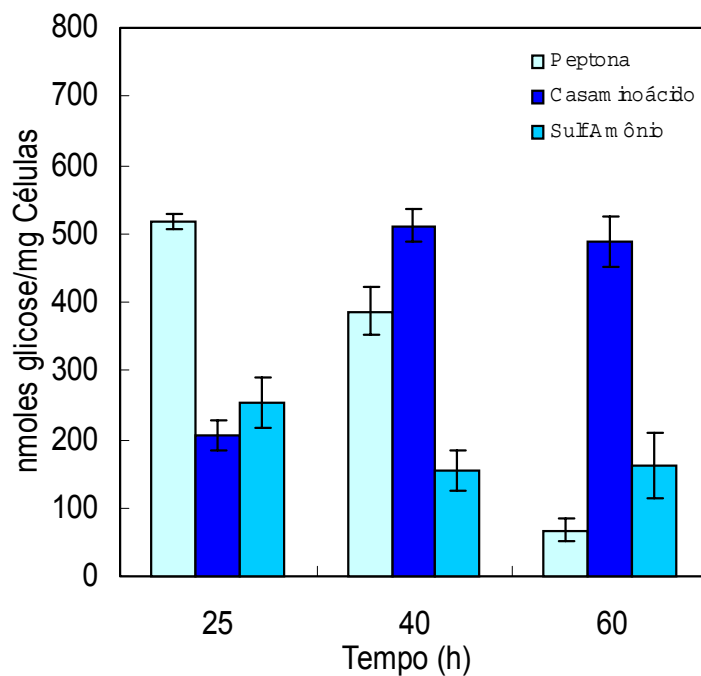


Figura 57. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) glicose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH 5,0.

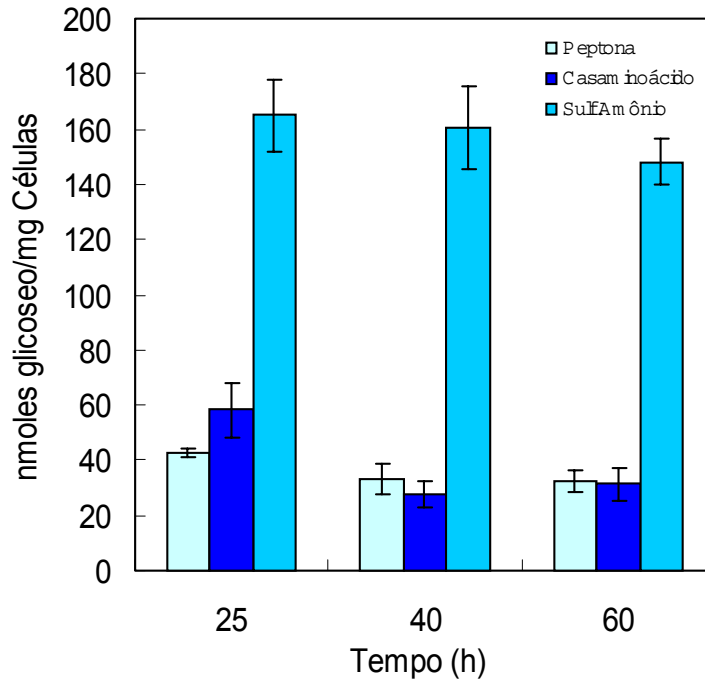


Figura 58. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **Fiso**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) glicose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH 5,0.

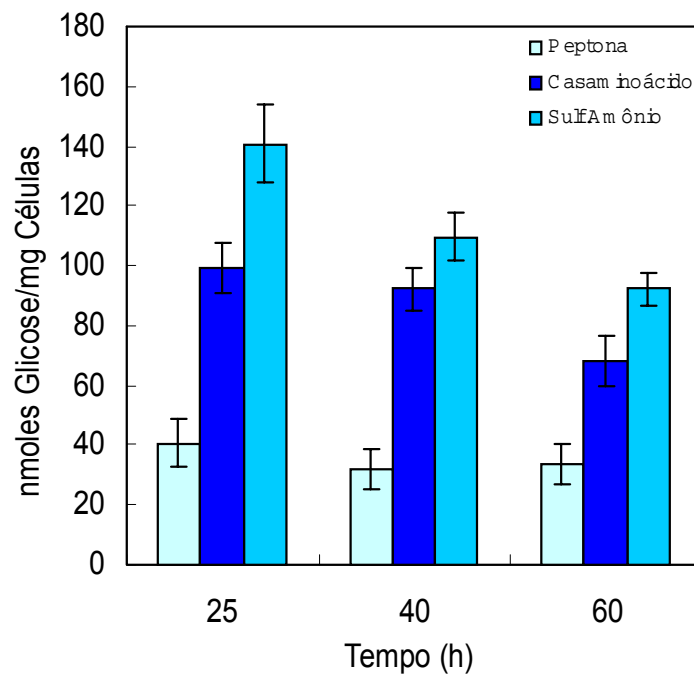


Figura 59. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **Fiso**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) glicose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH 5,0.

IV.4.5. Perfil dos níveis de trealose em células crescidas em maltose

O estudo do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no metabolismo das leveduras crescidas em maltose é importante uma vez que este carboidrato fermentescível está presente em grande quantidade nos mostos de cervejaria, e desta forma é interessante verificar as possíveis interferências deste carboidrato nos níveis de trealose. Através da sua quantificação será possível entender melhor os processos metabólicos diferenciados das leveduras de cervejaria e de panificação, em meios contendo este açúcar e complementados com diferentes fontes de nitrogênio.

Os níveis de trealose das linhagens A3, L52 e Fiso, durante o crescimento em maltose 2% e 15% (p/v), estão mostrados nas figuras 60 a 65 e nas tabelas 4 a 6.

A análise dos perfis da quantidade de trealose, nos diferentes tempos de cultivo, como já observado para o meio com glicose, apresenta a mesma característica: a concentração do carboidrato variou, e foi sempre menor em peptona e maior em sulfato de amônio, exceto para a linhagem A3. Esta linhagem apresenta um comportamento diferenciado na fermentação de maltose (e galactose). Tanto as figuras como as tabelas 4 a 6 mostram que as três linhagens produzem altos níveis de trealose em maltose, principalmente, quando comparada com a linhagem Fiso em glicose.

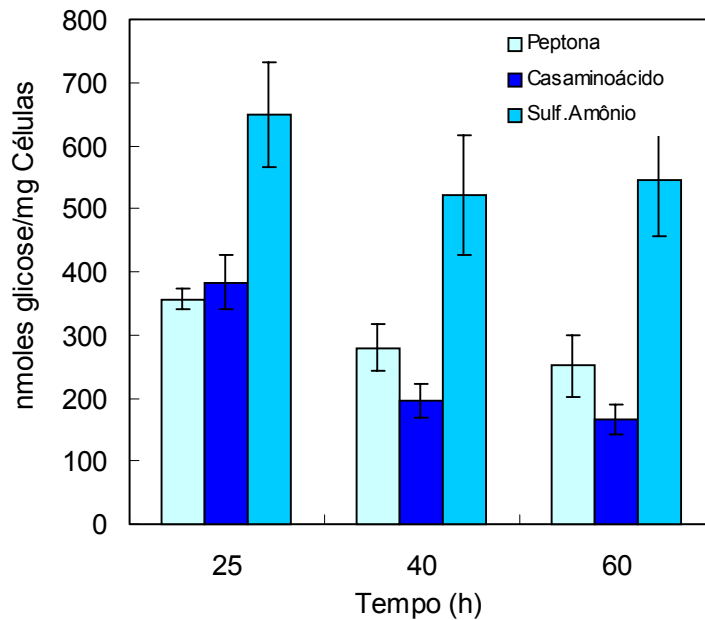


Figura 60. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de maltose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

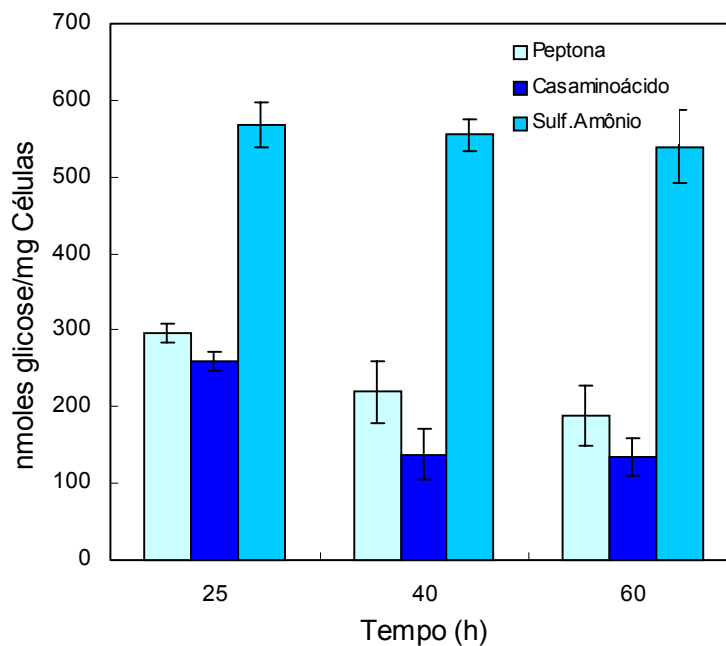


Figura 61. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de maltose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

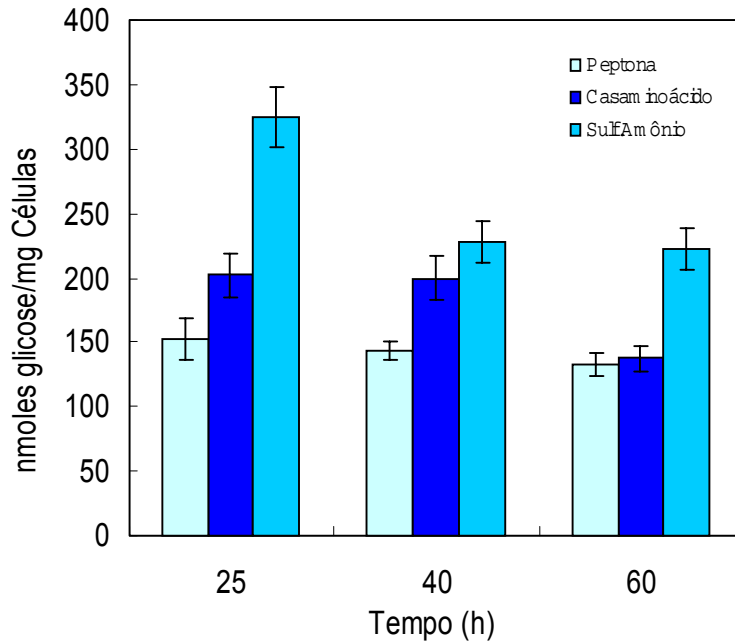


Figura 62. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **L52**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de maltose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

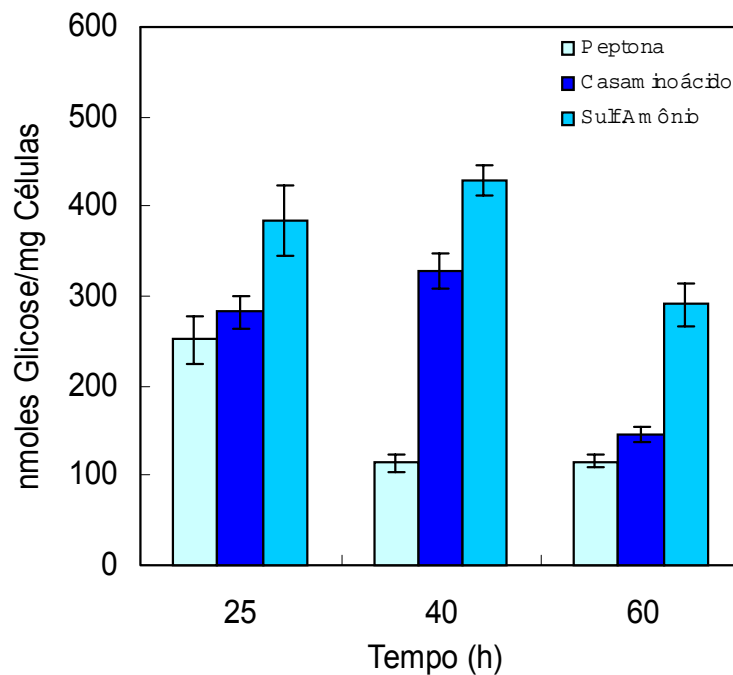


Figura 63. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **L52**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de maltose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

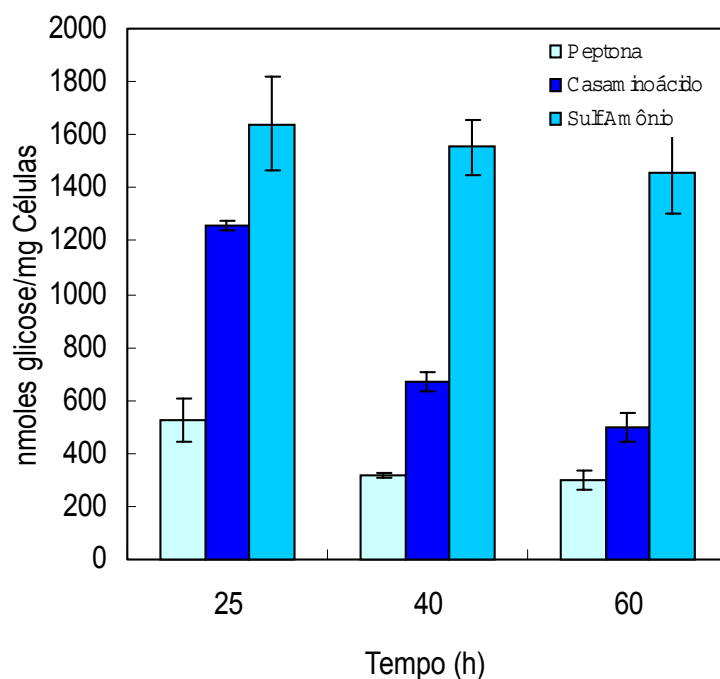


Figura 64. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **Fiso**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de maltose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

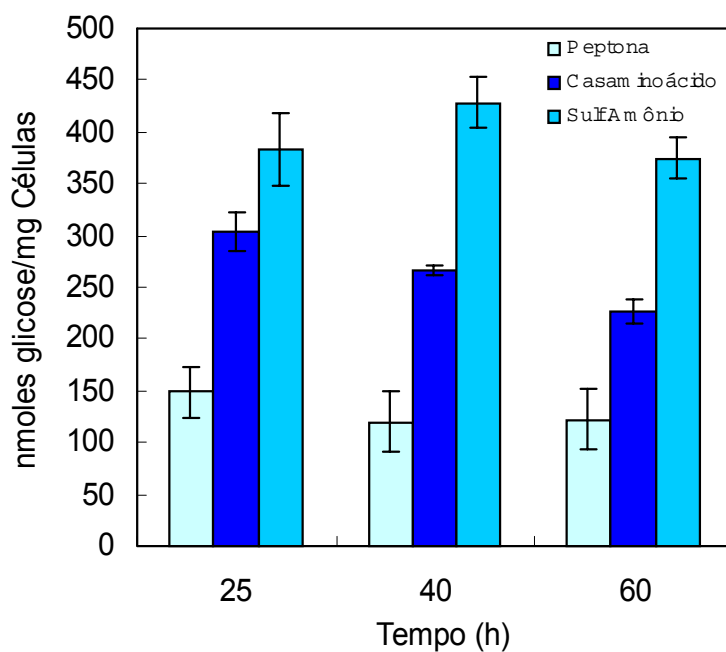


Figura 65. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **Fiso**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de maltose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

IV.4.6. Perfil dos níveis de trealose em células crescidas em galactose

O efeito da complexidade estrutural das fontes de nitrogênio sobre o a produção de trealose pelas linhagens A3, L52 e Fiso quando crescidas em galactose 2% e 15% estão nas figuras 66 a 71 e nas tabelas 4 a 6.

A análise dos perfis da quantidade de trealose, nos diferentes tempos de cultivo em galactose, apresenta características diferentes daquelas observadas em glicose e maltose: somente para a linhagem A3 (galactose 2% e 15%) observa-se o padrão no qual a complementação com peptona é sempre menor e sulfato de amônio maior. Este mosaico de variação de concentração de trealose pode ser uma indicação da resposta metabólica da levedura e de estresse fermentativo aos diferentes açúcares. Cumpre salientar que as maiores concentrações de trealose produzidas sempre ocorreram do meio suplementado com sulfato de amônio, situação indutora de condições de fermentação menos favorável, isto é, com maior estresse fermentativo.

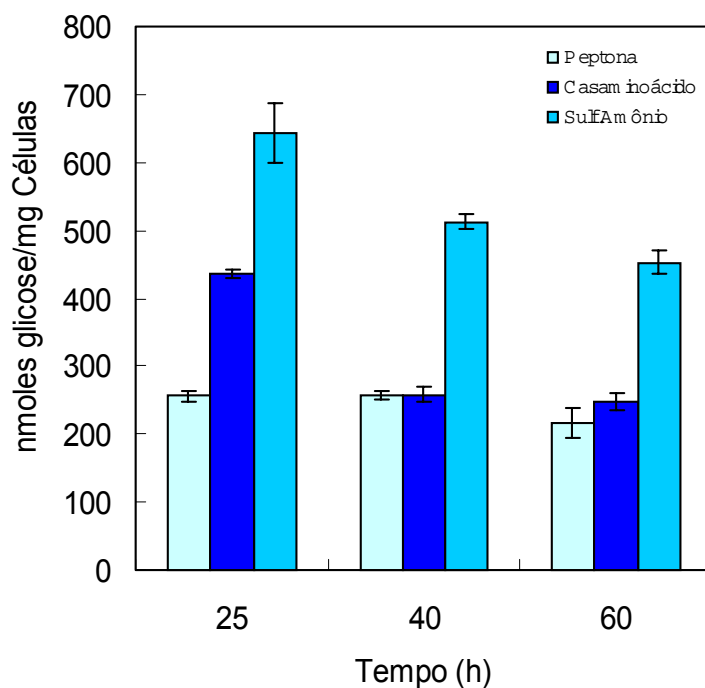


Figura 66. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de galactose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

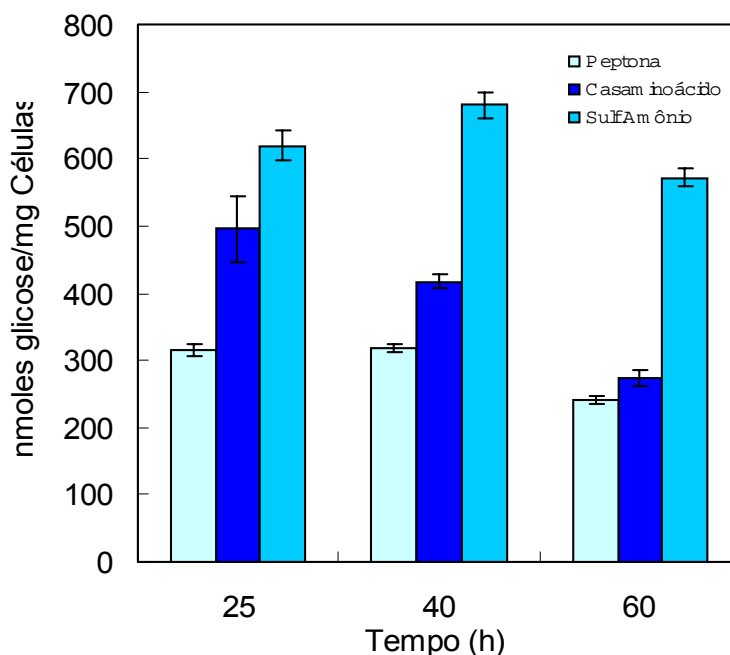


Figura 67. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **A3**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de galactose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

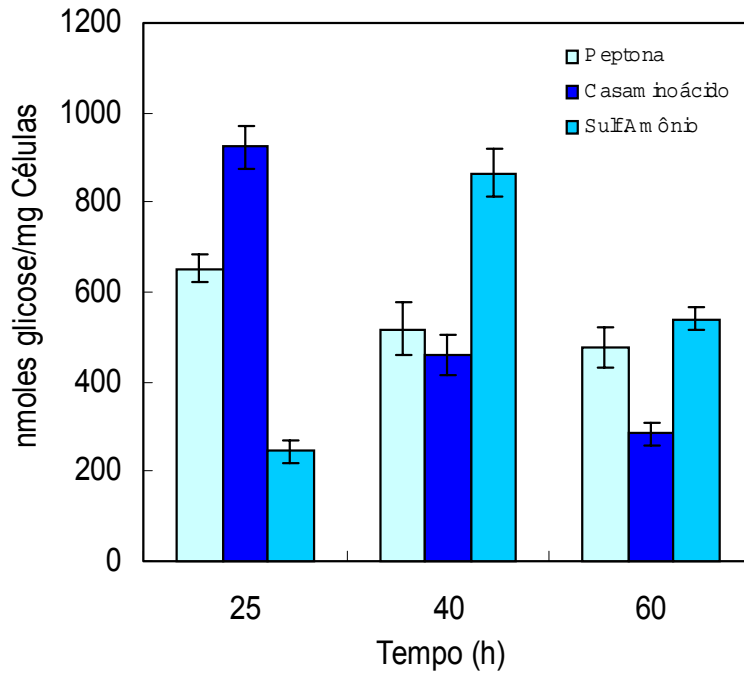


Figura 68. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de galactose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

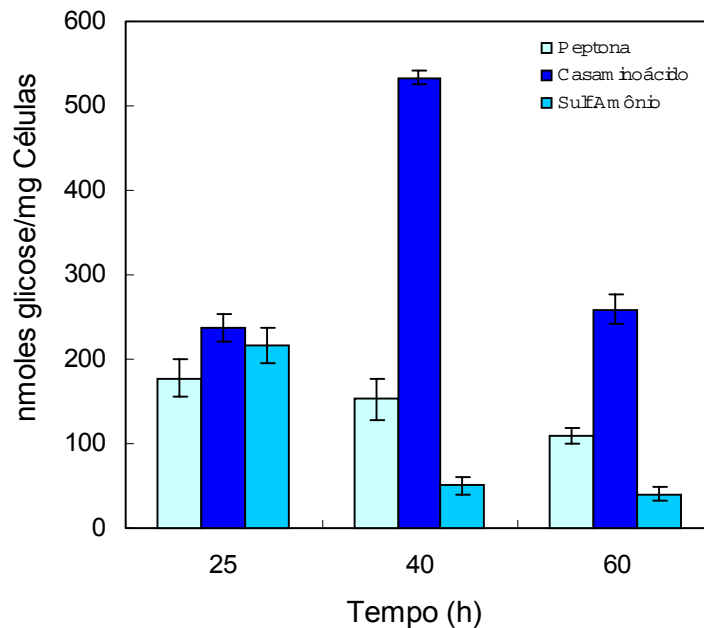


Figura 69. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* L52, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de galactose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

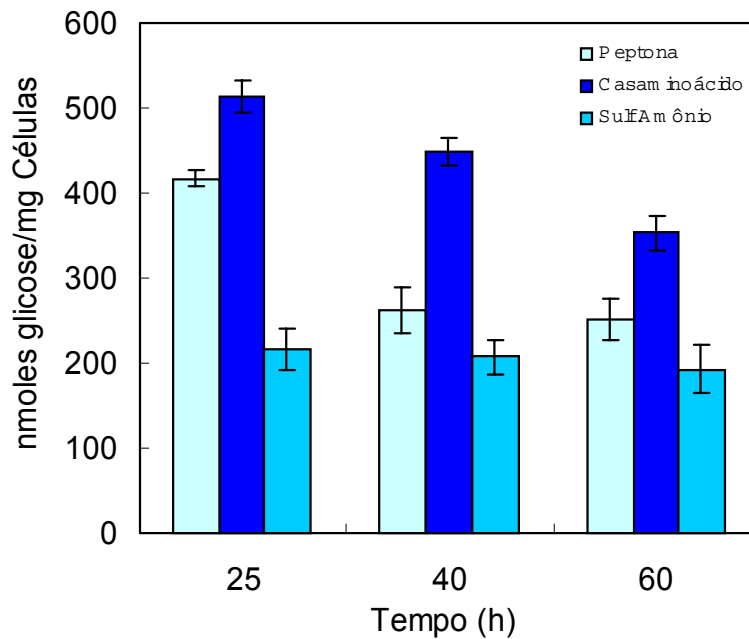


Figura 70. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **Fiso**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **2% (p/v) de galactose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

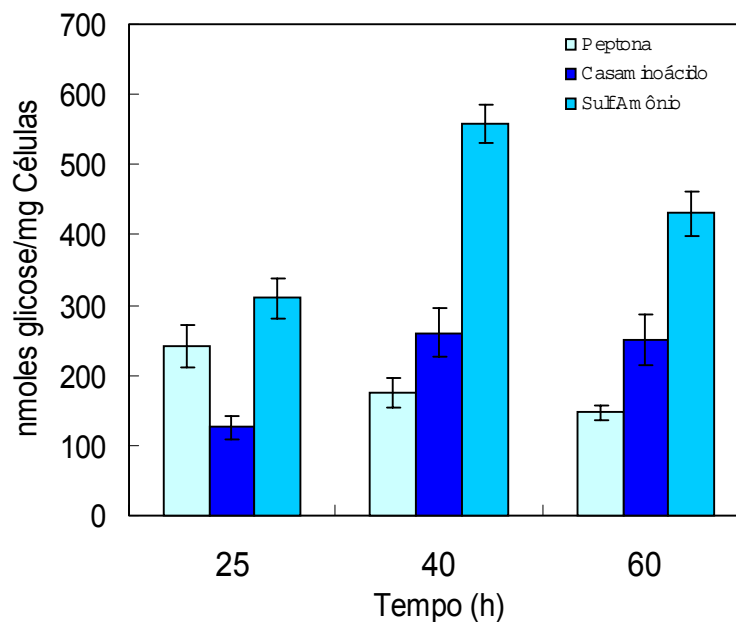


Figura 71. Perfil dos níveis de trealose em células de *S.cerevisiae* **L52**, durante o crescimento aeróbico em meio YNB contendo **15% (p/v) de galactose** suplementado com 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

IV.4.7. Influência da fonte de carbono e nitrogênio no acúmulo dos níveis de glicogênio e trealose em células de levedura.

Sabe-se que mudanças na concentração de um nutriente essencial durante o crescimento de um organismo leva a um ajuste permanente da maquinaria genética e metabólica da célula (FRANCOIS & PARROU 2001, SCHNEPER *et al.*, 2004), e em *Saccharomyces cerevisiae* ajustes metabólicos interferem diretamente nas quantidades de glicogênio e trealose. As tabelas 4, 5 e 6, respectivamente, mostram que as quantidades de glicogênio e trealose produzidas após de 25 e 60 horas do crescimento pelas linhagens A3, L52 e Fiso em meio YNB contendo as fontes de carbono glicose, maltose e galactose nas concentrações de 2% e 15%, e suplementadas com diferentes fontes nitrogenadas (peptona, casaminácidos e sulfato de amônio). As concentrações dos carboidratos variam e estão de acordo com as informações descritas na literatura, que relatam uma grande variação nas suas concentrações, em resposta a diferentes condições de cultivo, tanto ao que se refere aos parâmetros físico-químicos (ex. temperatura e osmolaridade) quanto a questões de deficiências nutricionais (FRANCOIS & PARROU, 2001).

Um aspecto interessante de ser observado é como a produção destes carboidratos varia para diferentes linhagens, e é com a trealose que se observa maiores diferenças. Além do que já foi comentado sobre as características dos perfis da produção dos carboidratos em diferentes tempos de cultivo e do efeito da fonte de nitrogênio, se observa que a produção de trealose, em glicose, pela linhagem Fiso é muito inferior à produzida por A3 e L52. Entretanto em maltose, a linhagem Fiso produz mais trealose que as linhagens cervejeiras. Este fenômeno é particularmente mais acentuado na concentração de glicose 2% (p/v), independente da fonte nitrogenada.

A produção de glicogênio é baixa nos meios complementados com peptona e casaminoácidos e o menor acúmulo de glicogênio é observado, para as três linhagens, no meio contendo galactose.

Tabela 4 - Efeito das diferentes fontes de carbono e nitrogênio no perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio e trealose.

Fonte de nitrogênio Peptona													
Linhagens	A3				L52				Fiso				
	Glicogênio (μg glicose)		Trealose (nmoles glicose)		Glicogênio (μg glicose)		Trealose (nmoles glicose)		Glicogênio (μg glicose)		Trealose (nmoles glicose)		
Tempo (h)	25	60	25	60	25	60	25	60	25	60	25	60	
Glicose 2%	61	49	325	214	60	28	198	61	104	56	42	32	
Glicose 15%	39	38	253	129	65	39	518	67	85	50	40	33	
Maltose 2%	47	39	356	250	43	35	152	132	18	25	527	296	
Maltose 15%	84	41	295	188	81	37	251	116	57	40	148	121	
Galactose 2%	32	19	256	216	53	29	652	476	34	25	417	251	
Galactose 15%	12	17	314	240	27	19	177	109	44	52	241	146	

Tabela 5 – Efeito das diferentes fontes de carbono e nitrogênio no perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio e trealose.

Fonte de nitrogênio Casaminoácidos												
Linhagens	A3				L52				Fiso			
	Glicogênio (μg glicose)		<i>Trealose</i> (nmoles glicose)		Glicogênio (μg glicose)		Trealose (nmoles glicose)		Glicogênio (μg glicose)		Trealose (nmoles glicose)	
Tempo (h)	25	60	25	60	25	60	25	60	25	60	25	60
Glicose 2%	66	44	492	205	84	41	319	81	119	74	58	31
Glicose 15%	49	45	438	380	99	88	204	488	105	123	140	92
Maltose 2%	38	26	383	167	75	40	202	137	23	36	1.258	498
Maltose 15%	36	32	259	134	117	53	282	145	109	43	303	227
Galactose 2%	28	22	434	248	51	24	922	283	60	34	513	353
Galactose 15%	14	20	495	274	66	28	236	258	82	33	126	250

Tabela 6 - Efeito das diferentes fontes de carbono e nitrogênio no perfil dos níveis de acúmulo de glicogênio e trealose.

Fonte de nitrogênio Sulfato de Amônio												
Linhagens	A3				L52				Fiso			
	Glicogênio (μg glicose)		Trealose (nmoles glicose)		Glicogênio (μg glicose)		Trealose (nmoles glicose)		Glicogênio (μg glicose)		Trealose (nmoles glicose)	
Tempo (h)	25	60	25	60	25	60	25	60	25	60	25	60
Glicose 2%	121	64	888	799	90	60	386	170	347	197	164	147
Glicose 15%	134	75	1.092	818	239	135	254	161	227	132	140	92
Maltose 2%	74	55	649	543	82	62	324	222	27	61	1.639	1.454
Maltose 15%	118	70	568	539	287	97	384	290	291	128	383	374
Galactose 2%	39	38	643	452	62	40	244	540	66	38	216	192
Galactose 15%	44	29	619	572	80	20	215	40	68	36	309	430

Discussão

ESTUDOS REALIZADOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO NO DESEMPENHO FERMENTATIVO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS

Considerando que a maioria dos meios industriais contém açúcares e compostos nitrogenados com composição estruturalmente complexa (MORENO-ARRIBAS *et al.* 2002; STEWART & RUSSELL, 1998), os estudos apresentados nesta tese sobre o efeito da fonte de nitrogênio no metabolismo de leveduras industriais foram realizados empregando meios que continham um açúcar como fonte de carbono, e compostos nitrogenados com diferentes níveis de complexidade estrutural. As fontes de nitrogênio variaram de um simples sal de amônio (sulfato de amônio) a hidrolisados ácidos de proteínas (casaminoácidos) constituídos predominantemente de aminoácidos na forma livre, e hidrolisado enzimático de proteínas (peptona) com predominância de peptídeos. Como fonte de carbono foram utilizados os açúcares glicose, galactose e maltose em concentrações de 2% e 15% (p/v), com o objetivo de submeter as células de levedura a diferentes condições metabólicas: baixo e alto nível de repressão catabólica.

Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio tem um forte impacto no metabolismo fermentativo de leveduras industriais (CRUZ *et al.*, 2002, CRUZ *et al.*, 2003). Foi observado que o acúmulo de biomassa e a produção de etanol, além da dependência da natureza do suplemento nitrogenado, também sofria forte influência do tipo e da concentração do açúcar. Os estudos iniciais foram desenvolvidos de maneira mais completa com uma linhagem de panificação e em meios contendo glicose e maltose como fonte de carbono. Em baixas concentrações de glicose e maltose (2%, p/v) foi observado um perfil de crescimento diáuxico. Para a mesma linhagem a produção de biomassa era aproximadamente a mesma para os meios complementados com casaminoácidos e peptona. Na presença de sulfato de amônio, o açúcar era convertido em etanol e este utilizado muito vagarosamente pela levedura. Em concentrações mais altas de açúcar, a diauxia não era facilmente observada, e a transição do metabolismo fermentativo para o oxidativo acontecia mais rapidamente na complementação com peptona. Na suplementação com casaminoácidos observou-se uma mudança drástica no desempenho fermentativo das leveduras, e o tempo para a transição metabólica fermentativo-oxidativo aumentou com a concentração de glicose, concomitantemente com a diminuição da produção de biomassa, resultando na extinção da segunda fase de crescimento. Estes efeitos sobre a produção de biomassa e etanol assemelham-se

aqueles atribuídos á fermentações problemáticas observados na produção de cervejas e de vinhos, conhecidas como “stuck fermentation” (incompleta) ou “sluggish fermentation” (demasiadamente longa) (ALEXANDRE e CHARPENTIER, 1998; BISSON, 1999).

O estudo da fermentação de galactose mostrou que leveduras de cervejaria (A3 e L52) e de panificação (Fiso) fermentavam galactose diferentemente, e que a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio induziam padrões diferenciados de utilização de galactose 15% (p/v), tendo forte impacto na conversão do açúcar a etanol (Figuras 13 e 14) (CRUZ *et al.*, 2002). Em baixa concentração de galactose observa-se a diauxia, como já descrito para glicose e maltose. Entretanto, nos estudos com galactose 15% (p/v) a linhagem A3 apresenta crescimento considerável nos meios com casaminoácidos e peptona, mas a linhagem só é capaz de produzir altas concentrações de etanol no meio complementado com casaminoácidos. A linhagem Fiso também tem melhor desempenho fermentativo no meio com casaminoácidos, e o consumo de galactose e produção de etanol mais limitado no meio complementado com peptona. A peptona é o complemento nitrogenado que propicia melhor desempenho a linhagem L52. Os resultados com galactose foram associados a respostas das diferentes linhagens industriais ao fenômeno de repressão catabólica exercido pelos açúcares.

Os estudos do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio na fermentação de glicose e maltose foram continuados com leveduras de cervejaria (linhagens A3 e L52) e de vinícola (VIN7 e VIN13). Alto rendimento celular foi obtido para todas as linhagens nos meios contendo glicose e maltose e complementados com peptona e casaminoácidos (Figuras 3 a 10 e tabelas 1 e 2). Entretanto foi na concentração de 15% (p/v) que os efeitos da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio foram mais acentuados. As linhagens L52 e VIN7 apresentaram crescimento e produção de etanol próximos nos meios com maltose e suplementados com peptona e casaminoácidos (Figuras 20 e 21). Altas concentrações de biomassa e de etanol pelas linhagens A3 e VIN13 foram obtidas apenas no meio contendo casaminoácidos (Figuras 19 e 22). Na fermentação de glicose 15% (p/v), para as quatro linhagens, peptona foi a fonte de nitrogênio que propiciou melhor desempenho fermentativo, com alta produção de biomassa e etanol, e ainda preservando a viabilidade celular (Figuras 7 e 10).

Os resultados mais intrigantes foram os obtidos com as linhagens A3 e VIN13 no meio contendo maltose e suplementado com peptona, onde se observou uma alteração drástica no perfil de utilização de maltose: a levedura utilizou o açúcar para crescer, mas não foi capaz de produzir etanol. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com galactose para a linhagem A3. A suplementação com sulfato de amônio sempre propiciaram desempenhos fermentativos inferiores aos obtidos com peptona e casaminoácidos. Cumpre salientar que a complementação com sulfato de amônio sempre causa uma acidificação acentuada do meio de cultivo. Entretanto, estudos nos quais o pH dos meios foi mantido durante o período de cultivo também mostraram que a complementação com sulfato de amônio é inferior (CRUZ *et al.*, 2001).

Para as indústrias de produção de cerveja e vinho a presença de quantidades adequadas dos constituintes utilizados como fontes de carbono e de nitrogênio é considerado um importante fator para se completar uma fermentação industrial e que também contempla as qualidades desejadas do produto, seja ele vinho ou cerveja (GARDNER *et al.*, 2005; MANGINOT *et al.*, 1998; STEWART & RUSSELL, *et al.* 1998). A fração nitrogenada assimilável, além de suprir as necessidades fisiológicas da levedura, contribui e muito para a síntese de sub-produtos que determinam o sabor e o aroma das bebidas. De outro lado, a fração não assimilável tem impacto da estabilidade microbológica e na determinação da aparência do produto (MORENO-ARRIBAS *et al.*, 2002, STEWART & RUSSELL, 1998). Apesar de se reconhecer importância da composição dos constituintes nitrogenados nos meios industriais e o impacto no processo fermentativo e na qualidade da bebida, pouco tem sido feito no sentido de se observar o efeito da complexidade do meio de cultura, sendo que maior atenção tem sido dedicada à utilização da fonte de carbono (MORENO-ARRIBAS *et al.*, 2002, STEWART & RUSSELL, 1998). A falta de informações mais detalhadas da importância de peptídeos na fermentação de mostos de cervejaria e de vinícolas se deve às dificuldades de isolamento e de análises de misturas muito complexas. Só para se ter uma idéia da complexidade da composição destes meios de cultura, estima-se que em meio de produção de cerveja exista em torno de 400 dipeptídeos e 8000 tripeptídeos, além de outros compostos nitrogenados (PATTERSON & INGLEDEW, 1999a).

Muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de se elucidar a importância da composição de aminoácidos e de peptídeos no processo fermentativo e no sabor e aroma das bebidas e também da cinética de utilização de aminoácidos e peptídeos

pelas leveduras durante o processo fermentativo (CALDERBANK *et al.*, 1985; CLAPPERTON, 1971; JONES *et al.*, 1969; PATTERSON & INGLEDEW 1999a; PATTERSON & INGLEDEW 1999b; THORNE, 1933; THORNE, 1941; THORNE, 1949). Os aminoácidos e peptídeos menores são utilizados por leveduras. Os aminoácidos na forma livre são incorporados diretamente sem modificação nas proteínas, ou são degradados e o nitrogênio é usado na síntese de outros constituintes nitrogenados e o derivado ceto-ácido também pode ser utilizado em processo biosintéticos (LARGE, 1986). Foi observado que a assimilação de diferentes aminoácidos segue uma ordem de remoção, o que permite até a classificação dos aminoácidos em grupos (PIERCE, 1987). Pouco se sabe sobre a diversidade estrutural dos peptídeos presentes nos meios industriais ou a ordem de remoção dos diferentes peptídeos do mosto de fermentação (CALDERBANK *et al.*, 1985, CLAPPERTON, 1971; HICKMAN & BUCKEE, 1982; YOKATA *et al.*, 1993).

A carência nutricional de compostos nitrogenados assimiláveis em mostos industriais é um problema comum em indústrias de fermentação, e a adição de suplemento nutricional à base de amônio é uma prática usual como forma de se superar a possibilidade de problemas durante a fermentação industrial (a ocorrência de “sluggish ou stuck fermentation”) (CASEY *et al.*, 1984; GARDNER, *et al.*, 2005; MANGINOT *et al.*, 1998). Na indústria cervejeira as primeiras manifestações de preocupação com a deficiência nutricional de mostos aconteceram com a introdução da prática de fermentação com mostos de concentrados (“high gravity brewing”) (CASEY *et al.*, 1984; STEWART & RUSSELL, 1998). Nas primeiras tentativas de fermentação de mostos concentrados, os fatores que levaram a ocorrência de fermentações incompletas foram atribuídos principalmente aos seguintes fatores: efeito tóxico do etanol, efeito inibitório induzido por alta pressão osmótica e alteração no perfil nutricional do mosto (CASEY & INGLEDEW, 1986). A adição aos mostos concentrados de complexos lipídicos e compostos nitrogenados (peptona, extrato de levedo, aminoácidos e misturas), evitaram a ocorrência de fermentação incompleta, permitindo assim a produção de níveis mais elevados de etanol e a manutenção da viabilidade celular (CASEY *et al.*, 1983). A ocorrência de fermentações problemáticas na indústria de vinhos é um fenômeno comum, e uma forma de evitá-las é através da adição de suplemento nitrogenado, como sais de amônio (BELTRAN *et al.*, 2005; MANGINOT *et al.*, 1998; MENDES-FERREIRA *et al.*, 2004).

Ainda não conhecemos os mecanismos moleculares responsáveis pelas alterações nos parâmetros fermentativos induzidos pela complexidade estrutural da fonte de nitrogênio descritas neste e em trabalhos anteriores (CRUZ *et al.*, 2002, CRUZ *et al.*, 2003). Os resultados obtidos e baixa concentração de açúcar (2% p/v) com glicose, galactose e maltose, na presença de peptona e casaminoácidos sugerem que as duas fontes de nitrogênio propiciam condições favoráveis para o crescimento celular. Alterações nos perfis dos parâmetros fermentativos são observados em altas concentrações de açúcares (15% p/v), onde o efeito da repressão catabólica é mais intenso. Para a glicose, considerada um açúcar repressor, no geral, a peptona é a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento celular e fermentação. Na presença de maltose e galactose, açúcares que sofrem a repressão pela glicose, casaminoácidos induz melhores condições de fermentação para as linhagens A3 e VIN13 (maltose) e linhagem Fiso (galactose). De outro lado, para as linhagens L52 e VIN7 a complementação com peptona é que propicia as melhores condições de fermentação de galactose e maltose.

Casaminoácidos é uma preparação comercial com a predominância de aminoácidos na forma livre, resultante da hidrólise ácida de proteínas; enquanto que a peptona também é um produto comercial com predominância de aminoácidos na forma de peptídeos, resultante da hidrólise enzimática de proteínas (FARREL *et al.*, 1993, CRUZ *et al.*, 2002). Assim, o desempenho fermentativo das linhagens dependerão da capacidade transporte destas diferentes fontes de nitrogênio através da membrana plasmática. O transporte de aminoácidos envolve a participação de permeases específicas para certos aminoácidos e uma permease geral de aminoácidos de menor especificidade (HORÁK, 1997). A utilização de compostos nitrogenados de fontes complexas acontece devido a uma combinação de um conjunto de permeases, suas especificidades, e ainda os efeitos de retroinibição induzido pela concentração e composição do aminoácidos intracelulares (STEWART & RUSSELL, 1998).

As leveduras apresentam limitações em secretar enzimas proteolíticas e por isso os aminoácidos e peptídeos presentes em casaminoácidos e peptona entram nas células como peptídeos, processos mediados através de permeases de peptídeos. Assim, a utilização de peptídeos também depende da habilidade da célula de transportar peptídeos por permeases que são proteínas diferentes das envolvidas no transporte de aminoácidos (STEINER *et al.*, 1995).

Resultados já publicados indicaram que aminoácidos, livres e na forma de peptídeos, presente em peptona e casaminoácidos são utilizados por leveduras (CRUZ *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que tanto peptona como casaminoácidos são boas fontes nitrogenadas para o crescimento de leveduras. O comportamento metabólico diferenciado observado em altas concentrações de açúcar e a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio, em correlação com a intensidade da repressão catabólica induzida pela fonte de carbono, são, em parte, responsáveis pelos efeitos descritos nesta tese, e também, uma indicação de que a interação mútua entre a fonte de carbono e de nitrogênio deve exercer alguma influência no processo. Cumpre salientar que somente nos últimos anos é que o tema envolvendo a mútua interação entre as fontes de carbono e nitrogênio foram publicados (ter SCHURE *et al.*, 1995; ter SCHURE *et al.*, 2000; SCHNEPER *et al.*, 2004), incluindo a recente publicação que preconiza a regulação da atividades de aminoácidos permeases pelo mecanismo de repressão catabólica (PETER *et al.*, 2006).

A capacidade diferenciada de utilização dos peptídeos pelas linhagens industriais pode ser um dos fatores a promover alteração no perfil metabólico das leveduras industriais. Para abordar este aspecto foram planejados dois tipos de experimentos: aumento na concentração da fonte nitrogenada, e utilização da fração peptídica isolada de peptona por diferentes linhagens industriais. Foi observada que as linhagens apresentam diferentes capacidade de crescimento em peptídeos, sendo que a linhagem Fiso, é que produziu maior acúmulo de biomassa quando crescida na presença de peptídeos como fonte de nitrogênio. Esta parte do trabalho ainda não foi concluída, mas os resultados obtidos indicam que não é só a capacidade de utilização de aminoácidos na forma de peptídeos que determinam as alterações no comportamento fermentativo das leveduras industriais.

Os resultados descritos nesta tese e em estudos anteriores (CRUZ *et al.*, 2002; CRUZ *et al.*, 2003) mostraram alterações nos perfis de utilização de glicose, maltose e galactose por leveduras industriais, com efeitos acentuados na produção de biomassa e etanol, e que este comportamento foi influenciado pela complexidade estrutural da fonte de nitrogênio. A fermentação incompleta de açúcares e os efeitos sobre a produção de biomassa e etanol, e também sobre a viabilidade celular assemelham-se aqueles descritos quando o corre o que se convencionou chamar de sluggish/stuck fermentation, nos processo de produção de cervejas e vinhos (ALEXANDRE & CHARPENTIER, 1998; BISSON, 1999). Estes resultados têm importância acadêmica e

aplicada na medida em que sugerem que não só a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio, mas também a resposta metabólica da levedura a repressão catabólica tem forte influência no desempenho de leveduras industriais. Assim, é de se esperar que em *Saccharomyces cerevisiae* os mecanismos de controle de utilização de uma fonte de nitrogênio estruturalmente mais complexas não são os mesmos de fontes estruturalmente mais simples, e que a mútua interação entre as fontes de carbono e de nitrogênio, incluindo os mecanismos envolvidos na repressão induzida por açúcares e nitrogênio devem desempenhar importantes efeitos nos processo de indução/repressão para a utilização de compostos nitrogenados e açúcares em leveduras.

O EFEITO DA COMPLEXIDADE ESTRUTURAL DA FONTE DE NITROGÊNIO E DO TIPO DE AÇÚCAR NO ACÚMULO DE CARBOIDRATOS DE RESERVA TREALOSE E GLICOGÊNIO.

Os estudos realizados sobre o acúmulo de trealose e glicogênio em diferentes condições de cultivo deram-se devido ao fato de observamos que o desempenho fermentativo das leveduras utilizadas neste estudo, com relação ao crescimento, produção de etanol, consumo de nutrientes sofreu um forte impacto da natureza estrutural da fonte de nitrogênio, refletindo inclusive na viabilidade celular das leveduras. Este estudo foi realizado considerando-se os aspectos ainda não compreendidos da participação destes carboidratos de reserva no metabolismo de leveduras industriais, particularmente no que diz respeito ao efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio na produção de glicogênio e trealose.

Os resultados obtidos, de uma forma geral, estão de acordo com o comportamento esperado para o acúmulo destes compostos, uma vez que foi observado que a quantidade destes carboidratos de reserva nas células sofrem acentuadas variações em resposta a diferentes alterações nutricionais experimentadas pelas leveduras durante o processo fermentativo, como consequência do complexo sistema regulatório que controla a produção dos carboidratos (FRANCOIS & PARROU, 2001). Entretanto, a análise dos resultados apresentados neste trabalho indica que o comportamento das diferentes linhagens, com relação ao acúmulo de glicogênio e trealose, possa ser reflexo da natureza estrutural da fonte de nitrogênio, do processo de seleção a que foram submetidas as linhagens, o tipo e concentração da fonte de

carbono e o tempo de cultivo. As maiores flutuações de concentrações dos carboidratos, nas diferentes condições ocorreram para a trealose.

A linhagem A3

A linhagem A3 (“ale”) *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um bom desempenho fermentativo em glicose, com comportamento semelhante ao da linhagem Fiso, tanto em 2% como a 15% de glicose produz quantidade de trealose consideravelmente mais elevadas que a levedura de panificação. Nos critérios para a seleção de linhagens cervejeiras são consideradas algumas especificações inerentes a produção de cerveja tipo “ale”, na qual o processo fermentativo se processa a uma temperatura ao redor de 20⁰C, e a levedura deve ter a capacidade de fermentar de forma eficiente à maltose e maltotriose. Como nossos experimentos foram realizados a 30⁰C, este pode ser um dos motivos que poderia induzir o microrganismo a produzir mais trealose. Pode-se observar que a produção de trealose é superior na presença de todas as fontes de carbono analisadas, quando comparada com a linhagem de panificação. A produção de glicogênio pela linhagem A3 é baixa, como também observado para as linhagens Fiso e L52.

A linhagem L52

A linhagem L52 (“lager”), atualmente classificada com *Saccharomyces cerevisiae*, mas por muito tempo conhecida como *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis), levedura selecionada para a produção de cerveja tipo “lager”, cujo processo de fermentação, entre outras particularidades, é conduzido a 15⁰C. Como a linhagem A3 uma das propriedades da L52 é fermentatar eficientemente maltose e maltotriose. Ao realizar experimentos a 30⁰C, esta deveria ser a levedura que refletisse uma situação mais acentuada de estresse fermentativo, com a produção elevada de trealose (como protetor de estresse térmico e fermentativo). Entretanto, o resultados indicam que esta levedura produz quantidades de trealose menores que o observado para a linhagem A3.

A linhagem Fiso

A linhagem Fiso, selecionada para a indústria de panificação, e também utilizada no início da temporada de produção de etanol combustível em várias regiões brasileiras: no geral uma linhagem com bom desempenho fermentativo a 30⁰C em

glicose, tanto em 2% como a 15% (p/v), principalmente no meio complementado com peptona. Esta baixa produção de trealose é observada mesmo nos meios contendo casaminoácidos, quando a linhagem é submetida a um considerável estresse fermentativo na concentração de 15% de açúcar, onde se observa baixo consumo de glicose e acentuada perda da viabilidade celular. Se considerarmos que uma das funções da trealose é atuar como protetor a estresse fermentativo, poderia se sugerir que a baixa produção de trealose, quando comparado às outras linhagens, deve-se a sua robustez fermentativa.

A produção de trealose é aumentada consideravelmente na presença de maltose, parece ser a Fiso uma linhagem mais adaptada metabolicamente para fermentar glicose ou frutose (ou ainda sacarose) do que maltose. O acúmulo de trealose, como esperado é maior em maltose 2% (p/v), pois o seu acúmulo deve ocorrer próximo à exaustão da fonte de carbono. A linhagem de panificação apresenta altos níveis de trealose, também na presença de galactose.

Um outro aspecto a ser considerado é o relacionado à fermentação endógena em *Saccharomyces cerevisiae*, processo metabólico de conversão de carboidratos de reserva (glicogênio e trealose) em etanol, na ausência de substratos exógenos (FERREIRA *et al.*, 1999).

A trealose e o glicogênio já foram considerados apenas substâncias de reserva energética para a levedura, mas atualmente diversos autores sugerem que a trealose exerça a função de proteção para a célula de levedura quando esta se encontra em uma situação estressante: como altas temperaturas, choque osmótico, efeitos tóxicos do etanol, estresse nutricional e desidratação; sendo assim, o glicogênio seria então o principal carboidrato de reserva em leveduras (ALCARDE & BASSO, 1997). Uma questão importante foi mostrado por (LILLIE & PRINGLE, 1980) que um composto para ser considerado de reserva deve ser acumulado em condições nas quais as fontes externas de nutrientes sejam abundantes para serem utilizados em períodos desfavoráveis, fato este que não ocorre com a trealose, acumulada quando o meio se encontra quase exaurido em glicose. Na fase diauxica de crescimento e próximo a fase estacionária observa-se diferenças entre as vias de acúmulo de glicogênio e trealose, estes resultados sugerem que glicogênio e trealose, apresentam funções diferentes quando submetidas a limitação da fonte de nutrientes.

Os resultados mostrados neste trabalho foram importantes, uma vez que *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo mundialmente utilizado na produção de

insumos biotecnológicos, e este trabalho mostra a complexa interação entre as fontes de carbono e nitrogênio no crescimento celular. Os diferentes níveis de repressão catabólica exercida pelos diferentes tipos de açúcares presentes no meio de cultura, e ocorrência de interações mútuas com as diferentes fontes de nitrogênio e de carbono podem ser responsáveis pela alteração dos parâmetros fermentativos das leveduras observados neste estudo. O complexo metabolismo deste organismo também foi mostrado através dos estudos das frações peptídicas, isoladas da peptona como fontes de nitrogênio, e através dos níveis de acúmulo dos carboidratos de reserva glicogênio e trealose. Esperamos que estes resultados, juntamente com os realizados em outros laboratórios possam permitir uma melhor compreensão dos processos fisiológicos que ocorrem nos meios com composições complexas de fontes de carbono e de nitrogênio.

Referências

ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agrícola**, v. 54, p. 189-194, 1997.

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 20-27, 1998.

ALAGRAMAN, K.; NAIDER, F.; BECKER, J. M. A recognition component of the ubiquitin system is required for peptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 225-234, 1995.

BHANDAL, I. S.; HAUPTMAN, R. M.; WIDHOLM, J. M. Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. **Plant Physiology**, v. 78, p. 430-432, 1985.

BARNES, D.; LAI, W.; BRESLAV, M.; NAIDER, F.; BECKER, J. M. *PTR3*, a novel gene mediates amino acid-inducible regulation of peptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 297-310, 1998.

BELTRAN, G.; ESTEVE-ZARZOSO, R. N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Influence of the timing of nitrogen addition during synthetic grape must fermentation kinetics and nitrogen consumption. **Journal of the Agriculture Food Chemistry**, v. 53, p. 996-1002, 2005.

BEUDEKER, R. F.; VAN DAM, H. W.; VAN DER PLAAT, J. B.; VELLENGA, K. Developments in baker's yeast production. In: VERACHETERT, H.; DE MOT, R. (Ed.). **Yeast biotechnology and biocatalysis**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 103-146.

BISSON, L. F. Stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 107-119, 1999.

BISSON, L. F.; FRAENKEL, G. D. Transport of 6-Deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 155, p. 995-1000, 1983.

BISSON, L. F. Post-traumatic stress disorder. **Clinical Evidence**, v. 11, p. 1484-501, 2004.

CALDERBANK, J.; ROSE, A. H.; TUBB, R. S. Peptide removal from all malt and adjunct worts by *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 240. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, p. 321-324, 1985.

CASEY, G. P.; INGLEDEW, W. M. High-gravity brewing: influence of the pitching rate and wort gravity on early yeast viability. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 41, p. 148-153, 1983.

CASEY, G. P.; INGLEDEW, W. M. Ethanol tolerance in yeast. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 13, p. 219-280, 1986.

CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M. High-gravity Brewing: effect of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 639-646, 1984.

CLAPPERTON, J. F. Simple peptide of wort and beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 77, p. 177-180, 1971.

COLAÇO, C.; SENS, S.; THANGAVELU, M.; PINDER, S.; ROGER, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Biotechnology**, v. 10, p.1007-1011, 1992.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

COX, B. S. Genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. In: WHEALS, A. E.; ROSE, H. (Ed.). **The yeast: yeast genetic**. London: Academic Press, 1995. v. 6, p. 7-67.

CROWE, J. H.; HOEK, F. A.; CROWE, L. M. Anhydrobyosis. **Annual Reviews of Physiology**, p. 579-599, 1992.

CSONKA, L. N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 121-147, 1989.

CRUZ, S. H.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Structural complexity of nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, p. 54-61, 2002.

CRUZ, S. H.; BATISTOTE, M.; ERNANDES, J. R. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, p. 349-355, 2003.

D'AMORE, T.; CRUMPLE, R.; STEWART, G. G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 7, p. 191-196, 1991.

DEVLIN, T. M. **Text book of biochemistry with clinical correlations**. 3rd ed. [s.l.]: Willey Liss, 1992.

DE VIRGILIO, C.; SIMMEN, U.; HOTTINGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Heat-shock induces enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation and thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, even in the presence of cycloheximide. **FEBS Letters**, v. 273, p. 107-110, 1990.

ELBEIN, A. D. The metabolism of α,α -trehalose. In: TIPSON, S.; HOTTON, D. **Adv. Carbohydrate Chemistry Biochemistry**. New York: Academic Press, 1974. v. 30, p. 227-256.

FARRELL, R. E.; GERMIDA, J. J.; MING HUANG, P. Effects of chemical speciation in growth media on the toxicity of mercury (II). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1507-1514, 1993.

FERREIRA, L. V.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio em *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 29-32, 1999.

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

FONTANA, J. D.; KRISMAN, C. R. Glycogen synthesis in the fungus *Neurospora crassa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 540, p. 183-189, 1978.

FRANÇOIS, J. M.; ERASO, P.; GANCEDO, C. Changes in the concentration of cAMP, fructose 2,6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. **European Journal of Biochemistry**, v. 164, p. 369-373, 1987.

FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrate metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 125-145, 2001.

GADD, G. M.; CHALMERS, K.; REED, R. H. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 48, p. 249-254, 1987.

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

GARDNER, M. J.; MCBRYDE, C.; VYTAVELOVA, A.; LOPES, B. M.; JIRANEK, V. Identification of genes affecting glucose catabolism in nitrogen-limited fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 791-800, 2005.

GEORGIEVA, B.; ROTHSTEIN, R. Kar-mediated plasmid transfer between yeast strains: alternative to traditional transformation methods. In: GUTHRIE, C.; FINK, G. R. (Ed.) **Guide to yeast genetic and molecular and cellular biology**: Part B. New York: Academic Press, 2002. p. 278-289. *Methods in Enzymology*, v. 350.

GOFFEAU, A.; BARREL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALLIDERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274-546, 1996.

GRBA, S.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H. Formation of trehalose and glycogen in growing baker's Yeast. **Finnish Chemical Letters**, v. 2, p. 61-64, 1979.

HANKS, D. L.; SUSSMAN, A. S. Localization of trehalose in the ascospores of *Neurospora*: relation to ascospores dormancy and germination. **Journal of Bacteriology**, v. 115, p. 592-599, 1969.

HICKMAN, E.; BUCKEE, G. K. Separation of nitrogenous compounds of malt, wort and beer using high performance liquid chromatography. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 88, p. 382-383, 1982.

HOFMAN-BANG, J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biotechnology**, v. 12, p. 35-73, 1999.

HORÁK, J. Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 864, p. 223-256, 1986.

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

HOTTINGER, T.; BOLLER, T.; WIENKEN, A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. **FEBS Letters**, v. 220, p. 113-115, 1987.

IRAQUI, I.; VISSERS, S.; BERNARD, F.; CRAENE, J. O.; BOLES, E.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*; a permease-like sensor of external amino acids and F-box protein GRR1p are required for transcriptional induction of the *AGP 1* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 2, p. 989-1001, 1999.

ISLAND, M. D.; PERRY, J. R.; NAIDER, F.; BECKER, J. M. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in amino acid-inducible peptide transport. **Current Genetics**, v. 20, n. 6, p. 457-463, 1991.

JANIAUX, J. C.; GRENSON, M. *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with other baker's yeast amino acid permeases and nitrogen catabolite repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 190, p. 39-44, 1990.

JONES, M.; PRAGNELL, M. J.; PIERCE, J. S. Absorption of amino acids by yeast from a semi-defined medium simulating wort. **Journal of the Institute of Brewing** v. 75, p. 520-536, 1969.

KRUCKERBERG, L. A.; BISSON, F. The *HXT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. **Molecular And Cellular Biology**, v. 10, p. 5903-5913, 1990.

LARGE, P. J. Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. **Yeast**, v. 2, p. 1-34, 1986.

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

LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, v. 143, p. 1384-1394, 1980.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganism**. 8th ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1997.

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, 1992. v. 2, p. 283.

MANGINOT, C.; ROUSTAN, J. L.; SABRAYROLLES, J. M. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 511-517, 1998.

MARINI, A. M.; SOUSSI-BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; ANDRÉ, B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 8, p. 4482-4293, 1997.

MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEÃO, C. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 540-545, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-430, 1959.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; PUEYO, E.; PÓLO, M. C. Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 63-75, 2002.

NEVES, M. J.; TERENCEI, H. F.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalases from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var *thermoidea*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 10, p. 17-19, 1994.

NIWA, T.; KATSUZAKI, T.; YAZAWA, T.; TATEMACHI, N.; EMOTO, Y.; MIYAZAKI, T.; MAEDA, K. Urinary trehalase activity in chronic glomerulonephritis. **Nephron**, v. 63, p. 423-428, 1993.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

OLSON, A. L.; PESSIN, J. E. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 16, p. 235-256, 1996.

PANEK, A. D. Synthesis of trehalose by bakers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 98, p. 349-355, 1962.

PANEK, A. D. Trehalose metabolism – new horizons in technological applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 169-181, 1995.

PANEK, A. D.; MATTOON, J. R. Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* Relationships between catabolite repression, trehalose synthesis and mitochondrial development. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 183, p. 306-316, 1977.

PARROU, J. L. M. A.; FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v. 143, p. 1891-1900, 1997.

PARROU, J. L.; ENJARLBERT, B.; PLOURDE, L.; BAUCHE, A.; GONZALEZ, B.; FRANÇOIS, J. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, p. 191-203, 1999.

PATTERSON, C. A.; INGLEDEW, W. M. Utilization of peptides by a lager brewing yeast. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 57, p. 1-8, 1999a.

PATTERSON, C. A.; INGLEDEW, W. M. Effect of nitrogen source and concentration on the uptake of peptides by a lager yeast in continuous culture. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 57, p. 9-17, 1999b.

PETER, G. J.; DURING, L.; AHMED, A. Carbon catabolite repression regulates amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* via the Tor signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 5546-5552, 2006.

PIERCE, J. S. Horace brown memorial lecture: the role of nitrogen in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, p. 378-381, 1987.

ROACH, P. J.; SKURAT, A. V.; HARRIS, R. A. Regulation of glycogen metabolism. In: JEFFERSON, L. S.; CHERRINGTON, A. D.; GOODMAN, H. M. The endocrine pancreas and regulation of metabolism. Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 609. **Handbook of Physiology**, Section 7, v. 2.

RUDOLPH, A. S.; CLIFF, R. O.; SPARGO, B. J. The use of compatible solutes in the long-term preservation of lipid microstructures. **Cryobiology**, v. 30, p. 236-237, 1993.

SUSSMAM, A. D. The role of trehalose in the activation of dormant ascospores of *Neurospora Crassa*. **Quarterly Review of Biology**, v. 36, p. 109-116, 1961.

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

STEINER, H. Y.; NAIDER, F.; BECKER, J. M. The PTR family: a new group of peptide transporter. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 825-834, 1995.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I. **Brewer's yeast**: an introduction to brewing science & technology. London: The Institute of Brewing, 1998. 108 p. Série III.

SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. M.; REYNOLDS, N. Protoplast fusion for the improvement of industrial yeasts. In: KORHOLA, M.; NEVALAINEN, H. (Ed.). **Industrial yeast genetics**: proceedings of the alko symposium on Industrial yeast genetics. Helsinki: Foundations for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 1987. p. 27-42.

STEPHANOPOULOS, G.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering**. San Diego. Academic Press, 1998.

ter SCHURE, 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**, v. 141, p. 1101-1108, 1995.

ter SCHURE, E. G.; VAN RIEL, N. A. W.; VERRIPS, C. T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 67-83, 2000.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiologica Reviews**, v. 48, n. 1, p. 42-59, 1984.

THEVELEIN, J. M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1753-1790, 1994.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: BRAMBI, R.; MARZLUF, G. A. (Ed.). **The Micota III**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p. 395-420.

THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2046-2050, 1990.

THORNE, R. S. W. The nitrogenous metabolism of yeast. Part III: the ability of certain pure chemical compounds to function as nitrogen sources for yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 39, p. 608-621, 1933.

THORNE, R. S. W. The growth and fermentation of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* with amino acids as nutrients. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 47, p. 255-272, 1941.

THORNE, R. S. W. Nitrogen metabolism of yeast. A consideration of the mode of assimilation of amino acids. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 50, p. 201-222, 1949.

WU, L. F.; HUGHES, T. R.; DAVIERWALA, A. P.; ROBINSON, M. D.; STOUGHTON, R.; ALTSCHULER, S. J. Large-scale prediction of *Saccharomyces cerevisiae* gene function using overlapping transcriptional clusters. **Nature Gene**, v. 31, p. 255-265, 2002.

YOKATA, H.; SAHARA, H.; KOSHINO, S. Fractionation and quantitation oligopeptides in beer and wort. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 51, p. 54-57, 1993.