

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

**“A UTILIZAÇÃO DIFERENCIAL DE GLICOSE E FRUTOSE POR
LEVEDURAS VINÍCOLAS EM MEIOS CONTENDO FONTES DE
NITROGÊNIO ESTRUTURALMENTE COMPLEXAS”**

Messias Miranda Junior

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ernandes

Trabalho apresentado ao Instituto de
Química, UNESP, Araraquara, como
parte dos requisitos para obtenção
do título de mestre em Biotecnologia.

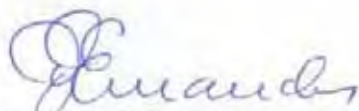
Araraquara
2008

MESSIAS MIRANDA JUNIOR

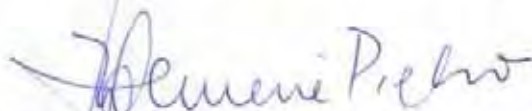
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 31 de janeiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Roberto Ernandes (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. João Atílio Jorge
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

Dados Curriculares

Messias Miranda Junior

1. Dados pessoais

Nascimento: 17 de Janeiro de 1983

Nacionalidade: brasileiro

Naturalidade: Arandú - SP

Estado civil: solteiro

Filiação: Messias Miranda
 Clarice Mendes Miranda

Profissão: Biomédico

Documento de identidade: 33216125-0

Cadastro de pessoa física: 311852338-73

Endereço: Rua Francisco Feresin, nº 55
 CEP: 18710-000 - Arandú - SP

Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP
 Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
 Rua Prof. Francisco Degno s/ nº
 CEP: 14800-900 - Araraquara - SP

2. Formação acadêmica

Bacharel em Biomedicina, concluído em 2005 e tendo colado grau em 4 de Abril de 2006, Centro Universitário de Araraquara - UNIARA, Araraquara - SP.

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

3. Atividades de pesquisa

3.1 Trabalhos apresentados em congressos

MIRANDA Jr, M.; FRIOL, P. G.; MORAIS, M. R.; DISANTO, R. J.; BERNARDI, P. S. M.; BERNARDI, A. C. A. Infecção Hospitalar Relacionada ao Uso de Cateter. 2º Encontro Científico Biomédico e V Semana Biomédica de Araraquara, Araraquara - SP, 2004.

MIRANDA Jr, M.; FRIOL, P. G.; MORAIS, M. R.; DISANTO, R. J.; BERNARDI, A. C. A. Infecção Hospitalar Relacionada ao Uso de Cateter. VI Congresso Londrinense de Biologia Aplicada a Saúde e I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental, Londrina - PR, 2004.

ROSA, W. O.; ERNANDES, J. R.; BATISTOTE, M.; MIRANDA Jr, M.; CILLI, E. M. O Estudo da Utilização de Frações Peptídicas como Fonte de Nitrogênio na Fermentação de Diferentes Açúcares por Leveduras Industriais. XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Bauru - SP, 2006.

MIRANDA Jr, M.; BATISTOTE, M.; ERNANDES, J. R. The Influence of the Nitrogen Source in the Fermentation of Glucose and Fructose by Wine Yeasts. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference “Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts”, Salvador - BA, 2007.

3.2 Publicações

MIRANDA Jr, M.; FRIOL, P. G.; MORAIS, M. R.; DISANTO, R. J.; BERNARDI, A. C. A. Infecção Hospitalar Relacionada ao uso de Cateter. **Biosaúde**, v. 6, 2004, 101p.

3.3 Participação em congressos e simpósios

IX Congresso Brasileiro de Biomedicina, São Paulo - SP, 2004.

IX Simpósio de Análises Clínicas de São José do Rio Preto sobre Doenças Falciformes e Bioquímica Clínica, São José do Rio Preto - SP, 2004.

7º Encontro Regional de Biomedicina do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, Botucatu - SP, 2004.

VI Congresso Londrinense de Biologia Aplicada à Saúde e I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental, Londrina - PR, 2004.

XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Salvador - BA, 2007.

10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference “Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts”, Salvador - BA, 2007.

A Deus

“Desde o início de nossa caminhada, Tu estavas conosco.

Dias e noites se passaram.

Vitórias foram conquistadas.

Derrotas foram superadas.

Amizades foram criadas.

Conhecimentos foram adquiridos.

... e agora que alcançamos o nosso objetivo, viemos.

Te louvar, Te agradecer e Te oferecer

*Humildemente a vida, o amor, a felicidade e enfim,
a vitória.”*

Desse momento

“Obrigado Senhor!”

*Aos meus pais **Messias Miranda** e **Clarice Mendes Miranda**
e a minha tia **Marta Mendes**, que desde o início me
incentivaram,
me guiaram, me aconselharam e me serviram
de toda amizade e companheirismo pelo trajeto percorrido,
principalmente nos momentos mais difíceis.....,*

Meu sincero obrigado

*A todos os familiares e amigos que me incentivaram e
apoiam....*

Agradecimentos

O final de uma Dissertação é um momento em que a realização pessoal e o crescimento profissional fazem com que qualquer sentimento de dificuldade e desespero durante a realização do trabalho se transforme em alegria e alívio em virtude do amadurecimento, aprendizagem profissional e acadêmico. E para que esses sentimentos sejam possíveis, dedico este trabalho a pessoas que fizeram parte dele direta ou indiretamente, possibilitando sua conclusão.

Os meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. José Roberto Ernandes, que possibilitou a realização desse trabalho, pela oportunidade, confiança, orientação, pelas discussões e sugestões e pela amizade.

A Prof^a Dra. Maria Célia Bertolini e a Prof^a Dra Cecília Laluze por permitirem a utilização de seus laboratórios sob suas responsabilidades, principalmente a Prof^a Cecília Laluze pela amizade, pelas conversas e pelo auxílio nos momentos de discussão.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud. Cilli, pela orientação, amizade, discussões e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Reinaldo Marchetto pelas conversas, espontaneidade e auxílio.

A Prof^a Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e ao Prof Dr. Rubens Monti pela discussão, opinião e conversa durante o exame de qualificação, principalmente ao Prof Rubens pelas conversas durante a realização desse trabalho e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr João Atílio Jorge pela possibilidade de usufruir do seu conhecimento, pelas opiniões e pelas oportunidades.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia, principalmente do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto e a Prof^a Dra. Elizabete Pizzolitto, pelas conversas, amizade, discussões, pelas oportunidades em nossas reuniões, pela oportunidade de trabalho e incentivo a dedicar-me à pós-graduação.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica pelas conversas, companheirismo e convivência, Crisla, Karem, Eduardo (Lentilha), Saulo, Crusca, Michele, Luciana, Ana Paula, Robson (Sebinho), Edison (Araketu), enfim, a todos os que sempre possibilitaram uma boa conversa e discussão.

Ao pessoal do laboratório, Flávia, Gisele, Patrícia, Fernanda Zanela, Fernanda Cupertino e Amanda.

Aos meus amigos Rodrigo e Luiz Carlos pelas conversas, discussões, distrações e divertimento durante a realização desse trabalho e fora dele.

À minha amiga Margarete Batistote, que sempre me apoiou nesse trabalho, pelas conversas, discussões, companheirismo, amizade e pelos ensinamentos.

Ao pessoal que passou pelo laboratório Juliana Sposto, Eduardo, Wesley, Maria Helena.

Ao Tarcísio, Fernando, Waldenir, Zilda e Fatima por sempre estarem presentes nos momentos em que precisei, pelas conversas, opiniões e amizade.

Às funcionárias da seção de pós-graduação Sandra, Patrícia e Célia e ao pessoal da biblioteca por sempre estarem presentes, pelo auxílio, atenção e colaboração.

Aos meus grandes amigos, que nunca me deixaram na mão, Flavia, Andrea, Suzana, Meline, Tarsia, Mariana, muito obrigado por fazerem parte da minha vida, por estarem sempre presentes nos momentos em que precisei, pela diversão, pelas conversas, pelo desabafo, pelos momentos de alegria e momento de tristeza, meu sincero muito obrigado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

Enfim, palavras são poucas para agradecer aos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.....**Muito obrigado.**

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo geral identificar as etapas ou estados fisiológicos importantes que determinam o desempenho fermentativo de leveduras industriais em meio de cultivo suplementado com fontes de nitrogênio apresentando diferentes graus de complexidade estrutural, utilizando duas linhagens de leveduras empregadas em vinícolas. O objetivo específico foi estudar a utilização diferencial de glicose e frutose por leveduras vinícolas induzida por fontes nitrogenadas complexas. Os meios de cultura continham como fonte de carbono a glicose, a frutose e uma mistura de glicose mais frutose; e uma fonte de nitrogênio variou de um simples sal de amônio a hidrolisado ácido de proteínas (casaminoácidos) e hidrolisado enzimático de proteínas (peptona). Os estudos envolveram: determinação dos parâmetros fermentativos de duas leveduras vinícolas em meios contendo diferentes fontes de carbono e diferentes fontes de nitrogênio apresentando diferentes complexidades estruturais; análise da composição de aminoácidos livres e na forma peptídica presente nos meios de cultura antes e após a fermentação; análise da distribuição de peptídeos nos meios de cultura antes e após o processo fermentativo.

Os cultivos foram realizados com e sem agitação, situações que permitem observar o efeito do oxigênio no metabolismo das leveduras. Nas culturas agitadas, no geral, quando as leveduras vinícolas são cultivadas em glicose, frutose e glicose mais frutose, a fonte nitrogenada peptona é a que propicia melhores condições de fermentação, com maior produção de biomassa e etanol. A presença de oxigênio exerce forte impacto no processo fermentativo, nos meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, com baixa produção de biomassa e etanol e perda acentuada da viabilidade celular. No processo não agitado, ocorre baixa produção de biomassa, mas as linhagens utilizam eficientemente o açúcar do meio, produzindo alta concentração de etanol e preservando a viabilidade celular. Como esperado, as leveduras não fermentam frutose tão eficientemente como glicose, e a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio parece amplificar a discrepância da utilização de glicose sobre frutose. Leveduras são capazes de utilizar aminoácidos e pequenos peptídeos como fonte de nitrogênio. As análises de aminoácidos em amostras coletadas antes e após fermentação mostram que as leveduras utilizaram os aminoácidos na forma livre presentes no meio de cultura, e a análise de aminoácidos na forma peptídica em amostras fermentadas submetidas a hidrólise ácida, no meio complementado com peptona, sugeriram que ocorre um aumento da quantidade de aminoácidos na forma peptídica, sugerindo que a levedura pode ter secretado

proteínas ou peptídeos no meio de cultura nos estágios mais avançados da fermentação. Durante o cultivo várias frações peptídicas presentes tanto na peptona como em casaminoácidos são consumidas, mas uma fração considerável de peptídeos permanece no meio de cultivo. As linhagens apresentam características semelhantes de consumo de peptídeos, tanto em peptona como em casaminoácidos, mas os efeitos sobre o desempenho fermentativo das linhagens foram diferentes, talvez refletindo as diferenças por demanda de nitrogênio entre as duas linhagens estudadas. A comparação dos cromatogramas antes e após fermentação mostra o aparecimento de outras frações peptídicas.

Abstract

The present work had a general objective to identify the stages or physiological states important that determine the fermentative performance in industrial yeasts in media supplemented with nitrogen sources with different structural complexity, using wine yeasts. The specific aim of this work was to study the effect of the complexity of nitrogen source on the differential utilization of glucose over fructose. The culture media contained glucose, fructose and a mixture of glucose and fructose as carbon sources, and a nitrogen source that varied of a simple ammonium salt, to an acid protein hydrolyzates (casamino acids) and enzymatic protein hydrolyzates (peptone). The studies involved: determination of the fermentative parameters of industrial yeast in media containing various sources of different carbon and nitrogen sources with different structural complexities; analyses of amino acids composition in the free and peptide form present in the culture media before and after fermentation; analyses of peptides distribution in the culture media before and after the fermentative process.

In general, when the wine yeasts are grown on glucose, fructose and a mixture of glucose and fructose, peptone is the nitrogen source with better fermentative conditions, inducing higher biomass and ethanol production. Conversely, agitation induced strong impact in the fermentative process in media supplemented with casamino acids and ammonium sulfate, with low biomass and ethanol production. In unshaken fermentation of glucose and glucose plus fructose, in all nitrogen supplements, despite low biomass production, sugars are efficiently utilized by both strains, with high production of ethanol and preserving yeast viability. As expected, wine strains do not ferment fructose as efficiently as glucose, and the nitrogen complexity of nitrogen source accentuate the glucose to fructose discrepancy. Yeasts are able to utilize free amino acids and small peptides. Amino acids analyses before and after fermentation indicate that the yeast strains utilizes most of the free amino acids contained in the medium, and in the medium supplemented with peptone the acid hydrolyzed post-fermentation samples indicated increased amount of amino acids in the peptide form, suggesting protein or peptide secretion by yeast strains by the end of fermentation. Concerning peptides utilization, it seems that both the strains show similar characteristics with relation to the peptide consumption, in peptone and in casamino acids, however the effects on yeasts strains are different, maybe as reflection of differing nitrogen demand among strains.

Figuras

1. *Fotografia da célula de Saccharomyces cerevisiae em reprodução por brotamento.* 27
2. *Fluxograma de execução para determinação dos parâmetros fermentativos.* 39
3. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de etanol de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de glicose e frutose. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.* 47
4. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de etanol de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de glicose e frutose. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.* 48
5. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de etanol de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de glicose e frutose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.* 49
6. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de etanol de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de glicose e frutose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.* 50

7. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de glicose. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.* 52
8. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de glicose. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.* 53
9. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento anaeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de glicose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 0,1M.* 54
10. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento anaeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de glicose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 0,1M.* 55
11. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de S. cerevisiae (VIN7) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de frutose. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.* 57
12. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de S. cerevisiae (VIN13) durante crescimento aeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de frutose. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o pH do* 58

meio contendo sulfato de amônio, reajustado para 5,0 com NaOH 1M.

13. Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* (VIN7) durante crescimento anaeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de frutose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 59
14. Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* (VIN13) durante crescimento anaeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 20% (p/v) de frutose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 60
15. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes do cultivo em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose. 74
16. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes do cultivo em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose. 75
17. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes e após 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30° C e 200rpm. 78
18. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes e após 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C e 200rpm. 79
19. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes e após 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30° C. 80

20. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes e após 60h de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C.	81
21. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes e após 60h de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> VIN7 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30° C e 200rpm.	84
22. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes e após 60h de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C e 200rpm.	85
23. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes e após 60 h de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> VIN7 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30° C.	86
24. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm antes e após 60h de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C.	87
25. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm após 60h de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> VIN7 e VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C e 200rpm.	88
26. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm após 60h de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> VIN7 e VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C.	89
27. Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm após 60h de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> VIN7 e VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C e 200rpm.	90

28. *Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm e 280nm após 60h de cultivo de S. cerevisiae VIN7 e VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C.*

91

Tabelas

1. Produção de biomassa, viabilidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol por linhagens industriais de leveduras utilizadas em vinícola cultivadas em meio YNB contendo 20% (p/v) de glicose e frutose 1% (p/v) de diferentes fontes de nitrogênio.	63
2. Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por linhagens industriais de leveduras utilizadas em vinícola cultivadas em meio YNB contendo 20% (p/v) de glicose e 1% (p/v) de diferentes fontes de nitrogênio.	64
3. Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por linhagens industriais de leveduras utilizadas em vinícola cultivadas em meio YNB contendo 20% (p/v) de frutose e 1% (p/v) de diferentes fontes de nitrogênio.	65
4. Composição de aminoácidos em peptona e casaminoácidos antes e após a hidrólise ácida destas preparações.	68
5. Composição de aminoácidos (mg/mL) em Peptona e Casaminoácidos antes e após 60h de crescimento com agitação (200rpm) de <i>S. cerevisiae</i> (VIN7 e VIN13) em meio YNB contendo 20% (p/v) da fonte de carbono (10% de glicose e 10% de frutose) e 1% (p/v) da fonte de nitrogênio.	69
6. Composição de aminoácidos (mg/mL) em Peptona e Casaminoácidos antes e após 60h o crescimento sem agitação de <i>S. cerevisiae</i> (VIN7 e VIN13) em meio YNB contendo 20% (p/v) da fonte de carbono (10% de glicose e 10% de frutose) e 1% (p/v) da fonte de nitrogênio.	70
7. Composição de aminoácidos (mg/mL) em Peptona antes e após hidrólise ácida crescimento com agitação (200rpm) de <i>S. cerevisiae</i> (VIN7) em diferentes tempos de cultivo em meio YNB contendo 20% (p/v) da fonte de carbono (10% de glicose e 10% de frutose) e 1% (p/v) de peptona.	71

8. *Composição de aminoácidos na cultura realizada com a fonte de nitrogênio sulfato de amônio após 60h de crescimento com agitação (200rpm) e sem agitação de S. cerevisiae (VIN7 e VIN13) em meio YNB contendo 20% (p/v) da fonte de carbono (10% de glicose e 10% de frutose) e 1% da fonte de nitrogênio.*

72

Abreviaturas

ACN - acetonitrila.

atm - atmosfera.

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico.

g - gramas.

h - horas.

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência.

M - molar.

mg - miligramas.

min - minutos.

mL - mililitros.

nm - nanômetros.

rpm - rotações por minuto.

Sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

TFA – ácido trifluoroacético.

VIN7 e VIN13 - linhagens vinícola de *Saccharomyces cerevisiae*.

YPD - meio contendo extrato de levedo, peptona e glicose.

YNB - yeast nitrogen base.

μL - microlitros.

μmol - micromolar.

Índice

Resumo	11
Abstract	14
I. Introdução	26
I.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
I.2. Utilização de nutrientes por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
I.2.1. Fontes de carbono	29
I.2.2. Fontes de nitrogênio	31
II. Objetivos	35
III. Material e métodos	37
III.1. Microrganismos utilizados	37
III.2. Meios de cultivo	37
III.3. Manutenção da cultura e preparo do inóculo	38
III.4. Condições de crescimento e obtenção da suspensão de células	38
III.5. Determinação dos parâmetros fermentativos	39
III.5.1. Determinação da produção de biomassa	39
III.5.2. Determinação da viabilidade celular	40
III.5.3. Determinação do pH	40
III.5.4. Medidas do consumo de nutrientes e produção de etanol	40
III.5.4.1. Açúcar residual	40
III.5.4.2. Determinação da concentração de etanol	41
III.5.4.3. Determinação da concentração de aminoácidos	41
III.5.4.4. Determinação da distribuição de peptídeos ligados	42
III.6. Reprodutibilidade	42
IV. Resultados	44
IV.1. Estudos realizados com diferentes fontes carbono e nitrogênio com e sem agitação	45

IV.1.1. Estudos realizados com glicose mais frutose	45
IV.1.2. Estudos realizados com glicose	51
IV.1.3. Estudos realizados com frutose	56
IV.1.4. Análise comparativa dos parâmetros fermentativos das linhagens vinícolas	61
IV.2. Análise da composição de aminoácidos em peptona e casaminoácidos antes e após a fermentação	66
IV.3. Determinação do perfil de distribuição de peptídeos em peptona e casaminoácidos	73
IV.3.1 Determinação do perfil de distribuição de peptídeos em peptona após a fermentação	76
IV.3.2 Determinação do perfil de distribuição de peptídeos em casaminoácidos após a fermentação	82
V. Discussão	93
VI. Considerações Finais	100
VII. Referências	103

Introdução

I. 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 alimentos, medicamentos e de diferentes processos industriais. O reino dos fungos é um dos mais numerosos, são organismos unicelulares ou filamentosos, de vida livre e algumas espécies são importantes devido a sua grande biodiversidade no planeta. Por isso há um enorme potencial a ser explorado nesses 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 somente algumas têm sido bem caracterizadas, fazendo com que este grupo de microrganismos seja qualitativamente e economicamente importante nos processos industriais (STEWART & RUSSELL, 1998).

Devido a habilidade que as leveduras apresentam em converter diferentes substratos em produtos de interesse biotecnológico, recentes estudos estão sendo realizados com o objetivo de se aumentar a eficiência no que se refere a produtividade industrial e adequações para se obter um produto final de qualidade superior sem gerar tantos gastos com processos produção e purificação dos produtos.

Os fungos leveduriformes *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1), são organismos eucariotos unicelulares extremamente versáteis no seu metabolismo, que se reproduzem por esporos e brotamento, possui 16 cromossomos lineares e a sequência genômica indica que aproximadamente 6000 genes são funcionais (GOFFEAU *et al.*, 1996). Dois terços desses genes estão sendo relacionados a função, baseando-se no fenótipo de mutantes ou na homologia com proteínas com função conhecida (WU *et al.*, 2002).

As linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são tradicionalmente utilizadas em indústrias de panificação (CRUZ *et al.*, 2003), na produção de bebidas alcoólicas (BATISTOTE *et al.*, 2006) e etanol combustível (ALFENORE *et al.*, 2002), sendo o último uma substância química de grande importância industrial e potencial emergente como biocombustível para substituir os combustíveis fósseis, em virtude de

seu desaparecimento (ALFENORE *et al.*, 2002; PHISALAPHONG *et al.*, 2006). Estima-se que mais de dois bilhões de toneladas de leveduras são produzidas somente para a indústria de panificação, fazendo deste microrganismo um dos mais importantes produtos biotecnológicos (BEUDEKER *et al.*, 1990). Outras aplicações de leveduras incluem a produção de enzimas, nucleotídeos, vitaminas, glicoproteínas, coenzimas, ácidos nucleicos e lipídeos. Com o advento das novas técnicas de engenharia genética as leveduras foram transformadas e utilizadas como produtoras de proteínas heterólogas, e mais recentemente, através dos procedimentos de engenharia metabólica, a *Saccharomyces cerevisiae* está sendo utilizada como veículo celular para melhorar a eficiência de conversão de substratos em produtos de interesse biotecnológico (OSTERGAARD *et al.*, 2000).

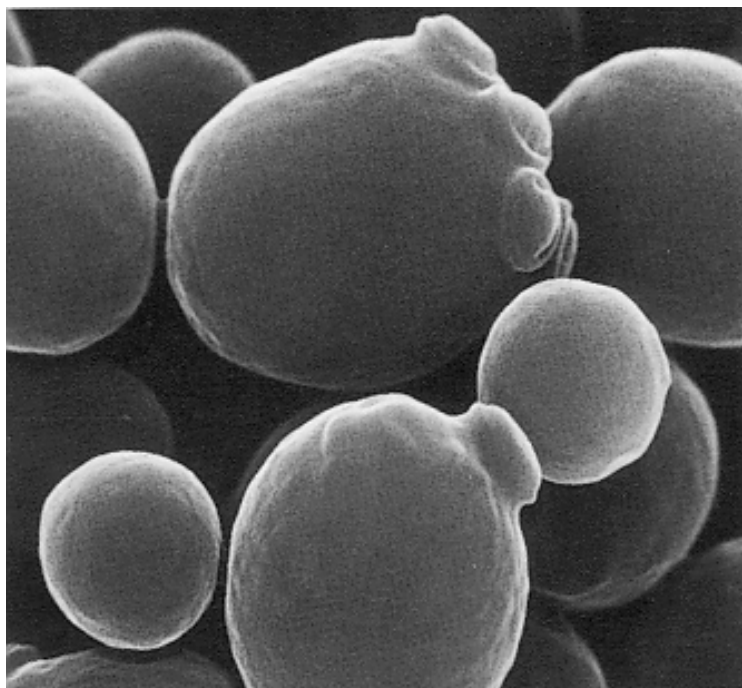


Figura 1: Células de *Saccharomyces cerevisiae*, reprodução por brotamento. Fonte: *Saccharomyces cerevisiae*. Disponível em (www.bath.ac.uk/bio-sci/wheals2.htm), acesso em 22 de fevereiro de 2007.

As leveduras, além da sua importância industrial, são utilizadas como modelo de células eucarióticas. Esta escolha se deve em grande parte a quantidade de conhecimento já acumulado, no que se refere a fisiologia, bioquímica e genética. As leveduras apresentam várias características interessantes: são organismos unicelulares, facilmente manipuláveis, não patogênicos, capazes de crescer em várias fontes de carbono e de fornecer grande quantidade de células em um tempo

relativamente curto. Tais características tornam esses microrganismos um dos mais adequados para estudos de processos biológicos peculiares aos organismos eucarióticos (ANGIER, 1986).

I.2. Utilização de nutrientes por *Saccharomyces cerevisiae*

Em todos os processos industriais em que se utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* os meios devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono, além de sais e vitaminas (COOPER, 1982; HORAK, 1997). Por esse motivo, os principais nutrientes utilizados pelas leveduras, quanto a quantidade, são carbono e nitrogênio. Isso implica que os fluxos de carbono e nitrogênio tanto quanto suas interações constituem parâmetros importantes na regulação do crescimento celular (HORAK, 1997). As coordenações dos fluxos de carbono e nitrogênio podem ser reguladas na assimilação ou no 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).

No caso de leveduras e outro microorganismos eucariotos, o transporte celular é o primeiro passo para a utilização dos nutrientes, o qual é regulado por uma resposta intracelular precisa e também por mudanças do ambiente extracelular. Devido a complexidade dos sistemas de transporte e dos mecanismos de controle celular, recentemente vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de elucidar estes mecanismos (JAUNIAUX & GRENSON, 1990; HORÁK, 1997; BEESER & COOPER, 1999; WILES *et al.*, 2006).

Para selecionar os nutrientes necessários a serem utilizados, as leveduras desenvolveram mecanismos celulares que são desencadeados por eventos de regulação conhecidos como repressão catabólica induzida pelo carbono (“Repressão Catabólica do Carbono”) ou pelo nitrogênio (“Repressão Catabólica do Nitrogênio”), os quais impõe a levedura uma seqüência ordenada de utilização de fontes de carbono e de nitrogênio. Além dessas vias de regulação, existem outras de sinalização e de sensoramento de nutrientes em leveduras, além 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 (THEVELEIN, 1994; GANCEDO, 1998; GASCH & WERNER-WASHBURN, 2002; SCHNEPER *et al.*, 2004; PETER *et al.*, 2006).

I.2.1. Fontes de carbono

Os principais compostos utilizados como fonte de carbono são os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) ou dissacarídeos (maltose e sacarose). Quando a levedura é cultivada em meio contendo uma mistura de glicose e outros açúcares como sacarose, maltose ou galactose, o metabolismo é diauxico, ou seja, glicose é preferencialmente utilizada, enquanto que os outros açúcares somente serão metabolizados após a exaustão da glicose. Este comportamento diauxico ocorre devido ao fenômeno de repressão catabólica, ou repressão exercida pela glicose (DYNESEN *et al.*, 1998; GANCEDO, 1998). A substituição, redução ou remoção da glicose do meio de cultura provoca uma importante alteração fisiológica em consequência a alterações genômicas nas leveduras (PETER *et al.*, 2006). Além da glicose, outros açúcares fermentescíveis como a frutose e a manose também desencadeiam o processo de repressão catabólica. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a repressão pela glicose regula a expressão dos genes envolvidos com a produção de enzimas necessárias para o metabolismo da sacarose, maltose e galactose, e também das enzimas da gliconeogênese e da cadeia respiratória (DYNESEN *et al.*, 1998; PETER *et al.*, 2006). Em leveduras, a regulação das enzimas submetidas ao controle da repressão catabólica é complexa e além do controle da expressão gênica, envolve também o fenômeno de inativação catabólica e o nível da atividade enzimática (HOLZER, 1976; THEVELEIN, 1994; GANCEDO, 1998).

Para o cultivo de leveduras vinícolas, o meio de cultura contém concentração equimolar de glicose e frutose, porém, as linhagens de leveduras, incluindo as de vinho, têm preferência pela utilização de glicose, resultando em uma diferença no consumo de glicose e frutose. A base molecular da utilização diferencial de glicose e frutose e a discrepância na utilização desses carboidratos durante a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, em geral, não são conhecidas. (BERTHELS *et al.*, 2004; BERTHELS *et al.*, 2007).

As vias bioquímicas de fermentação de açúcar pelas leveduras são bem estabelecidas e foram estudadas em grande detalhe (HORÁK, 1997; BERTHELS *et al.*, 2007). Glicose e frutose são transportadas pelos mesmos transportadores de hexose (Hxt) na membrana plasmática. Hxt6 e Hxt7 são transportadores de alta afinidade, e Hxt1 e Hxt3 são os transportadores de baixa afinidade. Existem vários outros transportadores Hxt com afinidade intermediária, porém não está bem estabelecido que

esses transportadores contribuam para o transporte de açúcares (ÖZCAN & JOHNSTON, 1999; BERTHELIS *et al.*, 2007). Em fermentação de vinho, são expressos genes para transportadores com alta e baixa afinidade para o transporte de hexoses, sendo expressos genes codificadores de transportadores com baixa afinidade *HXT1* no início da fermentação, e genes codificadores de transportadores com alta afinidade *HXT6* e *HXT7* expressos na segunda fase da fermentação, após a fase de crescimento (PEREZ *et al.*, 2005). A inativação do transporte de açúcares pode causar vários problemas no processo fermentativo (SALMON, 1989), provocando alterações no sabor e aroma do produto final.

Uma vez que os açúcares foram transportados para dentro da célula, eles são fosforilados por três enzimas, hexoquinases Hxk1, Hxk2 e glicoquinase Glk1 (BISSON & FRAENKEL, 1983; ENTIAN & BARNETT, 1992), que diferem em preferência ao transporte de glicose e frutose pelas células. Glicoquinase fosforila somente glicose; Hxk1 têm um $V_{\max}$ três vezes maior para frutose do que para glicose; Hxk2 têm um $V_{\max}$ ligeiramente mais alto para glicose do que para frutose (BERNARD, 1975; ENTIAN & MECKE, 1982). A afinidade de Hxk1 para glicose ($K_m = 0,12$ mM) é mais alta que para frutose ($K_m = 1,5$ mM), porém o $V_{\max}$ é mais alto para frutose. Hxk2 também têm maior afinidade para glicose ($K_m = 0,25$ mM) que para frutose ($K_m = 1,5$ mM). Conseqüentemente, a afinidade para glicose é ligeiramente mais alta para Hxk1 que para Hxk2, enquanto que a afinidade para frutose é semelhante (BERNARD, 1975; ENTIAN & MECKE, 1982). Na primeira fase da fermentação de vinho, na qual a levedura está ativamente se reproduzindo, a expressão de *HXK2* é mais alta e na segunda fase de crescimento, onde as células necessitam de fonte de nitrogênio, ocorre redução na expressão de *HXK2*, enquanto a expressão de *HXK1* e *GLK1* aumenta (VARELA *et al.*, 2005). Após a fosforilação, glicose-6-fosfato é convertida pela fosfoglicoisomerase em frutose-6-fosfato, e deste ponto, o metabolismo de glicose e frutose é o mesmo. Assim, só há dois passos na via de fermentação, o transporte e a fosforilação, nas quais diferenças podem acontecer, e isso explicaria a discrepância de glicose e frutose (BERTHELIS *et al.*, 2007).

Apesar de serem objetos de exaustiva investigação, os mecanismos através dos quais ocorre a repressão catabólica e outros processos de sinalização e regulação celular não estão totalmente elucidados.

I.2.2. Fontes de nitrogênio

A maioria dos trabalhos realizados sobre o metabolismo de 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. O consumo de compostos nitrogenados mais complexos, como proteínas, por *Saccharomyces cerevisiae* só ocorrem após sua hidrólise a aminoácidos simples, dipeptídeos ou tripeptídeos (STEWART & RUSSEL, 1998).

Para selecionar a melhor opção de utilização de nutrientes frente a ampla diversidade de fontes de carbono e 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 vinho, sugere-se que as interações mútuas desses nutrientes podem ter efeitos importantes no metabolismo de leveduras (SCHNEPER *et al.*, 2004; PETER *et al.*, 2006).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* necessitam relativamente de grande quantidade de nutrientes para completar a fermentação de vinho e produzir de 12-15% (v/v) de etanol. O nitrogênio assimilável é identificado como um nutriente essencial para completar o processo fermentativo de forma eficiente (VILANOVA *et al.*, 2007), pois se trata de um elemento encontrado em quase todas as macromoléculas dos organismos vivos (COOPER, 1982). As principais fontes de nitrogênio assimiláveis por leveduras são aminoácidos, íon amônio e pequenos peptídeos (VILANOVA *et al.*, 2007). Tal habilidade requer permeases para o transporte desses compostos e enzimas para a geração de amônio pelo seu metabolismo (IRAQUI *et al.*, 1999; MAGASANIK & KAISER, 2002). Mais de 20 sistemas de transporte específicos medeiam o transporte ativo de aminoácidos pela membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*, e várias permeases foram caracterizadas geneticamente (JAUNIAUX & GRENSON, 1990). Cada transportador é específico para um ou alguns L-aminoácidos e sua síntese é geralmente constitutiva. Além dos sistemas específicos, *Saccharomyces cerevisiae* possui um sistema de transporte geral de aminoácido, o transportador Gap (“general amino acid permease”), codificado pelo gene *GAP1*. Essa permease apresenta elevada

especificidade para o transporte de substratos, incluindo a maioria do L- e D- isômeros de aminoácidos básicos, neutros e ácidos (JAUNIAUX & GRENSON, 1990; HORÁK, 1997). Após o transporte, as fontes de nitrogênio são rapidamente acumuladas pelas leveduras na fase inicial da fermentação, onde são necessários aminoácidos para a síntese de proteínas e produção de biomassa, enquanto que o excesso é armazenado em vacúolos celulares, portanto, a insuficiência de compostos nitrogenados no meio de cultura pode provocar baixa produção de biomassa, afetar o processo fermentativo e a conclusão do mesmo (BELTRAN *et al.*, 2005; VILANOVA *et al.*, 2007).

Nem todas as fontes de nitrogênio propiciam crescimento igualmente eficiente: a glutamina juntamente com o glutamato, o amônio e a asparagina são considerados fontes primárias de nitrogênio, portanto, a presença desses nutrientes no meio de cultura controla a atividade das permeases, e por isso são utilizadas preferencialmente. O mecanismo no qual ocorre o controle do transporte está envolvido na repressão da síntese da permease e na inativação reversível da mesma (JAUNIAUX & GRENSON, 1990). Quando essas fontes primárias estão limitadas ou próximas da exaustão, o organismo pode expressar seletivamente genes cujos produtos permitem utilizar muitas outras fontes de nitrogênio secundárias, incluindo outros aminoácidos, peptídeos e proteínas (COOPER, 1982; HORÁK, 1986). 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 e/ou doando seu derivado α -cetoácido após a desaminação enzimática para outros processos metabólicos (MAGASANIK, 1992). Assim, glutamato, glutamina e amônio desempenham funções essenciais no metabolismo central de nitrogênio (TER SCHURE *et al.*, 2000).

Os peptídeos constituem outra fonte importante de nitrogênio e seus sistemas de transporte estão presentes em bactérias, fungos, plantas e tecidos de mamíferos. Esse transporte é um processo bioquímico específico em que peptídeos pequenos (com menos de seis aminoácidos) passam através da membrana plasmática por transporte ativo (STEINER *et al.*, 1994). Esse transporte de pequenos peptídeos contendo de dois a cinco resíduos de aminoácidos também são utilizados por *Saccharomyces cerevisiae*, e esses são transportados via dois sistemas de transportes: sistema transportador PTR ("Peptide Transport"), onde são transportados dipeptídeos e tripeptídeos e sistema transportador OPT ("OligoPeptide Transport"), onde são transportados oligopeptídeos contendo de 4 a 5 aminoácidos (WILES *et al.*, 2006).

Visto que as leveduras são capazes de utilizar diferentes compostos nitrogenados e diferentes fontes de carbono, os estudos referentes ao transporte desses nutrientes e a relação entre o metabolismo do carbono e nitrogênio se fazem necessário para atingir um produto final de qualidade e de forma eficiente, onde a produção de etanol, o sabor e o aroma são características importantes do produto fermentado.

Objetivos

II. Objetivos

O presente trabalho apresenta como objetivo geral identificar as etapas ou estados fisiológicos importantes que determinam o desempenho fermentativo de leveduras industriais em meio de cultivo suplementado com fontes de nitrogênio apresentando diferentes graus de complexidade estrutural. Para isto foram utilizadas leveduras empregadas em vinícolas. Os objetivos principais foram:

1 - Estudar a utilização de glicose, frutose e uma mistura equimolar de glicose mais frutose por leveduras industriais em meio contendo fontes estruturalmente complexas de nitrogênio, em diferentes condições de crescimento: com e sem agitação;

2 - Analisar a composição de aminoácidos livres e na forma peptídica presentes nos meios de cultura antes e após a fermentação.

3 - Analisar a distribuição de peptídeos nos meios de cultura antes e após o processo fermentativo.

Material e Métodos

III. Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

III.1. Microrganismos utilizados

No presente estudo, foram utilizadas duas linhagens industriais de leveduras, **VIN7 e VIN13**, *Saccharomyces cerevisiae*, ambas de vinícola, cedidas pelo Dr. I. Pretorius, do The Australian Wine Research Institute, Austrália.

Apesar de ambas as linhagens fermentarem vinho, o estudo foi realizado com o intuito de se identificar às diferenças metabólicas no processo fermentativo, quanto à produção de etanol e outros parâmetros fermentativos analisados e também quanto à assimilação de diferentes fontes de nitrogênio, pressuposto que apresentam características genéticas diferentes.

III.2. Meios de cultivo

As células leveduriformes foram mantidas em meio YPD contendo 1,0% (p/v) de extrato de levedo, 2,0% (p/v) de peptona, 2,0% (p/v) de glicose, 2,0% (p/v) de agar e 100mL de água destilada q.b.. Após o preparo da solução, o meio foi dissolvido por aquecimento, distribuído em tubos de ensaio e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C e 1atm. Após a esterilização, os tubos foram mantidos inclinados a 10° até a solidificação.

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

Para a obtenção do meio de cultura completo, foram adicionadas assepticamente quantidades adequadas do meio contendo YNB e uma fonte de nitrogênio e do meio contendo a fonte de carbono de modo a apresentar 0,17% (p/v) de YNB, 1,0% (p/v) de fonte de nitrogênio e 20% (p/v) da fonte de carbono.

As fontes de nitrogênio utilizadas foram: preparações comerciais de hidrolisados enzimáticos de proteínas (Peptona), hidrolisados ácidos de proteínas (Casaminoácidos) e sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$.

III.3. Manutenção da cultura e preparo do inóculo

As culturas estoques das leveduras foram mantidas em meio YPD agar, inicialmente sendo incubadas por 48 horas a 30°C e posteriormente foram armazenadas a 4°C, sendo utilizadas por um período máximo de 10 dias.

O inóculo foi preparado a partir de leveduras coletadas da superfície da cultura estoque com alça de platina flambada e transferidas para tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada, a fim de se obter uma concentração final de 0,025mg de células/mL.

III.4. Condições de crescimento e obtenção da suspensão de células

O crescimento foi realizado em Erlenmeyer de 125mL com o volume de meio de 3,5 (sem agitação) a 5 (com agitação) vezes menor que o volume do Erlenmeyer. Após a inoculação de 0,025mg de células/mL, sendo incubados a 30°C $\pm$ 1 sob duas formas: em repouso em estufa BOD Tecnal TE-391 ou sob agitação a 200rpm, em mesa agitadora New Brunswick Scientific Co. Inc.

Os parâmetros fermentativos foram obtidos através da determinação da produção de biomassa, viabilidade celular, pH, utilização de açúcar e da fonte de nitrogênio e produção de etanol (Figura 2). Para isto, periodicamente, foram coletados 0,7mL de amostra do meio de cultura, onde a partir desse volume, uma alíquota foi retirada para determinar a biomassa, a viabilidade celular e o pH. O restante do material foi centrifugado, separando-se as células do meio de cultura. O meio de cultura foi estocado a -5°C para posteriores análises da utilização da fonte de carbono, fonte de nitrogênio e produção de etanol.

III.5. Determinação dos parâmetros fermentativos

III.5.1. Determinação da produção de biomassa

As análises do crescimento celular foram realizadas periodicamente através de medidas turbidimétricas a 570nm, 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 *Saccharomyces 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, por duas horas, de 1,0mL de cada suspensão filtrada em membrana Millipore.

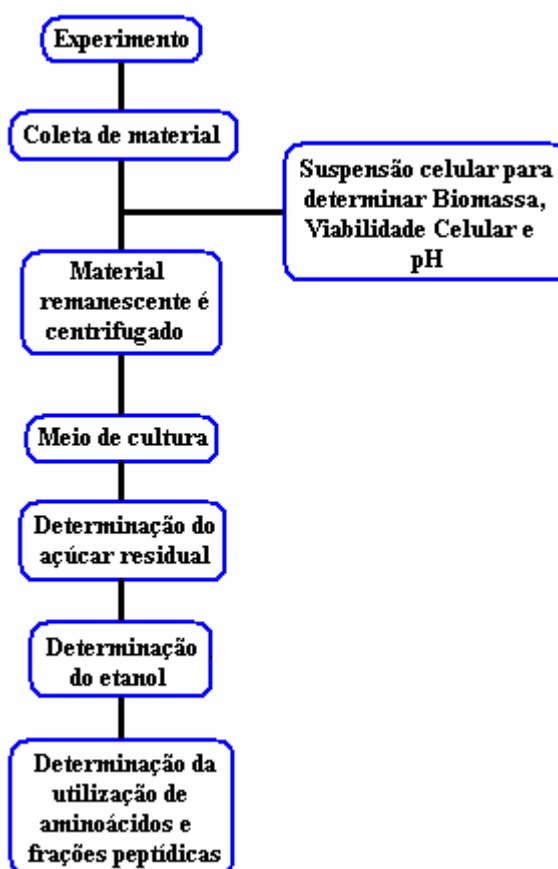


Figura 2: Fluxograma de execução para determinação dos parâmetros fermentativos.

III.5.2. 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, 100µL de amostra foram transferidos para 900 µL da solução padrão de azul de metileno (0,025g de azul de metileno; 0,9g NaCl; 0,042g KCl; 0,048g CaCl₂.6H₂O; 0,02g NaHCO₃ para 100mL 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 apresentaram-se incolores, enquanto as não viáveis coloridas.

III.5.3. Determinação do pH

A determinação do pH procedeu-se utilizando tiras com indicadores coloridos, cuja alteração indica determinados pHs.

III.5.4. Medidas do consumo de nutrientes e produção de etanol

O consumo de açúcar foi determinado através de medidas colorimétricas, utilizando-se o método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico - 1g; tartarato de sódio e potássio - 30g; NaOH 1M - 40mL, e o volume completado a 100mL) (MILLER, 1959), que baseia-se no poder redutor de açúcares, originando um composto colorido, 3-amino 5-nitro salicílico, que absorve em 546nm. A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa, a determinação da concentração de aminoácidos foi realizada utilizando um analisador automático de aminoácidos e as distribuições de peptídeos nas amostras foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

III.5.4.1. Açúcar residual

Para a dosagem do açúcar, as amostras obtidas foram adequadamente diluídas e 0,5mL da amostra diluída, juntamente com 1,0mL do reagente DNS e 2,0mL de H₂O foram adicionados em respectivos tubos de ensaio. O tubo contendo o branco foi preparado adicionando-se 0,5mL 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. Como padrão, utilizou-se uma solução de glicose com concentração conhecida.

III.5.4.2. Determinação da concentração 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/min. A vazão do hidrogênio foi de 30 mL/min e do ar sintético de 300mL/min. Foi utilizada uma solução de etanol como padrão e a curva de calibração foi obtida com soluções de etanol 0,5 e 1% (v/v).

III.5.4.3. Determinação da concentração de aminoácidos

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método da derivatização pós-coluna por *orto*-phtalaldeído em analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. Foi utilizada uma coluna de troca iônica catiônica de poliestireno divinil benzeno derivatizada com grupos sulfônicos (-SO₃H). O sistema foi periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos contendo 2,5µmol de aminoácidos/mL diluído 1:25, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra.

As análises foram realizadas com amostras com e sem hidrólise ácida. Nas análises realizadas com hidrólise, 100µL das amostras contendo peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio foram hidrolisadas em 1mL de HCl 6M, na presença de 0.08mL de fenol a 5% em H₂O, a 110°C por 72h em atmosfera de N₂. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido em tampão de diluição NaS, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex – Millipore antes de ser injetado no aparelho.

III.5.4.4. Determinação da distribuição de peptídeos

As determinações da distribuição de peptídeos foram realizadas em modo analítico utilizando um HPLC Shimadzu LC-10A/C-47A, com coluna de fase reversa C18 apolar Ultrasphere BECKMAN de dimensão 4,6mm x 25cm e poro de 5µm.

Solventes: A: 0,045% TFA.H₂O

B: 0,036% TFA.ACN

Gradiente: 1% a 31% de solvente B em 30 minutos.

III.6. Reprodutibilidade

Os dados apresentados neste relatório representam a média de pelo menos três experimentos repetidos de forma idêntica.

Resultados

IV. Resultados

Neste trabalho estudou-se a utilização de glicose e frutose separadamente, e uma mistura de glicose mais frutose por linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas na produção de vinho. A escolha destes açúcares deveu-se ao fato dos mostos de produção de vinho terem como fonte de carbono uma mistura equimolar de glicose e frutose, em concentrações em torno de 20 a 22% (p/v) (BERTHELS *et al.*, 2007). Considerando que a maioria dos meios industriais contém açúcares e compostos nitrogenados com composição estruturalmente complexa (STEWART & RUSSELL, 1998; MORENO-ARRIBAS *et al.*, 2002), neste trabalho estudou-se o efeito da fonte de nitrogênio no metabolismo de leveduras industriais, agora empregando duas linhagens, VIN7 e VIN13, utilizadas na produção de vinhos (BERTHELS *et al.*, 2004). As fontes de nitrogênio utilizadas foram preparações comerciais de hidrolisados enzimáticos de proteínas (Peptona), hidrolisados ácidos de proteínas (Casaminoácidos) e sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Essas fontes de nitrogênio foram escolhidas por serem comumente utilizadas como constituintes no meio de cultura e por apresentarem diferentes graus de complexidade estrutural devendo interferir diretamente no fluxo metabólico das leveduras quanto à assimilação e utilização como fonte de nitrogênio e também na mutua interação que deve ocorrer com a fonte de carbono.

A principal fonte de carbono utilizada neste trabalho foi uma mistura equimolar de glicose e frutose, nas mesmas concentrações encontradas nos mostos de produção de vinhos (em torno de 20% p/v), além de glicose e frutose na mesma concentração. A importância da utilização dessas duas fontes de carbono, além do fato de serem os açúcares presentes em mostos de produção de vinhos, deve-se ao fato de que ambos são considerados açúcares repressores, ou seja, são utilizados preferencialmente quando em uma mistura com outros açúcares não repressores, fazendo com que os açúcares não repressores sejam utilizados somente quando esses monossacarídeos forem exauridos do meio. Um outro aspecto é que *Saccharomyces* são organismos glicofílicos, isto é, tem preferência por glicose. Num meio contendo os dois açúcares, frutose é utilizada concomitantemente, entretanto, a glicose é exaurida mais rapidamente, o que causa uma discrepância no consumo de glicose e frutose ao longo da fermentação, e muitas vezes com graves consequências industriais (BERTHELS *et al.*, 2004; BERTHELS *et al.*, 2007). Além das fontes de carbono e nitrogênio, os meios

utilizados neste trabalho, continham vitaminas, sais minerais e elementos traços obtidos da base nitrogenada YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônio. As fermentações foram conduzidas em duas condições diferentes: com agitação e sem agitação.

IV.1. Estudos realizados com diferentes fontes carbono e nitrogênio com e sem agitação

Nos resultados descritos neste item, os meios de cultura continham uma mistura de glicose 10% (p/v) e frutose 10% (p/v) totalizando 20% (p/v), glicose 20% (p/v) e frutose 20% (p/v) e a concentração da fonte de nitrogênio de 1% (p/v), em diferentes condições de crescimento: com e sem agitação.

IV.1.1. Estudos realizados com glicose mais frutose

Nos estudos da utilização de glicose mais frutose por leveduras industriais VIN7 e VIN13, os meios continham fontes estruturalmente complexas de nitrogênio na forma de hidrolisado enzimático de proteínas (peptona), hidrolisado ácido de proteínas (casaminoácidos) ou sulfato de amônio. As figuras 3 e 4 (com agitação) e figuras 5 e 6 (sem agitação) mostram o acúmulo de biomassa, viabilidade celular, monitoramento do pH, consumo de açúcar e produção de etanol. Cumpre lembrar que os mostos de produção de vinho têm como fonte de carbono a mistura destes dois monossacarídeos.

Para as análises realizadas com agitação, a fonte nitrogenada que propiciou melhor desempenho fermentativo, foi a peptona, com maior acúmulo de biomassa e produção de etanol, consumo de açúcar mais eficiente e manutenção da viabilidade celular. Para as linhagens VIN7 e VIN13, o desempenho fermentativo no meio suplementado com casaminoácidos e sulfato de amônio foi inferior, porém, a linhagem VIN13 mostrou ser mais eficiente que a linhagem VIN7 para os parâmetros analisados, e estes resultados sugerem que estas duas linhagens apresentam diferentes exigências com relação às fontes de nitrogênio.

Os resultados das análises realizadas sem agitação, mostraram que, as linhagens VIN7 e VIN13 apresentam desempenho fermentativo satisfatório para as três fontes de nitrogênio com a manutenção da viabilidade celular, consumo de açúcar e produção eficiente de etanol. A linhagem VIN13 mostrou maior produção de biomassa

nas três fontes de nitrogênio, quando comparada com a linhagem VIN7, sendo maior no meio com peptona.

A variação do pH durante o crescimento das linhagens foi constantemente monitorada. Os meios com peptona e casaminoácidos apresentaram uma queda de pH para valores próximos de 3,0, partindo-se de um pH inicial de 5,0. O meio contendo sulfato de amônio teve seu pH monitorado e reajustado com NaOH 1M para valores próximos de 5,0 em todas as coletas realizadas, pois análises realizadas sem o ajuste, mostraram que, nessa fonte nitrogenada, a queda de pH é mais acentuada, atingindo valores próximos de 2,0 (CRUZ *et al.*, 2003), portanto, podendo ter influência no desempenho fermentativo das linhagens VIN7 e VIN13.

A tabela 1 compara os valores dos parâmetros fermentativos obtidos para as linhagens VIN7 e VIN13 na fermentação de glicose mais frutose na presença de diferentes fontes nitrogenadas com diferentes complexidades estruturais em análise realizadas com e sem agitação. Os resultados obtidos mostraram forte impacto que a agitação exerce sobre o processo fermentativo, de modo que, nas análises realizadas sem agitação, foram observados valores consideráveis de manutenção da viabilidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol, principalmente no meio suplementado com sulfato de amônio, onde as linhagens VIN7 e VIN13 produziram concentrações elevadas de etanol próximo aos valores obtidos com peptona e casaminoácidos. O desempenho fermentativo obtido no meio contendo a fonte nitrogenada sulfato de amônio foi possível, principalmente, devido à manutenção do pH do meio de fermentação com a adição de pequenos volumes de NaOH 1M.

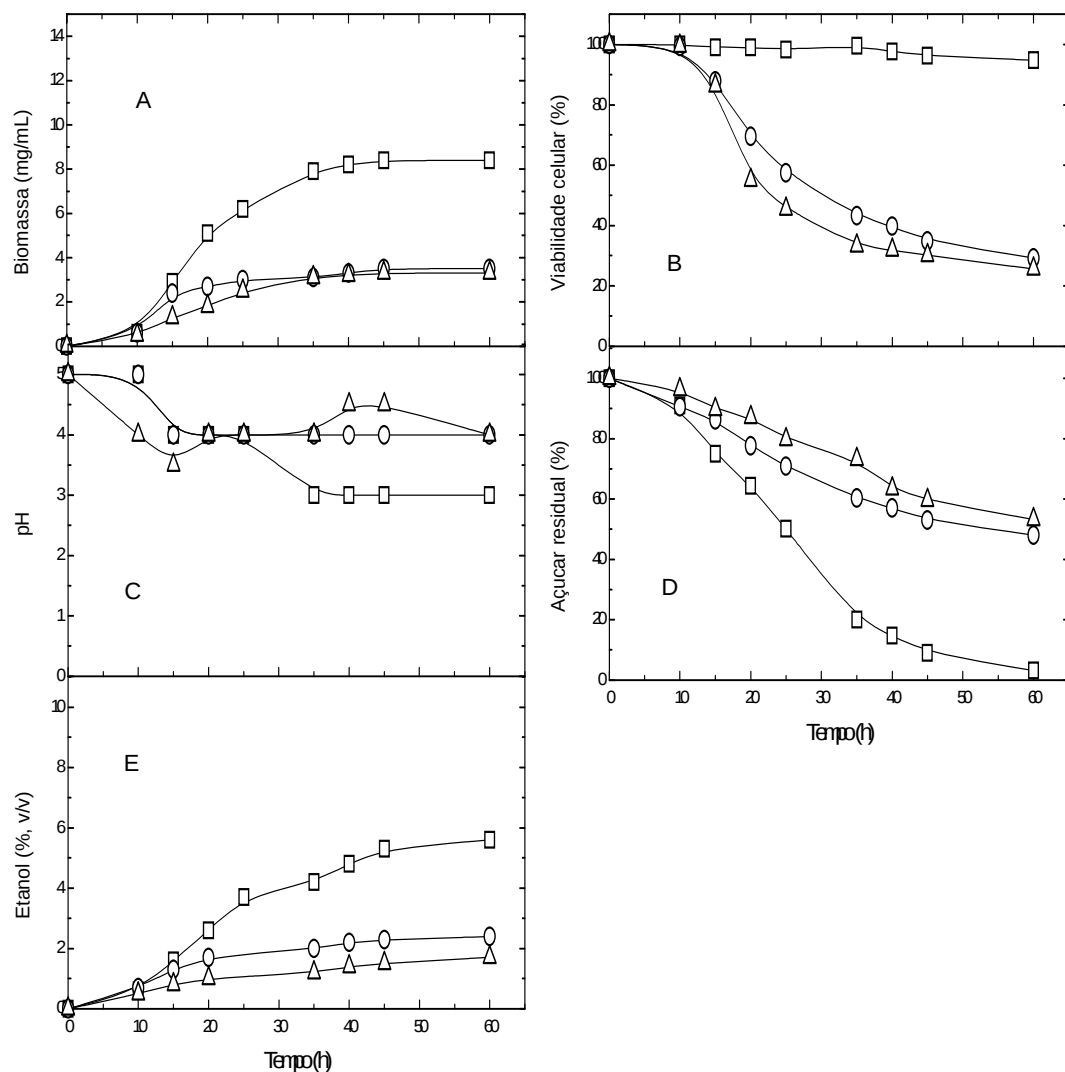


Figura 3: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C), consumo de açúcar (D) e produção de etanol (E) de *S. cerevisiae* (VIN7) durante crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 20% (p/v) de glicose e frutose. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

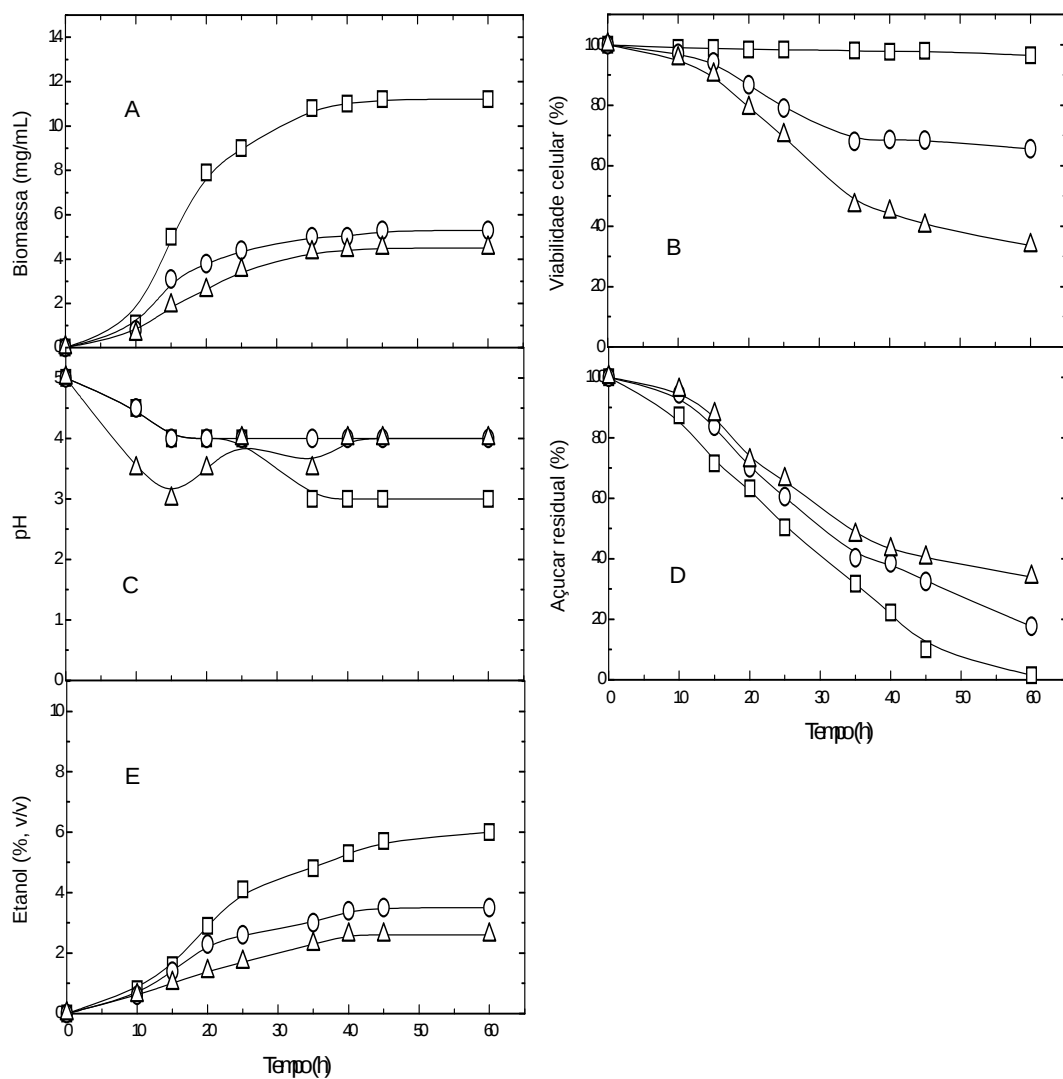


Figura 4: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C), consumo de açúcar (D) e produção de etanol (E) de *S. cerevisiae* (VIN13) durante crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 20% (p/v) de glicose e frutose. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

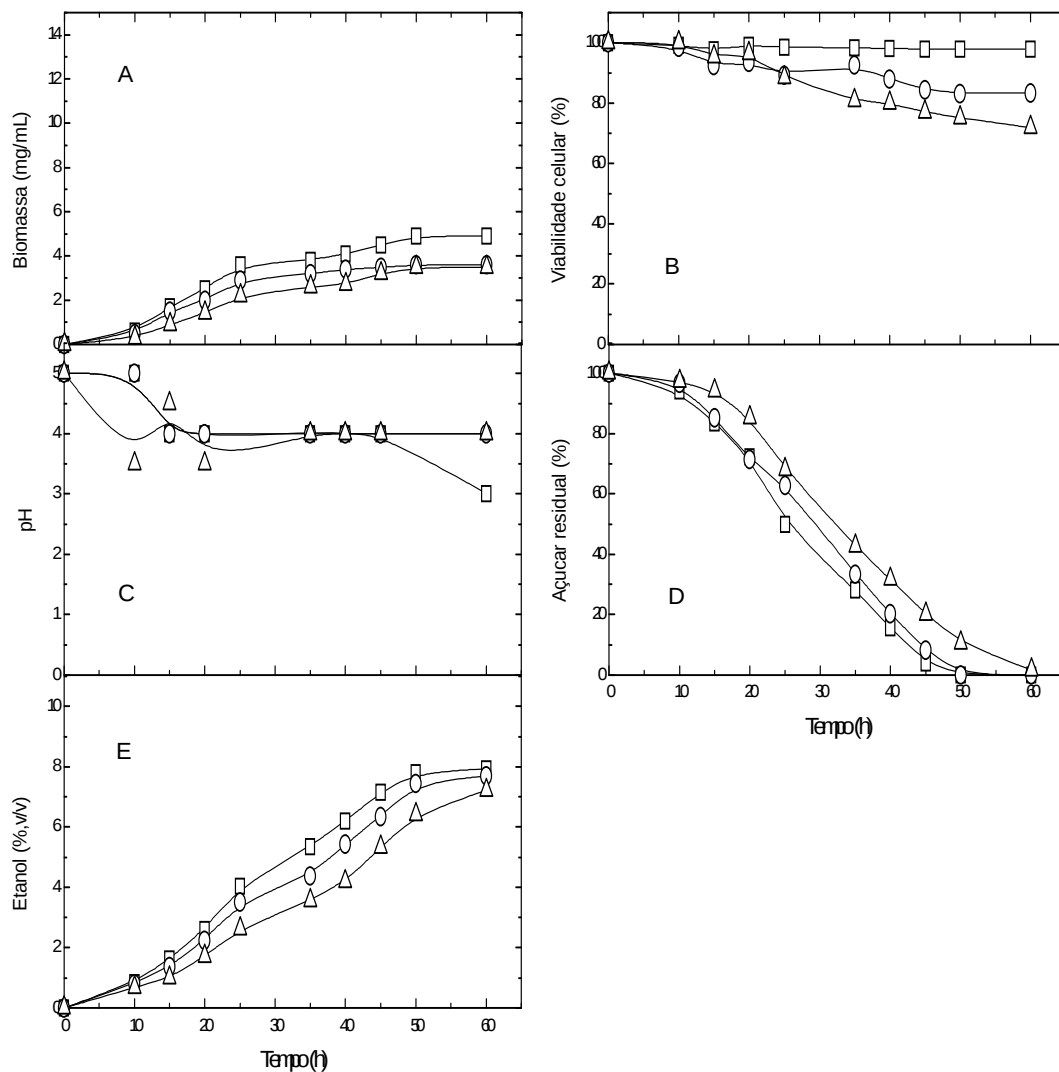


Figura 5: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C), consumo de açúcar (D) e produção de etanol (E) de *S. cerevisiae* (VIN7) durante crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 20% (p/v) de glicose e frutose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

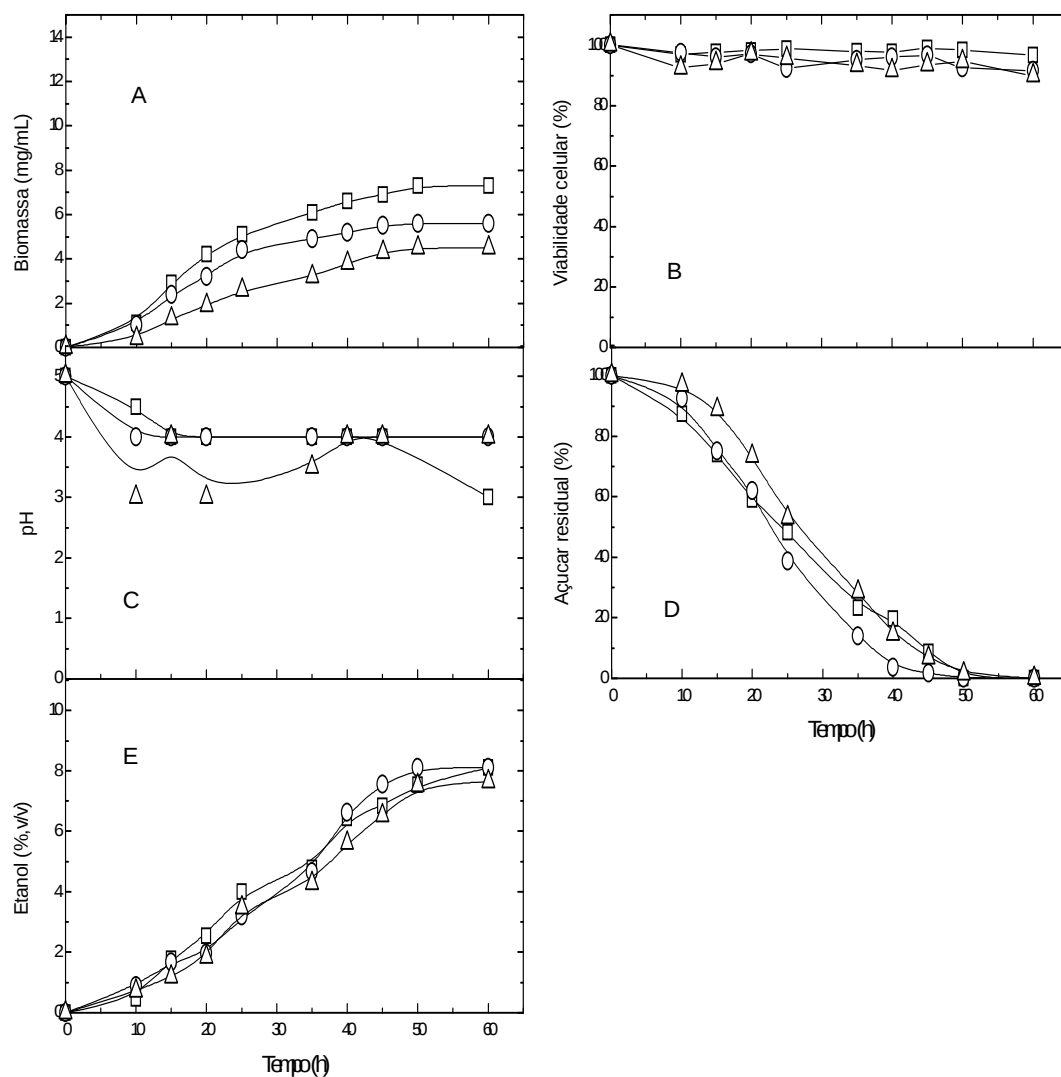


Figura 6: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C), consumo de açúcar (D) e produção de etanol (E) de *S. cerevisiae* (VIN13) durante crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 20% (p/v) de glicose e frutose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

IV.1.2. Estudos realizados com glicose

Os estudos realizados com glicose, suplementados com fontes de nitrogênio estruturalmente complexas para as linhagens VIN7 e VIN13 estão nas figuras 7 e 8 (com agitação) e figuras 9 e 10 (sem agitação), que mostram o acúmulo de biomassa, viabilidade celular, monitoramento do pH e consumo de açúcar.

Para as análises realizadas com agitação, observa-se que as linhagens, no geral, apresentaram maior produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e consumo de açúcar no meio suplementado com peptona. Nos meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio as linhagens mostraram ser menos eficiente para os parâmetros analisados. Entretanto, apesar deste desempenho inferior em casaminoácidos e sulfato de amônio, quando comparada com a linhagem VIN7, a VIN13 apresentou desempenho fermentativo superior, maior produção de biomassa, utilização mais eficiente de açúcar e manutenção da viabilidade celular. Nessas condições, a linhagem VIN13 mostrou ser mais versátil que a VIN7, isto é, menos dependente da fonte de nitrogênio, para os parâmetros analisados.

Os resultados das análises realizadas sem agitação são diferentes dos descritos com agitação e mostraram que as duas linhagens VIN7 e VIN13, produziram menos biomassa, mantiveram a viabilidade celular e consumiram açúcar eficientemente nas três fontes de nitrogênio analisadas, apresentando uma produção de biomassa um pouco maior no meio suplementado com peptona. A linhagem VIN13 mostrou uma maior produção de biomassa no meio suplementado com peptona, havendo uma pequena queda nos meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, mas manteve a viabilidade celular e consumiu açúcar eficientemente para as três fontes de nitrogênio analisadas.

Pode-se observar que o comportamento fermentativo das linhagens difere consideravelmente dependendo da forma de cultivo, e no processo não agitado os parâmetros fermentativos são muitos superiores ao cultivo com agitação, isto é, para as três fontes de nitrogênio obteve-se utilização eficiente de glicose e manutenção da viabilidade celular.

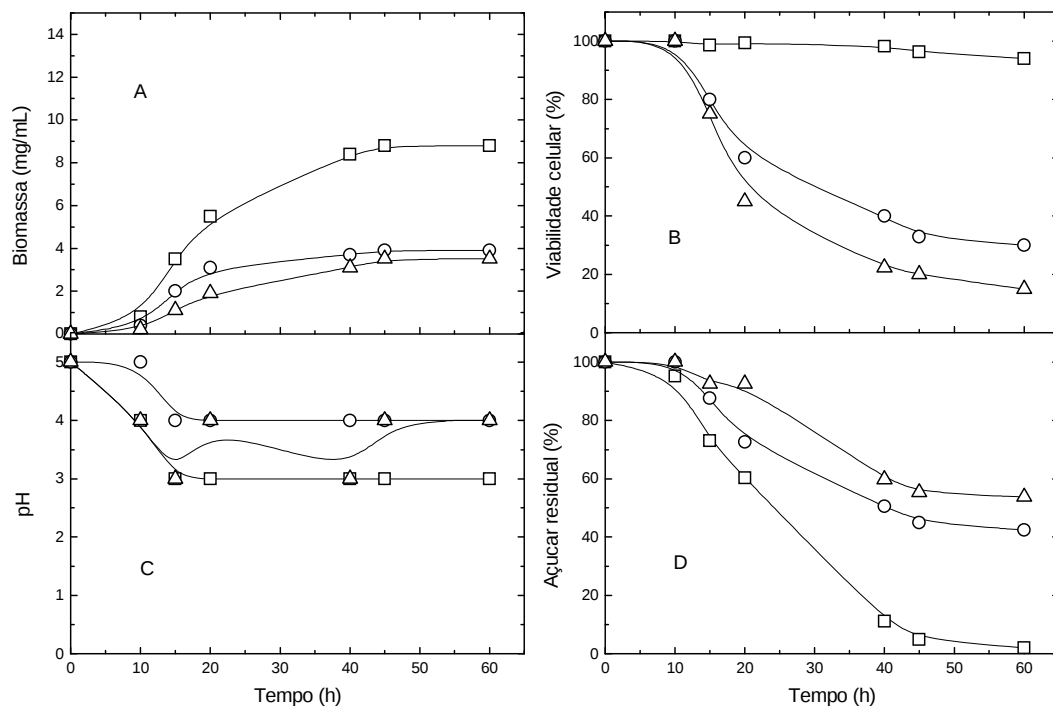


Figura 7: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) de *S. cerevisiae* (**VIN7**) durante crescimento aeróbico em meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e **20% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

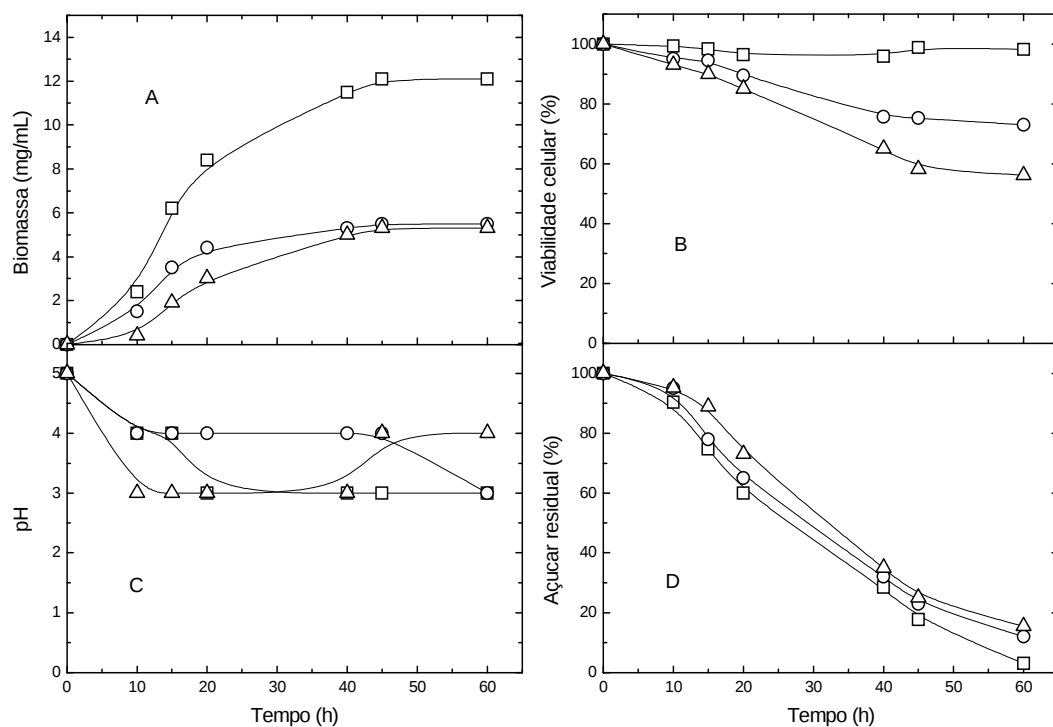


Figura 8: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) de *S. cerevisiae* (**VIN13**) durante crescimento aeróbico em meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e **20% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

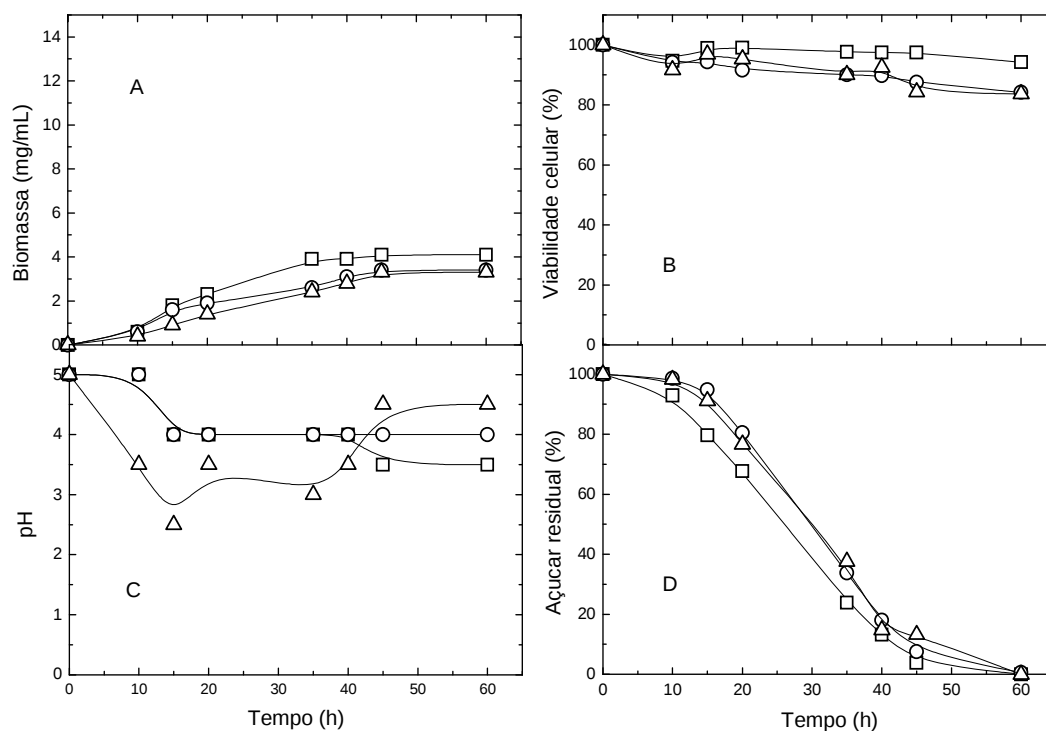


Figura 9: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) de *S. cerevisiae* (VIN7) durante crescimento anaeróbico em meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e **20% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 0,1M.

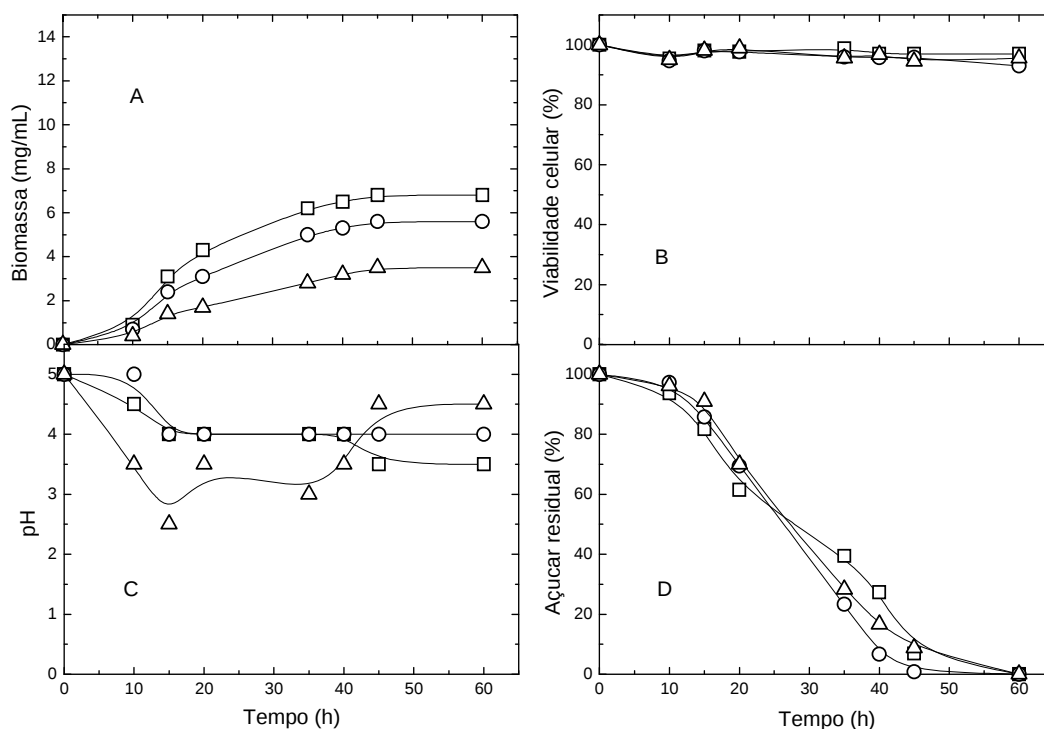


Figura 10: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) de *S. cerevisiae* (**VIN13**) durante crescimento anaeróbico em meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e **20% (p/v) de glicose**. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 0,1M.

IV.1.3. Estudos realizados com frutose

Os estudos realizados com frutose, suplementados com fontes de nitrogênio estruturalmente complexas para as linhagens VIN7 e VIN13 estão nas figuras 11 e 12 (com agitação) e figuras 13 e 14 (sem agitação), que mostram o acúmulo de biomassa, viabilidade celular, monitoramento do pH e consumo de açúcar.

Como descrito nos estudos realizados com glicose e glicose mais frutose, para as análises realizadas com agitação, a fonte nitrogenada que propiciou melhor desempenho fermentativo foi a peptona, havendo considerável perda da viabilidade celular e redução do consumo de açúcar, para ambas as linhagens, nos meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio. Entretanto, a linhagem VIN13, no geral, apresentou desempenho superior quando comparado com a VIN7.

Nos experimentos realizados sem agitação, é que se observou a maior dificuldade das linhagens VIN7 e VIN13 em utilizarem frutose, quando comparado com as outras fontes de carbono. O melhor desempenho fermentativo continuou sendo observado em peptona. Nos meios complementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, obteve-se menor produção de biomassa, maior perda de viabilidade celular e uma redução considerável no consumo de açúcar quando comparado com as outras fontes de carbono. As duas linhagens estudadas apresentam menor desempenho em frutose, mas pode-se observar a utilização diferenciada de frutose pelas duas linhagens em meios complementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, onde a quantidade de açúcar residual e a perda de viabilidade são maiores para a linhagem VIN7.

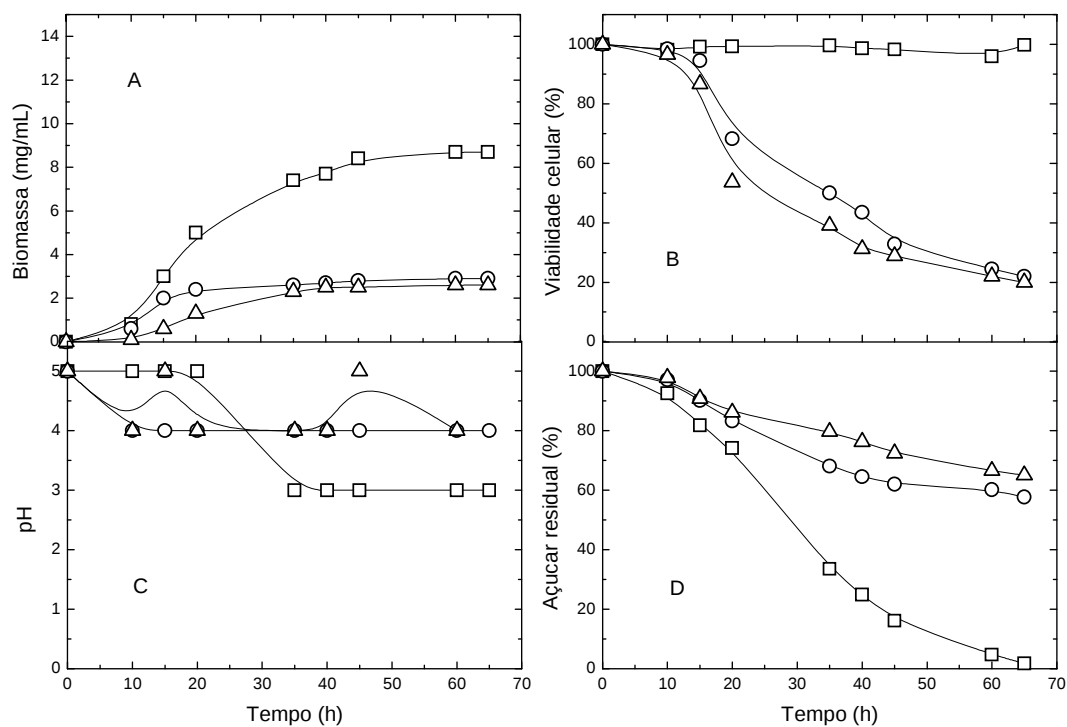


Figura 11: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) de *S. cerevisiae* (VIN7) durante crescimento aeróbico em meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e **20% (p/v) de frutose**. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

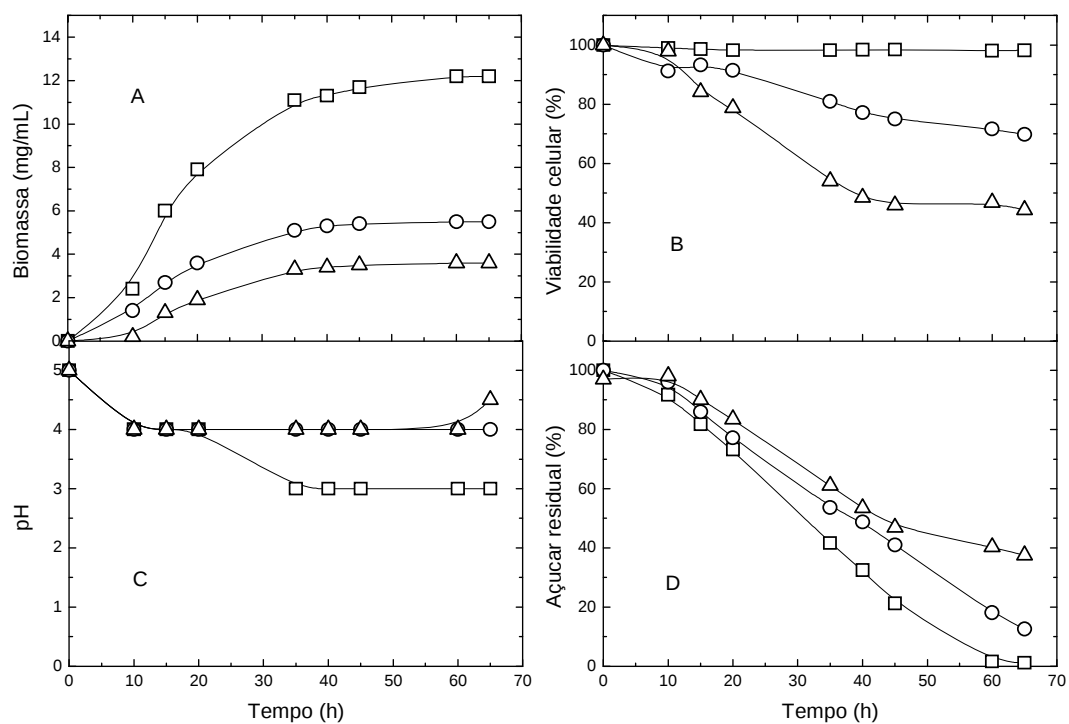


Figura 12: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) de *S. cerevisiae* (**VIN13**) durante crescimento aeróbico em meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e **20% (p/v) de frutose**. Condições de cultivo: 30°C, 200rpm e pH inicial 5,0, sendo o pH do meio contendo sulfato de amônio, reajustado para 5,0 com NaOH 1M.

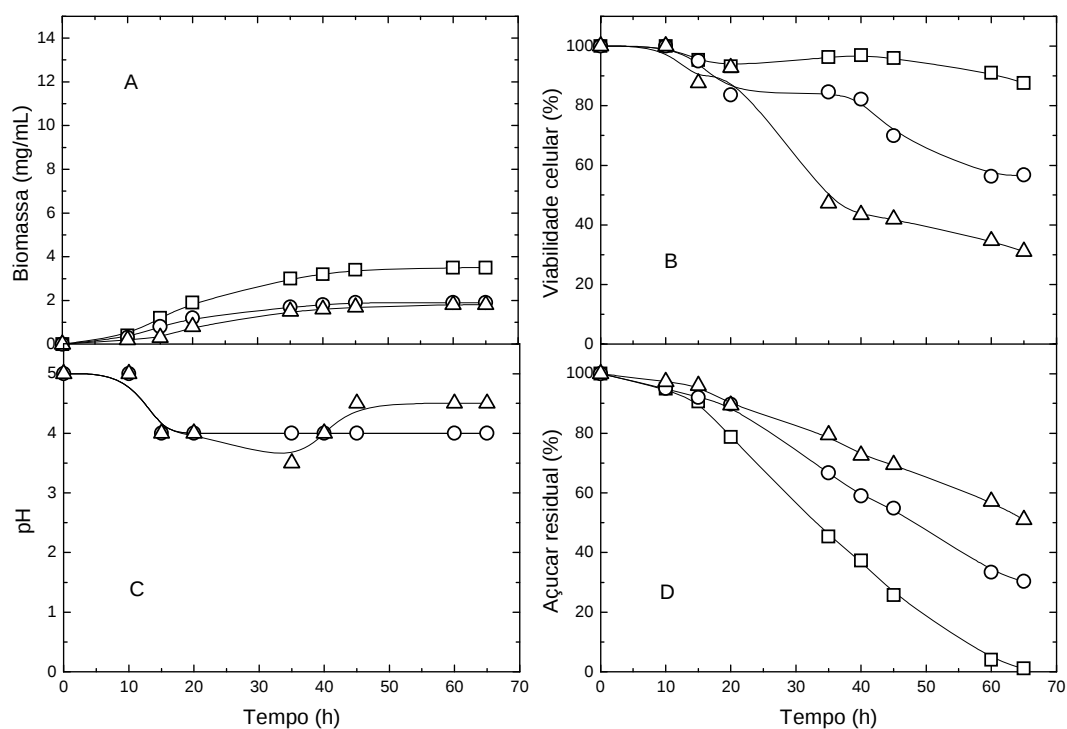


Figura 13: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) de *S. cerevisiae* (**VIN7**) durante crescimento anaeróbico em meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e **20% (p/v) de frutose**. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

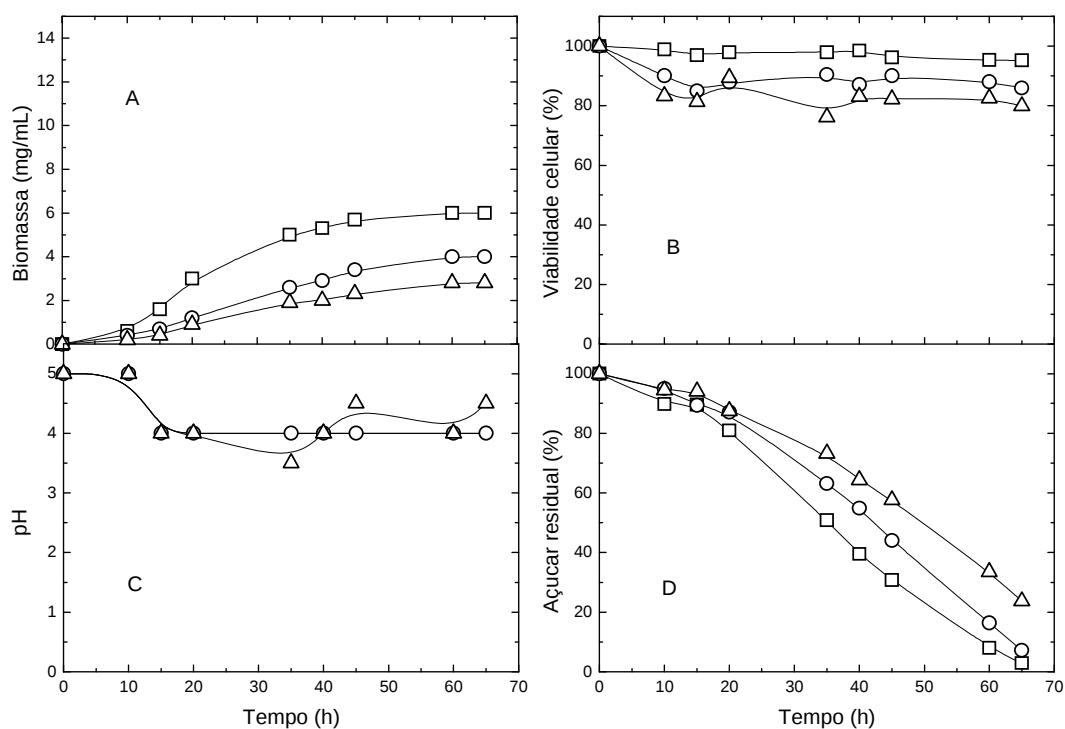


Figura 14: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) de *S. cerevisiae* (**VIN13**) durante crescimento anaeróbico em meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e **20% (p/v) de frutose**. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

IV.1.4. Análise comparativa dos parâmetros fermentativos das linhagens vinícolas

A tabelas 1, 2 e 3 mostram um resumo dos parâmetros fermentativos para as diferentes linhagens de vinícola crescidas em glicose mais frutose 20% (p/v) (tabela 1), glicose 20% (p/v) (tabela 2) e frutose 20% (p/v) (tabela 3) utilizando diferentes fontes nitrogenadas para as duas linhagens analisadas. Os resultados obtidos refletem as diferenças metabólicas das leveduras, mostrando o efeito de fontes nitrogenadas estruturalmente complexas no fluxo metabólico do carbono nos parâmetros fermentativos analisados.

Para as análises realizadas com a fonte de carbono na concentração de 20% (p/v), para as linhagens VIN7 e VIN13, nas três fontes de carbono utilizadas, a fonte nitrogenada em que se obteve melhor resultado foi a peptona, com maior produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono. A agitação (presença de oxigênio) exerceu forte impacto no processo fermentativo, nos meios complementados com casaminoácidos e sulfato de amônio. Como observado nos cultivos com glicose mais frutose 20% (p/v), nestes dois complementos, obteve-se baixa produção de biomassa e etanol, como reflexo da utilização ineficiente de açúcar, além de induzir a perda de viabilidade celular.

O impacto exercido pela agitação foi confirmado quando foram realizadas análises sem agitação. No geral, as leveduras produziram menos biomassa, mas mantiveram a viabilidade celular e consumiram eficientemente a fonte de carbono na fermentação de glicose e na mistura de glicose mais frutose, obtendo-se no ultimo, alta produção de etanol.

As duas linhagens de levedura não fermentaram frutose tão eficientemente como ocorreu com glicose e glicose mais frutose, e os efeitos sobre os parâmetros fermentativos se refletiram acentuadamente nos experimentos sem agitação (Figuras 13 e 14- e Tabela 3).

A linhagem VIN13 mostrou ser mais eficiente que a linhagem VIN7, pois produziu mais biomassa, manteve sua viabilidade celular mais elevada, mesmo quando as análises foram realizadas aerobicamente, produzindo maiores concentrações de etanol (nos cultivos contendo glicose mais frutose) para as três fontes de nitrogênio analisadas. A linhagem VIN13 mostrou ser mais versátil, isto é, menos dependente da fonte de nitrogênio que a linhagem VIN7, porém, um fato importante a ser observado

para a linhagem VIN7, é que apesar de ter produzido menos biomassa com sua viabilidade menor que a linhagem VIN13 no cultivo contendo glicose mais frutose, produziu concentrações de etanol quase nas mesmas concentrações produzidas pela linhagem VIN13.

Tabela 1: Produção de biomassa, viabilidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol por linhagens industriais de leveduras utilizadas em vinícola cultivadas em meio YNB contendo 20% (p/v) de glicose e frutose 1% (p/v) de diferentes fontes de nitrogênio.

Forma de cultivo	Linhagens	Tempo (h)	Peptona					Casaminoácidos					Sulfato de Amônio				
			Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Etanol (%v/v)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Etanol (%v/v)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Etanol (%v/v)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)
Com agitação (200rpm)	VIN7	20	5,10	99,00	64,30	2,60	2,70	69,50	77,60	1,70	1,80	55,00	87,00	1,00			
		60	8,40	94,80	3,00	5,60	3,50	29,20	48,00	2,40	3,30	25,60	53,20	1,70			
	VIN13	20	7,90	98,40	63,30	2,90	3,80	86,70	70,00	2,30	2,60	79,00	72,40	1,40			
		60	11,20	96,50	1,50	6,00	5,30	65,60	17,70	3,50	4,50	33,60	33,90	2,60			
Sem agitação	VIN7	20	2,50	99,30	72,30	2,61	2,00	93,40	71,60	2,24	1,40	96,50	85,20	1,71			
		60	4,90	98,00	0,00	7,93	3,60	83,30	0,00	7,70	3,50	72,00	1,60	7,21			
	VIN13	20	4,20	98,10	59,10	2,54	3,20	97,00	62,00	1,97	1,90	97,10	73,50	1,83			
		60	7,30	96,60	0,00	8,10	5,60	91,70	0,00	8,10	4,50	89,90	0,00	7,63			

Condições de fermentação: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

Tabela 2: Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por linhagens industriais de leveduras utilizadas em vinícola cultivadas em meio YNB contendo 20% (p/v) de glicose e 1% (p/v) de diferentes fontes de nitrogênio.

Forma de cultivo	Linhagens	Tempo (h)	Peptona				Casaminoácidos				Sulfato de Amônio			
			Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)
Com agitação (200rpm)	VIN7	20	5,50	99,40	60,30	3,10	60,00	72,60	1,90	45,00	92,50			
		60	8,80	94,00	2,00	3,90	30,00	42,40	3,50	15,00	53,70			
	VIN13	20	8,40	96,50	60,00	4,40	89,50	65,00	3,00	85,00	73,00			
		60	12,10	98,20	3,10	5,50	73,00	12,00	5,30	58,20	15,50			
Sem agitação	VIN7	20	2,30	99,00	67,70	1,90	91,60	80,50	1,40	95,30	76,60			
		60	4,10	94,20	0,00	3,40	84,20	0,60	3,30	83,60	0,00			
	VIN13	20	4,30	97,70	61,50	3,10	97,60	69,40	1,70	98,90	70,00			
		60	6,80	97,00	0,00	5,60	93,00	0,00	3,50	95,50	0,00			

Condições de fermentação: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

Tabela 3: Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por linhagens industriais de leveduras utilizadas em vinícola cultivadas em meio YNB contendo 20% (p/v) de frutose e 1% (p/v) de diferentes fontes de nitrogênio.

Forma de cultivo	Linhagens	Tempo (h)	Peptona				Casaminoácidos				Sulfato de Amônio			
			Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)
Com agitação (200rpm)	VIN7	20	5,00	99,30	74,10	2,40	68,20	83,20	1,30	53,60	86,10			
		65	8,70	99,80	1,80	2,90	22,00	57,70	2,60	20,00	65,00			
	VIN13	20	7,90	98,30	73,20	3,60	91,50	77,10	1,90	78,80	83,50			
		65	12,20	98,20	1,20	5,50	69,80	12,60	3,60	44,30	37,50			
Sem agitação	VIN7	20	1,90	93,20	78,70	1,20	83,60	89,70	0,80	92,80	89,40			
		65	3,50	87,60	1,10	1,90	56,80	30,30	1,80	31,10	51,00			
	VIN13	20	3,00	97,90	80,90	1,20	87,90	87,10	0,90	89,40	87,50			
		65	6,00	95,20	2,90	4,00	85,90	7,20	2,80	79,90	23,70			

Condições de fermentação: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

IV.2. Análise da composição de aminoácidos em peptona e casaminoácidos antes e após a fermentação

Os conteúdos de aminoácidos livres presentes nas fontes de nitrogênio estruturalmente complexas peptona e casaminoácidos foram determinados antes e após a hidrólise ácida destas preparações para se avaliar a concentração de aminoácidos na forma livre e a concentração na forma de peptídeos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.

As análises das composições de aminoácidos indicam que os casaminoácidos contém quantidades consideráveis de todos os aminoácidos, exceto cisteína e triptofano, que são destruídos após a hidrólise ácida. Esse estudo mostrou que, apesar de ser um hidrolisado ácido de proteínas, a maior parte dos aminoácidos encontram-se na forma de peptídeos, já que a quantidade total de aminoácidos livres varia de 1,93, antes da hidrólise ácida, para 5,99mg de aminoácidos/mL de meio, após a hidrólise ácida, correspondendo a 32,22% na forma livre.

A análise da composição de aminoácidos em peptona mostrou que a quantidade de aminoácidos livres é ainda menor, variando de 0,92, antes da hidrólise ácida, para 8,61mg de aminoácidos/mL de meio, após a hidrólise ácida, correspondendo a 10,68% na forma livre, e também que o aminoácido que se mostrou em maior concentração após a hidrólise ácida é a glicina, correspondendo a 29,73% do total de aminoácidos.

As tabelas 5 e 6 apresentam as determinações das quantidades residuais de aminoácidos livres em peptona e casaminoácidos com e sem hidrólise ácida, antes e após 60h de fermentação das linhagens VIN7 e VIN13 em meio contendo 20% (p/v) de glicose mais frutose sob duas condições de cultura: com agitação (tabela 5) e sem agitação (tabela 6).

Os resultados obtidos mostraram que todos os aminoácidos livres presentes em peptona foram consumidos pelas duas linhagens de leveduras nas duas condições de cultivo. Este fato não ocorreu com a fonte nitrogenada casaminoácidos, pois mesmo após a fermentação, a concentração de aminoácidos livres permaneceu alta, havendo uma pequena redução na cultura da linhagem VIN13 no meio agitado, e das linhagens VIN7 e VIN13 no meio não agitado, sendo que a maior redução é observada no cultivo da linhagem VIN13 no meio não agitado.

Na cultura da linhagem VIN7, com a fonte nitrogenada casaminoácidos no meio agitado, houve um aumento na concentração de aminoácidos livres. Os resultados

mostraram ainda que após a hidrólise ácida do meio fermentado por 60h suplementado com peptona houve um aumento na concentração de aminoácidos no meio de cultura das duas linhagens nos experimentos agitados e não agitados. Os valores obtidos das análises de aminoácidos indicam que após 60h de cultura, aminoácidos, peptídeos ou proteínas podem estar sendo secretados para o meio extracelular, o que causaria, principalmente após a hidrólise ácida, um aumento na concentração de aminoácidos.

Devido ao aumento de aminoácidos livres no meio de cultura após 60h de fermentação, foram realizadas análises de aminoácidos no meio fermentado pela linhagem VIN7, suplementada com a fonte nitrogenada peptona, em meio agitado, nos tempos de 20, 40 e 60h (tabela 7), antes e após a hidrólise ácida do meio de cultura. Os resultados mostraram que no tempo de 20h quase todos os aminoácidos livres antes da hidrólise ácida foram consumidos, e que após a hidrólise ácida, o aumento da concentração de aminoácidos com o decorrer do processo fermentativo foi gradativo.

A análise da composição de aminoácidos no meio de cultura contendo sulfato de amônio (tabela 8) para as linhagens VIN7 e VIN13, nas duas condições de cultivo após a hidrólise ácida do meio de cultura foi realizada para avaliar uma possível perda de aminoácidos, peptídeos ou proteínas devido à morte celular com o decorrer da fermentação, o que poderia causar a saída do conteúdo intracelular para o meio extracelular, provocando o aumento de aminoácidos livres após a hidrólise ácida de proteínas intracelulares. As análises foram realizadas com a fonte de nitrogênio sulfato de amônio, pelo fato de ser a fonte nitrogenada que propicia menores condições de fermentação, principalmente nos experimentos agitados, onde foi observada alta perda da viabilidade celular. Os resultados obtidos dessas análises mostraram que após a hidrólise ácida do meio de cultura, a concentração de aminoácidos livres é pequena, valores estes que não seriam interferentes nas análises do consumo das fontes de nitrogênio peptona e casaminoácidos, considerando que nos experimentos realizados com peptona e casaminoácidos, a viabilidade celular manteve-se elevada comparando-a com os cultivos realizados no meio contendo sulfato de amônio.

Tabela 4: Composição de aminoácidos em peptona e casaminoácidos antes e após a hidrólise ácida destas preparações.

mg de aminoácidos/mL de amostra do meio de cultura				
Aminoácidos	Peptona		Casaminoácidos	
	Antes da hidrólise ácida	Após a hidrólise ácida	Antes da hidrólise ácida	Após a hidrólise ácida
Aspartato + Asparagina	0,03	0,81	0,19	0,47
Treonina	0,04	0,17	0,07	0,24
Serina	0,03	0,29	0,11	0,31
Glutamato + Glutamina	0,05	0,91	0,58	1,57
Prolina	0,01	0,87	0,19	0,59
Glicina	0,04	2,56	0,04	0,12
Alanina	0,07	0,84	0,07	0,22
Cisteína	nd	nd	nd	nd
Valina	0,05	0,21	0,09	0,34
Metionina	0,03	0,05	0,04	0,13
Isoleucina	0,05	0,16	0,06	0,27
Leucina	0,12	0,31	0,15	0,53
Tirosina	0,04	0,06	0,02	0,12
Fenilalanina	0,08	0,20	0,06	0,20
Histidina	0,02	0,09	0,04	0,16
Lisina	0,08	0,40	0,16	0,52
Arginina	0,18	0,68	0,06	0,20
Triptofano	nd	nd	nd	nd
Total de aminoácidos	0,92	8,61	1,93	5,99

nd: não determinado.

Tabela 5: Composição de aminoácidos (mg/mL) em Peptona e Casaminoácidos antes e após 60h de crescimento com agitação (200rpm) de *Saccharomyces cerevisiae* (VIN7 e VIN13) em meio YNB contendo 20% (p/v) da fonte de carbono (10% de glicose e 10% de frutose) e 1% (p/v) da fonte de nitrogênio.

Aminoácidos	Peptona						Casaminoácidos					
	Sem hidrólise			Após hidrólise			Sem hidrólise			Após hidrólise		
	0 h	VIN 7	VIN 13	0 h	VIN 7	VIN 13	0 h	VIN 7	VIN 13	0 h	VIN 7	VIN 13
Aspartato + Asparagina	0,03	0,00	0,00	0,81	0,70	0,65	0,19	0,13	0,04	0,47	0,50	0,25
Treonina	0,04	0,00	0,00	0,17	0,18	0,19	0,07	0,03	0,02	0,24	0,12	0,09
Serina	0,03	0,00	0,00	0,29	0,34	0,35	0,11	0,06	0,02	0,31	0,18	0,11
Glutamato + Glutamina	0,05	0,00	0,00	0,91	0,88	1,01	0,58	0,49	0,21	1,57	1,17	0,86
Prolina	0,01	0,00	0,00	0,87	1,21	1,32	0,19	0,34	0,32	0,59	0,71	0,65
Glicina	0,04	0,00	0,00	2,56	3,46	3,96	0,04	0,06	0,05	0,12	0,14	0,11
Alanina	0,07	0,00	0,00	0,84	0,89	0,99	0,07	0,14	0,12	0,22	0,29	0,25
Cisteína	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Valina	0,05	0,00	0,00	0,21	0,12	0,14	0,09	0,15	0,10	0,34	0,25	0,20
Metionina	0,03	0,00	0,00	0,05	0,02	0,06	0,04	0,00	0,00	0,13	0,07	0,03
Isoleucina	0,05	0,00	0,00	0,16	0,12	0,13	0,06	0,08	0,03	0,27	0,24	0,15
Leucina	0,12	0,00	0,00	0,31	0,23	0,23	0,15	0,17	0,06	0,53	0,39	0,21
Tirosina	0,04	0,00	0,00	0,06	0,05	0,04	0,02	0,03	0,03	0,12	0,11	0,12
Fenilalanina	0,08	0,00	0,00	0,20	0,14	0,15	0,06	0,07	0,04	0,20	0,16	0,12
Histidina	0,02	0,00	0,00	0,09	0,06	0,07	0,04	0,06	0,04	0,16	0,15	0,12
Lisina	0,08	0,00	0,00	0,40	0,52	0,42	0,16	0,17	0,08	0,52	0,60	0,43
Arginina	0,18	0,00	0,00	0,68	0,18	0,37	0,06	0,00	0,00	0,20	0,07	0,06
Triptofano	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total de aminoácidos	0,92	0,00	0,00	8,61	9,11	10,07	1,93	1,98	1,16	5,99	5,16	3,77

nd: não determinado.

Tabela 6: Composição de aminoácidos (mg/mL) em Peptona e Casaminoácidos antes e após 60h o crescimento sem agitação de *Saccharomyces cerevisiae* (VIN7 e VIN13) em meio YNB contendo 20% (p/v) da fonte de carbono (10% de glicose e 10% de frutose) e 1% (p/v) da fonte de nitrogênio.

Aminoácidos	Peptona						Casaminoácidos					
	Sem hidrólise			Após hidrólise			Sem hidrólise			Após hidrólise		
	0 h	VIN 7	VIN 13	0 h	VIN 7	VIN 13	0 h	VIN 7	VIN 13	0 h	VIN 7	VIN 13
Aspartato + Asparagina	0,03	0,00	0,00	0,81	1,18	0,61	0,19	0,11	0,04	0,47	0,64	0,23
Treonina	0,04	0,00	0,00	0,17	0,21	0,18	0,07	0,02	0,01	0,24	0,09	0,08
Serina	0,03	0,00	0,00	0,29	0,38	0,33	0,11	0,04	0,01	0,31	0,12	0,09
Glutamato + Glutamina	0,05	0,00	0,00	0,91	0,73	0,99	0,58	0,48	0,21	1,57	0,77	0,72
Prolina	0,01	0,00	0,00	0,87	1,36	1,23	0,19	0,34	0,31	0,59	0,68	0,66
Glicina	0,04	0,00	0,00	2,56	4,28	3,56	0,04	0,07	0,05	0,12	0,13	0,10
Alanina	0,07	0,00	0,00	0,84	1,04	0,92	0,07	0,13	0,07	0,22	0,27	0,15
Cisteína	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Valina	0,05	0,00	0,00	0,21	0,15	0,12	0,09	0,12	0,06	0,34	0,19	0,15
Metionina	0,03	0,00	0,00	0,05	0,07	0,06	0,04	0,01	0,00	0,13	0,00	0,02
Isoleucina	0,05	0,00	0,00	0,16	0,14	0,12	0,06	0,05	0,01	0,27	0,16	0,12
Leucina	0,12	0,00	0,00	0,31	0,27	0,23	0,15	0,12	0,03	0,53	0,24	0,16
Tirosina	0,04	0,00	0,00	0,06	0,06	0,04	0,02	0,02	0,02	0,12	0,11	0,09
Fenilalanina	0,08	0,00	0,00	0,20	0,18	0,13	0,06	0,05	0,02	0,20	0,12	0,08
Histidina	0,02	0,00	0,00	0,09	0,08	0,06	0,04	0,04	0,03	0,16	0,11	0,09
Lisina	0,08	0,00	0,00	0,40	0,57	0,39	0,16	0,13	0,07	0,52	0,45	0,29
Arginina	0,18	0,00	0,00	0,68	0,61	0,51	0,06	0,00	0,00	0,20	0,05	0,06
Triptofano	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total de aminoácidos	0,92	0,00	0,00	8,61	11,32	9,48	1,93	1,73	0,94	5,99	4,13	3,08

nd: não determinado.

Tabela7: Composição de aminoácidos (mg/mL) em Peptona antes e após hidrólise ácida crescimento com agitação (200rpm) de *Saccharomyces cerevisiae* (VIN7) em diferentes tempos de cultivo em meio YNB contendo 20% (p/v) da fonte de carbono (10% de glicose e 10% de frutose) e 1% (p/v) de peptona.

Aminoácidos	mg de aminoácidos/mL de amostra do meio de cultura							
	Peptona 0 h		VIN7 Pep 20 h		VIN7 Pep 40 h		VIN7 Pep 60 h	
	Antes da hidrólise ácida	Após a hidrólise ácida	Antes da hidrólise ácida	Após a hidrólise ácida	Antes da hidrólise ácida	Após a hidrólise ácida	Antes da hidrólise ácida	Após a hidrólise ácida
Aspartato + Asparagina	0,03	0,81	0,01	0,51	0,04	0,64	0,00	0,70
Treonina	0,04	0,17	0,00	0,12	0,00	0,14	0,00	0,18
Serina	0,03	0,29	0,01	0,20	0,00	0,23	0,00	0,34
Glutamato + Glutamina	0,05	0,91	0,00	0,63	0,00	0,65	0,00	0,88
Prolina	0,01	0,87	0,00	0,82	0,00	0,93	0,00	1,21
Glicina	0,04	2,56	0,00	1,79	0,00	2,18	0,00	3,46
Alanina	0,07	0,84	0,00	0,50	0,00	0,58	0,00	0,89
Cisteína	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Valina	0,05	0,21	0,00	0,13	0,00	0,14	0,00	0,12
Metionina	0,03	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
Isoleucina	0,05	0,16	0,00	0,09	0,00	0,11	0,00	0,12
Leucina	0,12	0,31	0,00	0,18	0,00	0,20	0,00	0,23
Tirosina	0,04	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
Fenilalanina	0,08	0,20	0,00	0,09	0,00	0,10	0,00	0,14
Histidina	0,02	0,09	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,06
Lisina	0,08	0,40	0,00	0,21	0,00	0,25	0,00	0,52
Arginina	0,18	0,68	0,00	0,28	0,00	0,25	0,00	0,18
Triptofano	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,00	nd
Total de aminoácidos	0,92	8,61	0,02	5,60	0,04	6,44	0,00	9,11

nd: não determinado.

Tabela 8: Composição de aminoácidos na cultura realizada com a fonte de nitrogênio sulfato de amônio após 60h de crescimento com agitação (200rpm) e sem agitação de *Saccharomyces cerevisiae* (VIN7 e VIN13) em meio YNB contendo 20% (p/v) da fonte de carbono (10% de glicose e 10% de frutose) e 1% da fonte de nitrogênio.

mg de aminoácidos/mL de amostra do meio de cultura				
Sulfato de amônio				
Aminoácidos	VIN7 (200 rpm)	VIN13 (200 rpm)	VIN 7	VIN13
Aspartato + Asparagina	0,03	0,05	0,00	0,01
Treonina	0,01	0,02	0,00	0,00
Serina	0,01	0,02	0,00	0,00
Glutamato + Glutamina	0,04	0,06	0,00	0,01
Prolina	0,01	0,03	0,00	0,00
Glicina	0,02	0,06	0,01	0,02
Alanina	0,05	0,14	0,04	0,02
Cisteína	nd	nd	nd	nd
Valina	0,03	0,04	0,01	0,00
Metionina	0,00	0,00	0,00	0,00
Isoleucina	0,01	0,02	0,00	0,00
Leucina	0,01	0,03	0,00	0,00
Tirosina	0,00	0,00	0,00	0,00
Fenilalanina	0,00	0,01	0,00	0,00
Histidina	0,00	0,01	0,00	0,00
Lisina	0,00	0,00	0,00	0,00
Arginina	0,01	0,02	0,00	0,00
Triptofano	nd	nd	nd	nd
Total de aminoácidos	0,24	0,51	0,06	0,06

nd: não determinado.

IV.3. Determinação do perfil de distribuição de peptídeos em peptona e casaminoácidos

As análises dos perfis de distribuição de peptídeos em peptona e casaminoácidos antes e após 60h de crescimento de células de *Saccharomyces cerevisiae* VIN7 e VIN13 em meio contendo 20% (p/v) de glicose mais frutose e 1% (p/v) da fonte nitrogenada nos experimentos agitados e não agitados foram realizadas por HPLC e encontram-se nas figuras 15 e 16 (peptona e casaminoácidos antes da fermentação), figuras 17, 18, 19 e 20 (experimentos contendo peptona), figuras 21, 22, 23, 24 (experimentos contendo casaminoácidos) e figuras 25 a 28 (análise comparativa entre as linhagens VIN7 e VIN13 crescidas em peptona e casaminoácidos com e sem agitação). Os peptídeos presentes em peptona e casaminoácidos antes da fermentação foram indicados na forma de algarismos romanos para facilitar o entendimento dos resultados, porém, esses algarismos não estão apresentados nas análises realizadas após a fermentação.

O cromatograma de peptona (figura 15) antes da fermentação apresenta-se com uma seqüência de picos muitos bem definidos em 220nm, onde são observados em uma banda inicial os peptídeos I, II e III e uma banda larga que se estende de 7 a 13 minutos, identificando-se os picos IV, V, VI, VII e VIII, o que sugere a presença de peptídeos com diferentes tamanhos e/ou seqüências, já em 280nm apresenta dois picos principais, caracterizados como peptídeo I e peptídeo II.

O cromatograma de casaminoácidos (figura 16) antes da fermentação mostra, em 220nm, que há quatro picos principais, correspondentes aos peptídeos I, II, III e IV, além de uma seqüência de outros picos menores, ao passo que em 280nm, mostra três picos principais, correspondente aos peptídeos I, II e III, além de outros menores. A análise comparativa dos cromatogramas de peptona e casaminoácidos mostra que o primeiro apresenta uma distribuição de peptídeos mais complexa, como já observado pelas análises da composição dos aminoácidos.

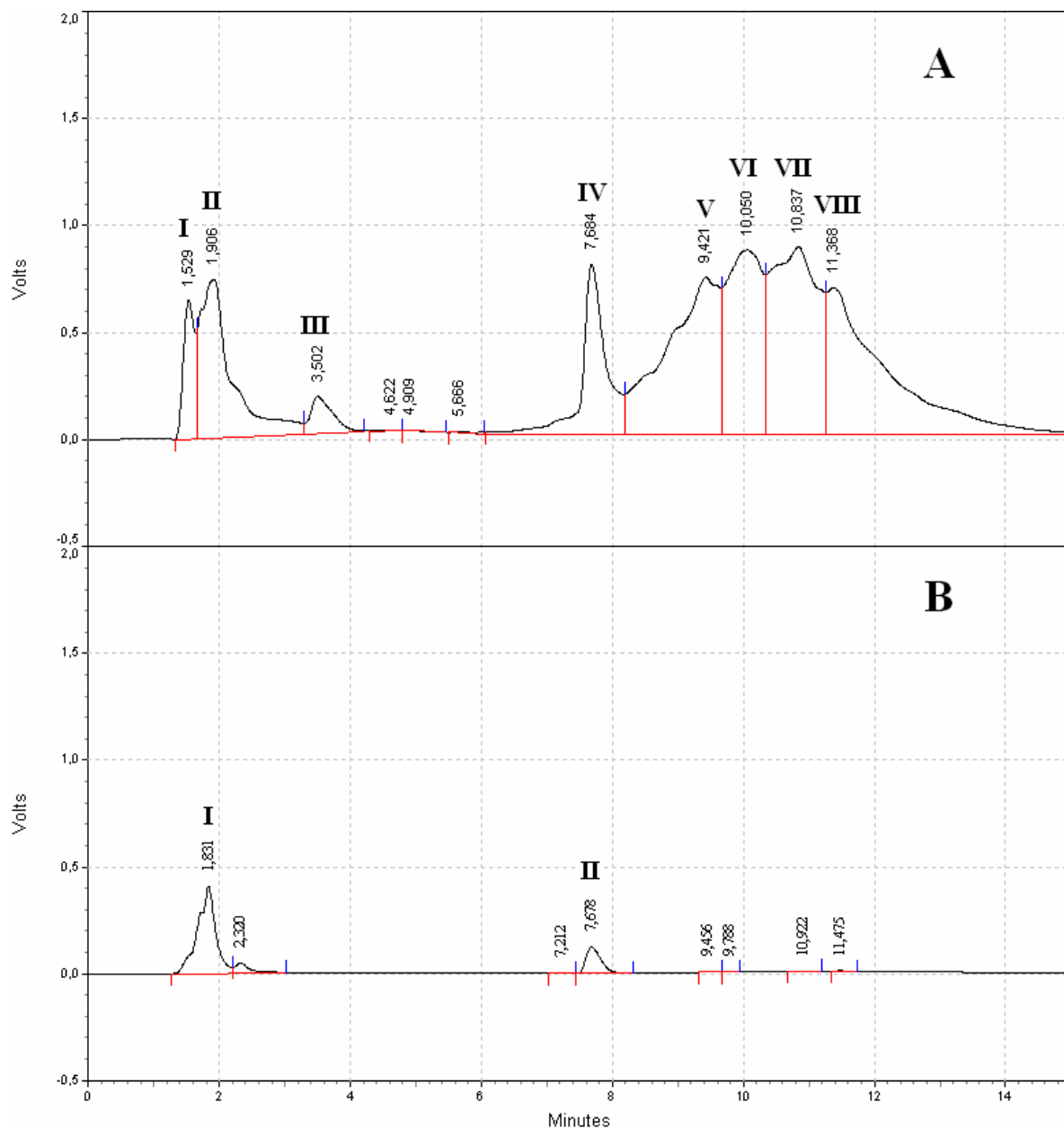


Figura 15: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes do cultivo em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose.

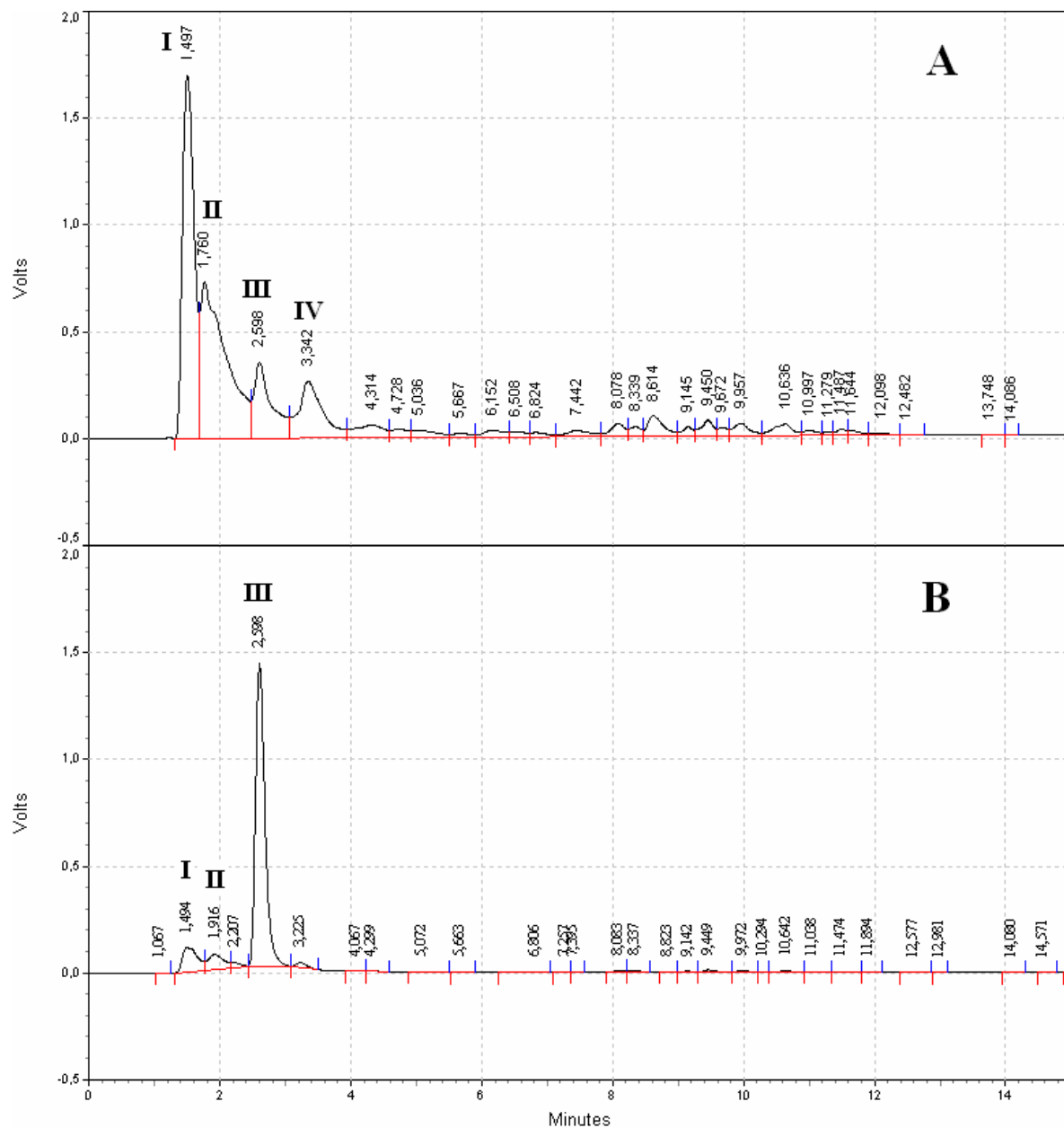


Figura 16: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes do cultivo em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose.

IV.3.1 Determinação do perfil de distribuição de peptídeos em peptona após a fermentação

As figuras 17 e 18 mostram a distribuição de peptídeos em meio contendo peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose após cultivo agitado (200rpm). O resultado obtido do cultivo da linhagem VIN7 mostra, em 220nm (figura 17 A), que os peptídeos III e IV (figura 15 A) foram consumidos e os correspondentes aos tempos de 7 a 13 minutos (figura 15 A) foram parcialmente consumidos. Apesar do consumo peptídico observado, frações correspondentes aos tempos de 2,345, 5,181 e 12,110 minutos (figura 17 A), que não estavam presentes no tempo de 0h, apareceram no final do processo fermentativo, sugerindo que estas frações podem ser produto da quebra de outros peptídeos e/ou produto do metabolismo da levedura. Em 280nm (figura 17 B) observa-se que a fração II (figura 15 B) foi consumida, e outras frações correspondentes aos tempos de 2,568, 5,180, 7,172 e 12,127 minutos (figura 17 B) apareceram após o processo fermentativo. O resultado obtido do cultivo da linhagem VIN13 (figura 18) mostra, em 220nm e 280nm, que o perfil de consumo peptídico assemelha-se aos obtidos com a linhagem VIN7 (figura 25), diferindo apenas nos peptídeos correspondentes aos tempos de 1,545 e 12,119 minutos (figura 25 A) em 220nm e 2,568min (figura 25 B) em 280nm, que foram menos consumidos.

As figuras 19 e 20 mostram a distribuição de peptídeos em meio contendo peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose após cultivo não agitado. O resultado obtido do cultivo da linhagem VIN7 mostra, em 220nm (figura 19 A), que os peptídeos III e IV (figura 15 A) foram consumidos e outras frações correspondentes aos tempos de 2,307, 5,112 e 12,099 minutos (figura 19 A), que não estavam presentes no tempo de 0h, apareceram após o cultivo, como observado nos cultivos agitados, além do aumento observado na fração I (figura 15 A). Em 280nm (figura 20 B), observa-se que uma pequena porção da fração peptídica I (figura 15 B) foi consumida e a fração II (figura 15 B) foi totalmente consumida, e mais uma vez, frações peptídicas apareceram após o cultivo nos tempos de 2,552, 5,112, 7,112 e 12,105 minutos (figura 19 B). A análise da distribuição de peptídeos, após o cultivo da linhagem VIM13 (figura 20), mostra mais uma vez que o perfil de consumo peptídico assemelha-se ao perfil da linhagem VIN7 (figura 26).

Os resultados obtidos das culturas das linhagens VIN7 e VIN13 sugerem que as necessidades nutricionais das duas linhagens assemelham-se quanto ao consumo

peptídico quando a cultura é feita em meio contendo peptona, principalmente quando são realizados cultivos não agitados. Sugerem também, que após o processo fermentativo, peptídeos que não estavam presentes em 0h, aparecem nos cromatogramas, mostrando que essas frações peptídicas podem ser produto da quebra de outras frações peptídicas e/ou produto do metabolismo das leveduras.

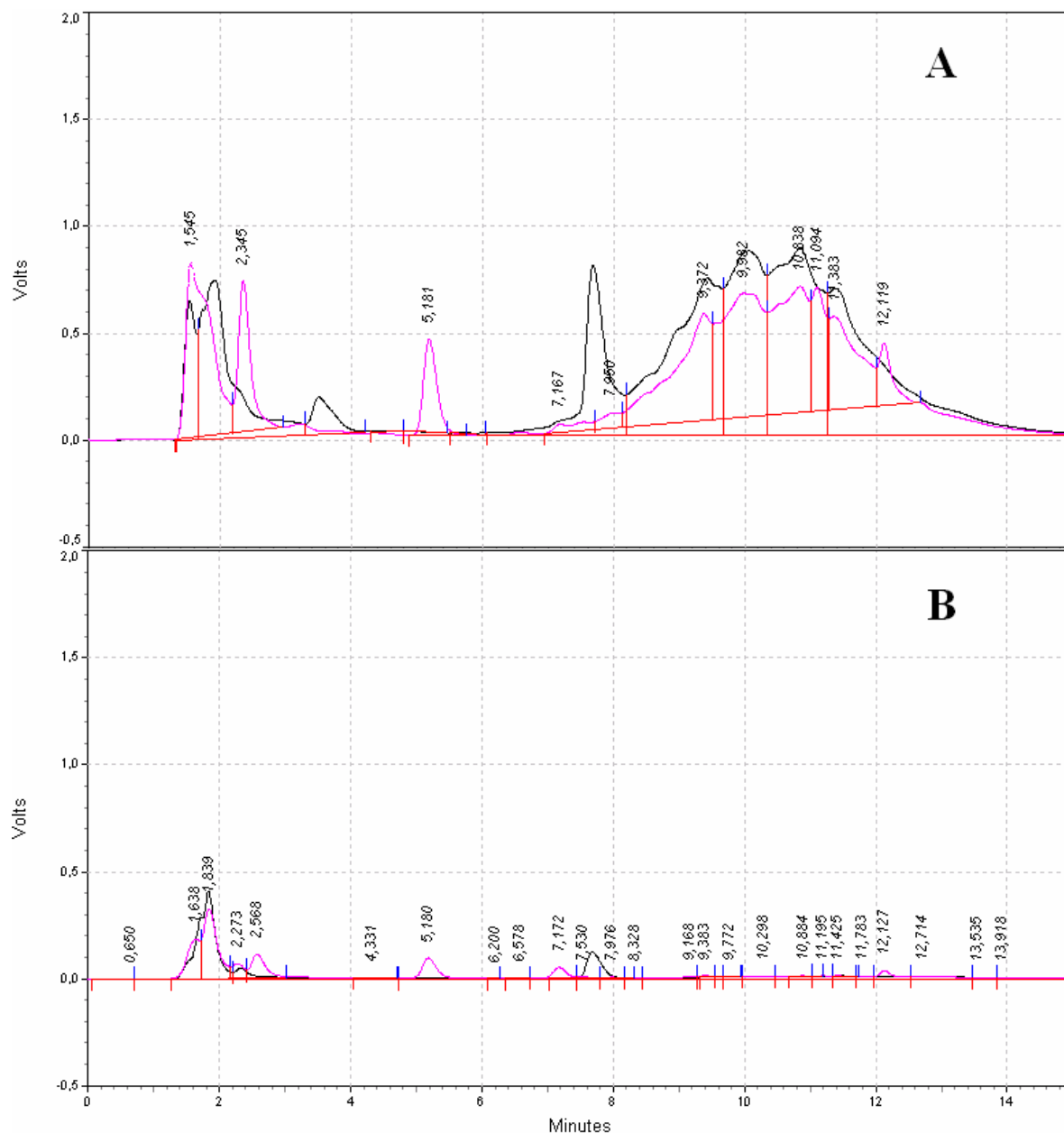


Figura 17: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes (●) e após (●) 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30° C e 200rpm.

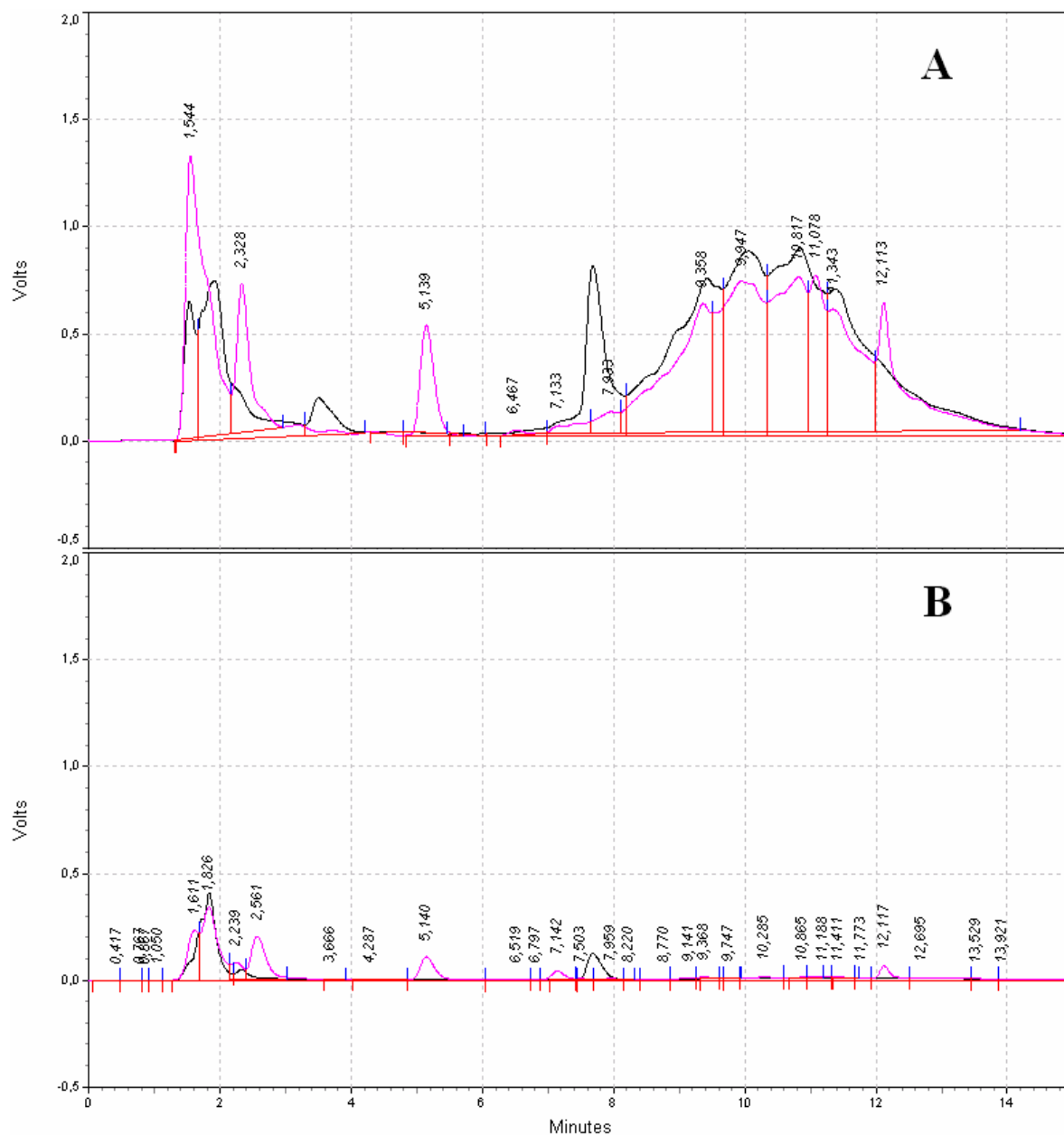


Figura 18: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes (●) e após (●) 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C e 200rpm.

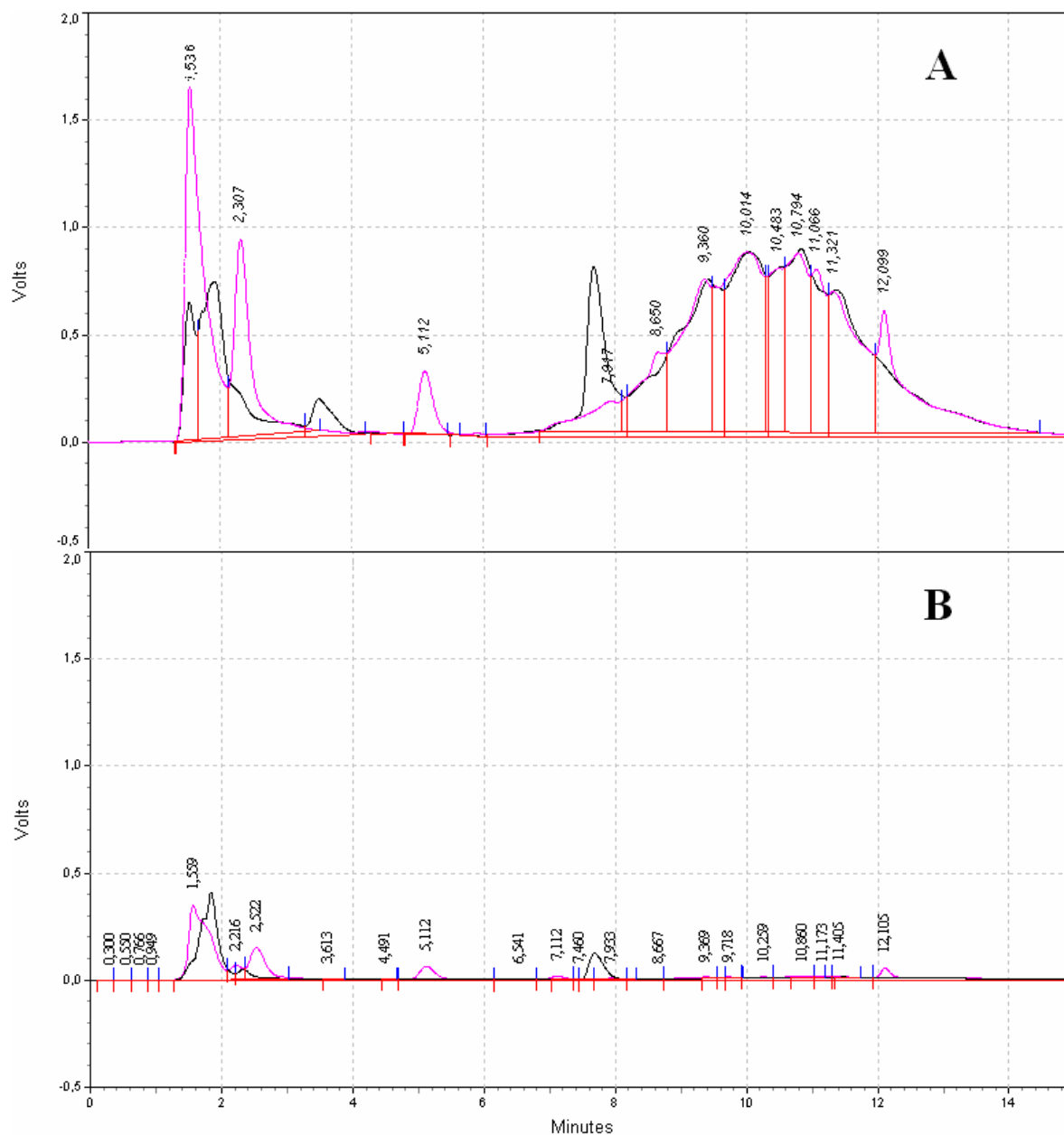


Figura 19: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes (●) e após (●) 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30° C.

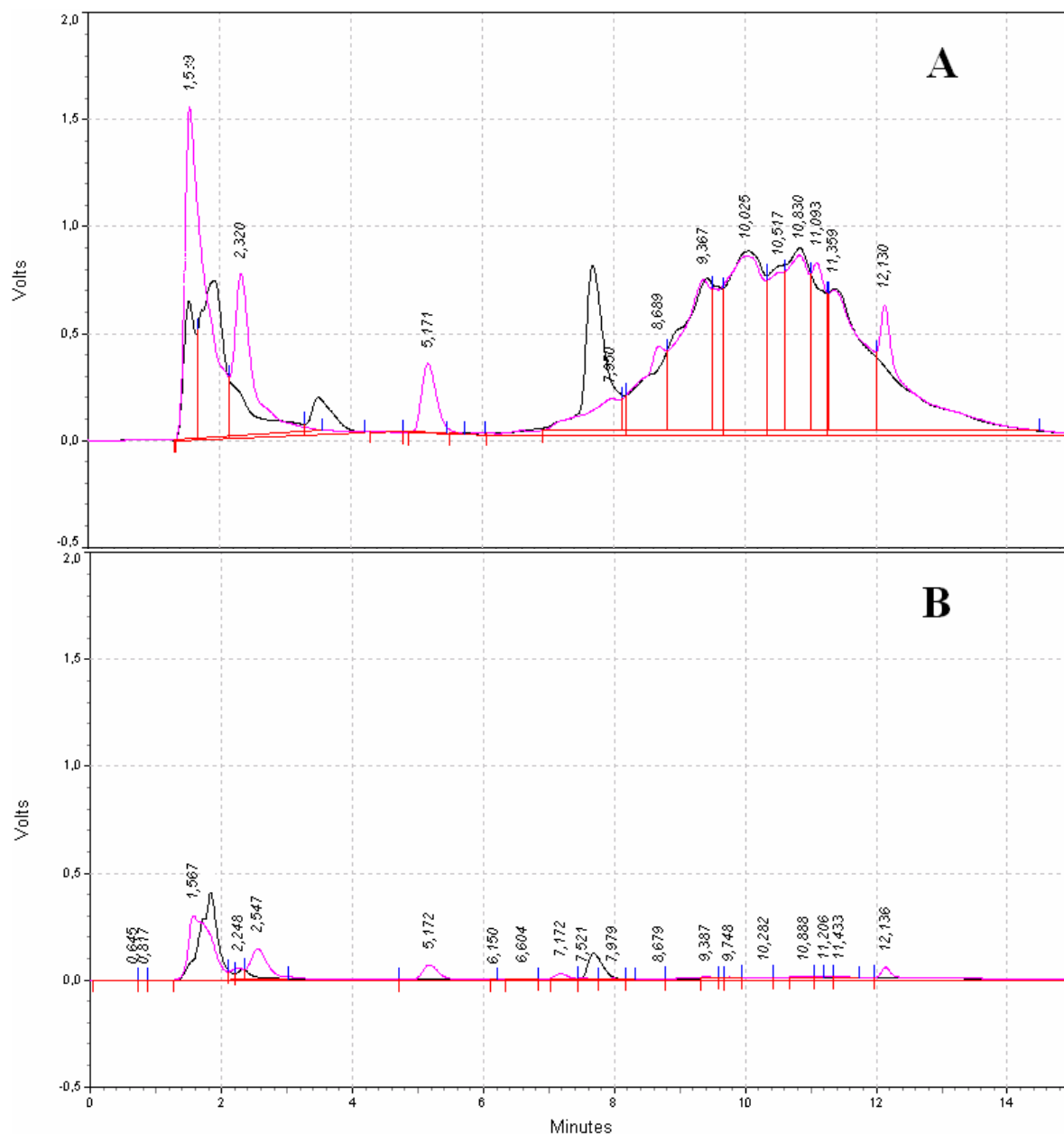


Figura 20: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes (●) e após (●) 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C.

IV.3.2 Determinação do perfil de distribuição de peptídeos em casaminoácidos após a fermentação

As figuras 21 e 22 mostram a distribuição de peptídeos em meio contendo casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose após cultivo agitado (200rpm). O resultado obtido do cultivo da linhagem VIN7 mostra, em 220nm (figura 21 A), que pequena quantidade das frações peptídicas III e IV (figura 16 A) foram consumidas, e outras frações correspondentes aos tempos 2,362 e 5,222 minutos (figura 21 A) aparecem após a fermentação, além do aumento da concentração da fração peptídica II (figura 16 A). Como pode ser visto no cromatograma em 220nm, após 7min (figura 21 A), há uma seqüência de picos não muito bem definida, onde há aumento e diminuição de vários picos. Em 280nm, observa-se que a fração peptídica III (figura 16 B) foi quase totalmente consumida, também havendo pequeno aumento na concentração da fração peptídica I e II (figura 16 B). O resultado obtido do cultivo da linhagem VIN13 (figura 22) mostra, tanto em 220nm quanto em 280nm que o perfil de consumo peptídico assemelha-se com o resultado obtido do cultivo da linhagem VIN7 (figura 27), diferindo apenas na concentração dos peptídeos que aparecem após a fermentação, que para VIN13, em 220nm, o peptídeo correspondente ao tempo de 2,362min (figura 27 A) foi mais consumido e o correspondente a 5,222min (figura 27 A) foi menos consumido. Em 280nm (figura 22 B), a linhagem VIN13 diferencia-se da linhagem VIN7 também no pequeno aumento observado nos peptídeos correspondentes aos tempos de 1,877, 5,224 e 7,203 minutos (figura 27 B).

As figuras 23 e 24 mostram a distribuição de peptídeos em meio contendo casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose após cultivo não agitado das linhagens VIN7 e VIN13. O resultado obtido do cultivo da linhagem VIN7 mostra, em 220nm (figura 23 A), que pequena quantidade das frações peptídicas III e IV (figura 16 A) foram consumidas e outras frações correspondentes aos tempos de 2,312 e 5,126 minutos (figura 23 A) aparecem após a fermentação. Além desses picos, após o tempo de 7min (figura 23 A) há vários picos menores não muito bem definidos, onde há aumento e diminuição. Em 280nm observa-se que quase toda fração peptídica III (figura 16 B) foi consumida, e após a fermentação há o aparecimento de um pequeno pico correspondente ao tempo de 5,129 min (figura 23 B). O perfil de distribuição de peptídeos após a fermentação da linhagem VIN13 assemelha-se ao da linhagem VIN7, como pode ser visto na figura 28.

Os resultados obtidos das culturas das linhagens VIN7 e VIN13 sugerem que as necessidades nutricionais das duas linhagens também se assemelham quanto ao consumo peptídico quando a cultura é feita em meio contendo casaminoácidos. Como observado nas análises realizadas com peptona, após o processo fermentativo, peptídeos que não estavam presentes em 0h, aparecem nos cromatogramas, mostrando que essas frações peptídicas podem ser produto da quebra de outras frações peptídicas e/ou produto do metabolismo das leveduras.

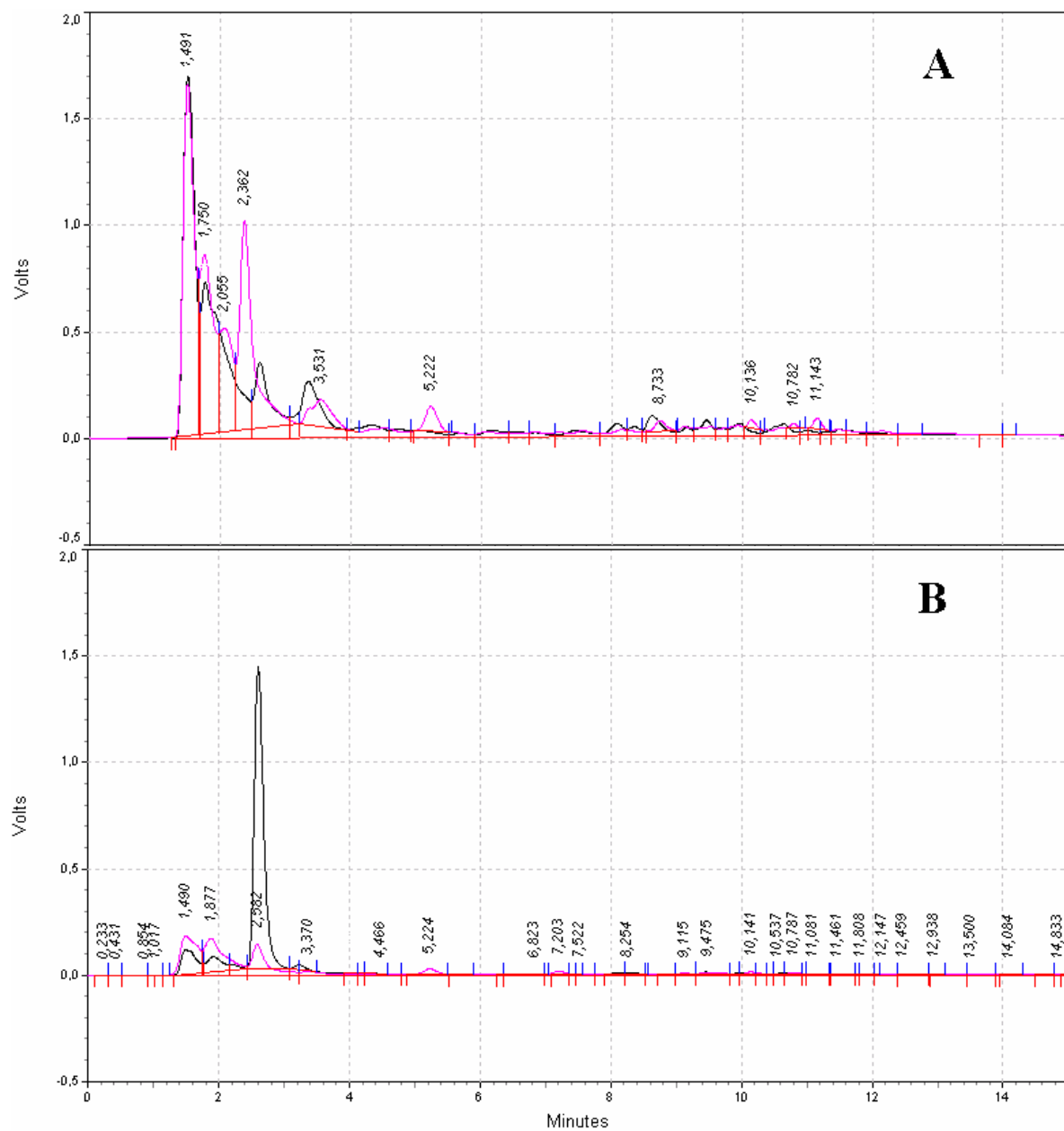


Figura 21: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes (●) e após (●) 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30° C e 200rpm.

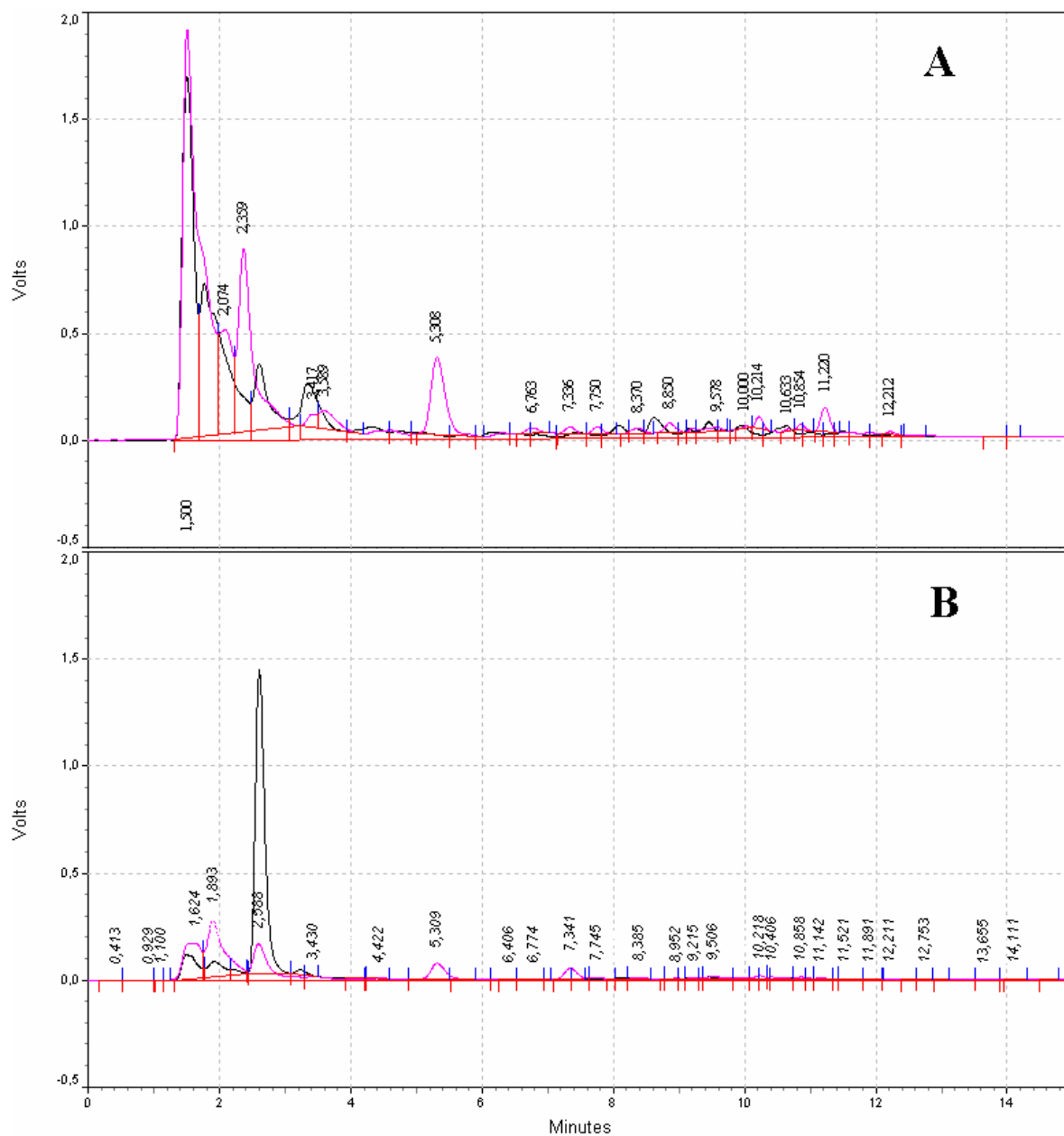


Figura 22: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes (●) e após (●) 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C e 200rpm.

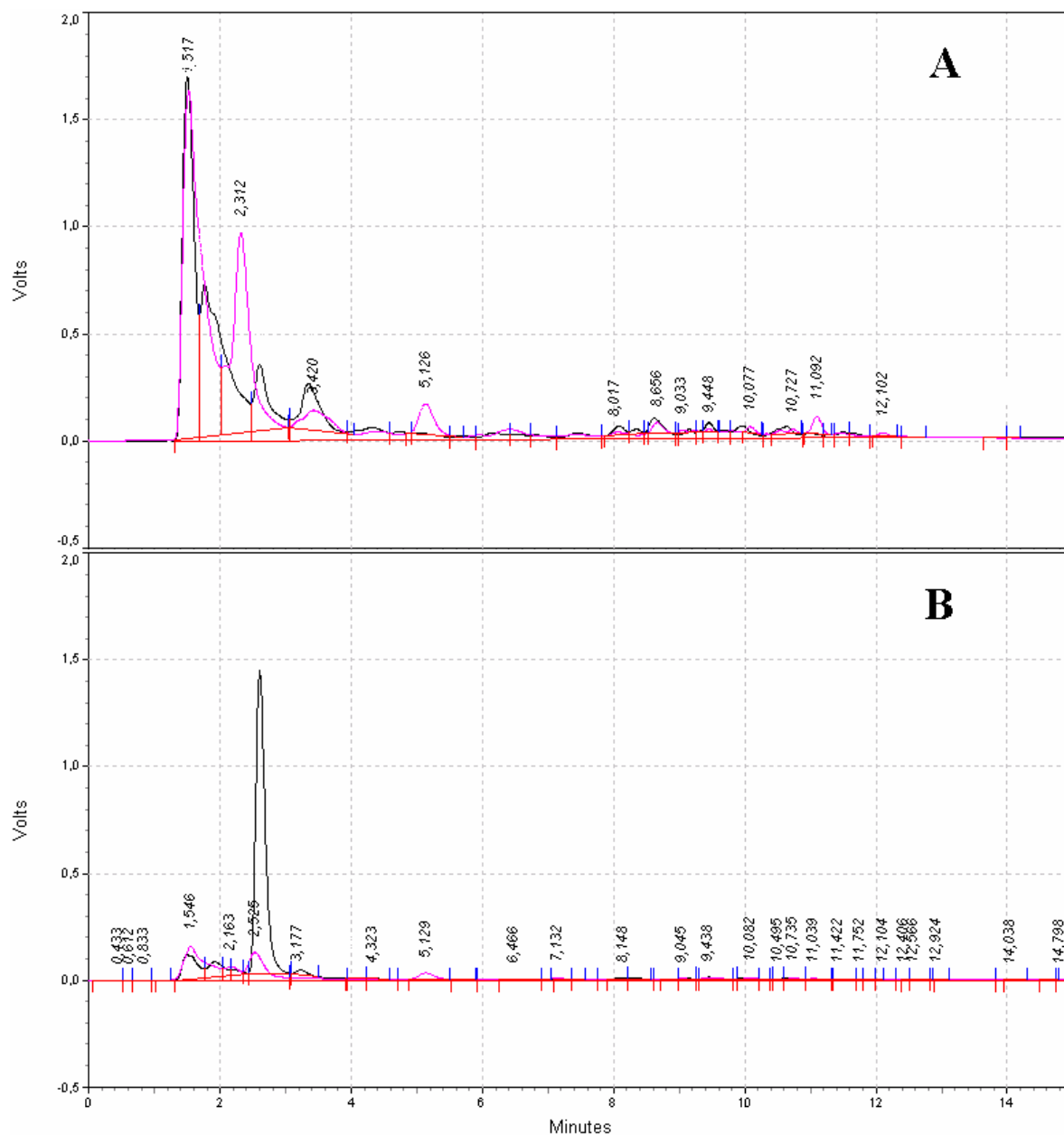


Figura 23: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes (●) e após (●) 60 h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30° C.

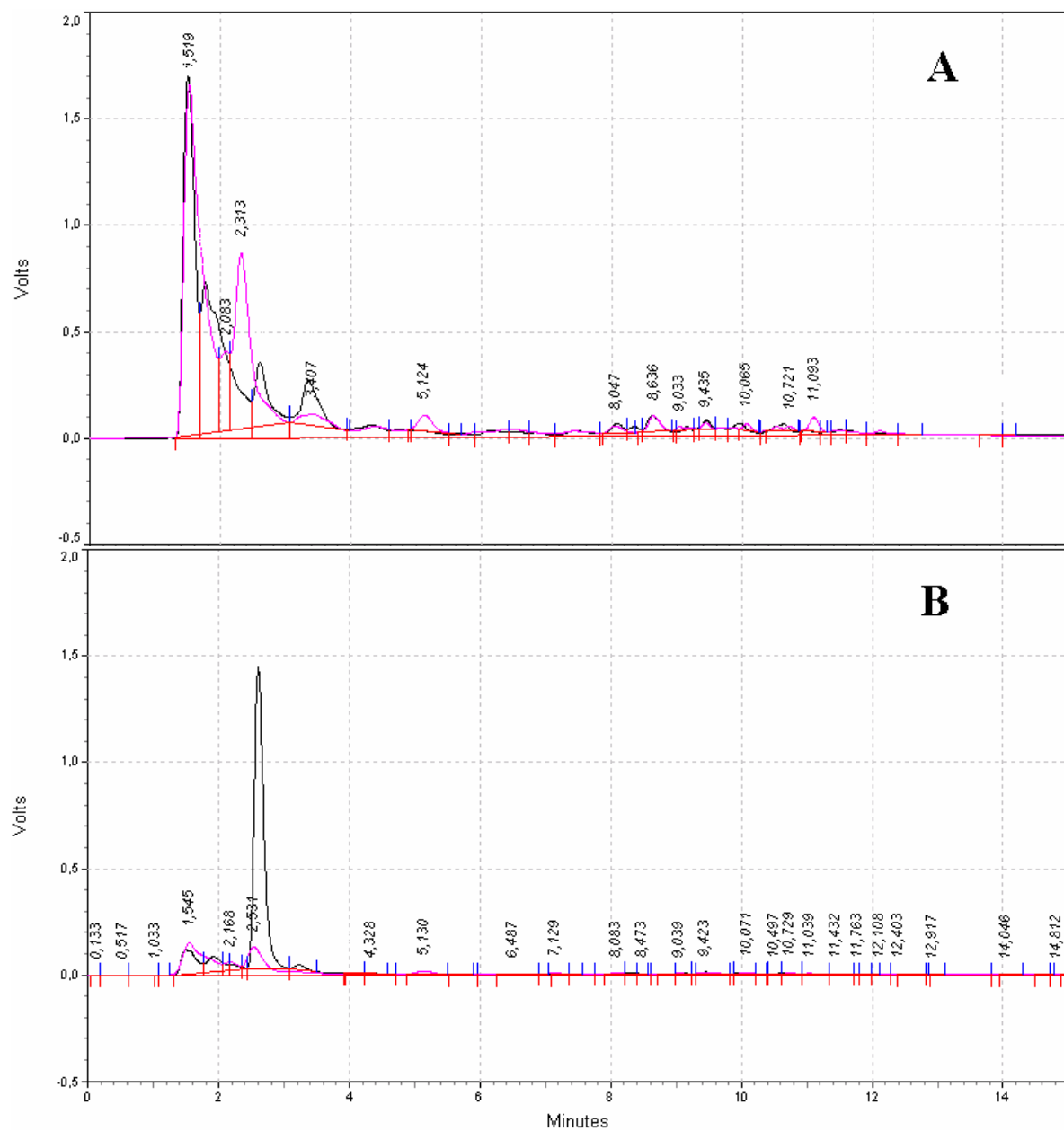


Figura 24: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) antes (●) e após (●) 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN13 em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C.

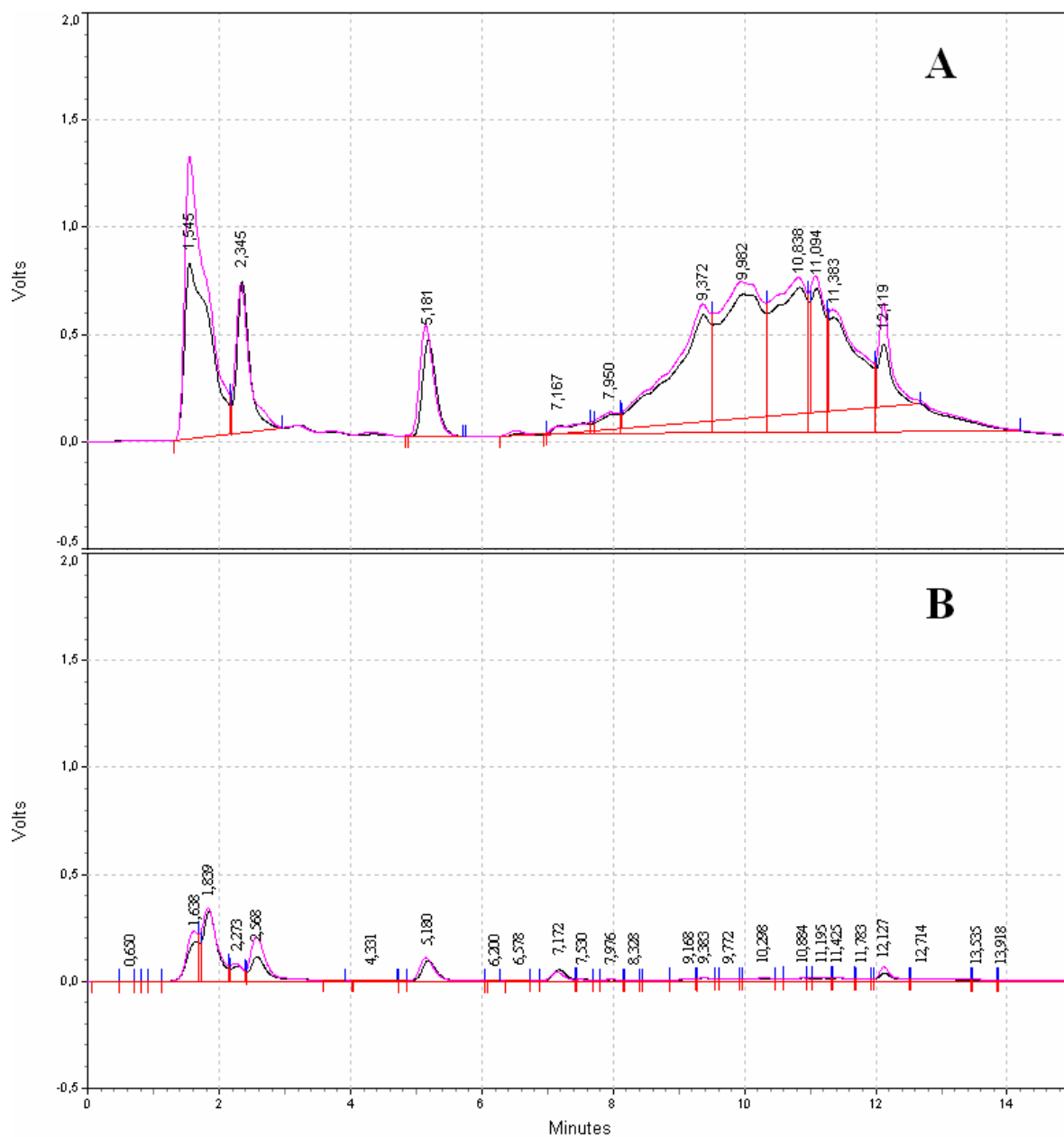


Figura 25: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) após 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 (●) e VIN13 (●) em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C e 200rpm.

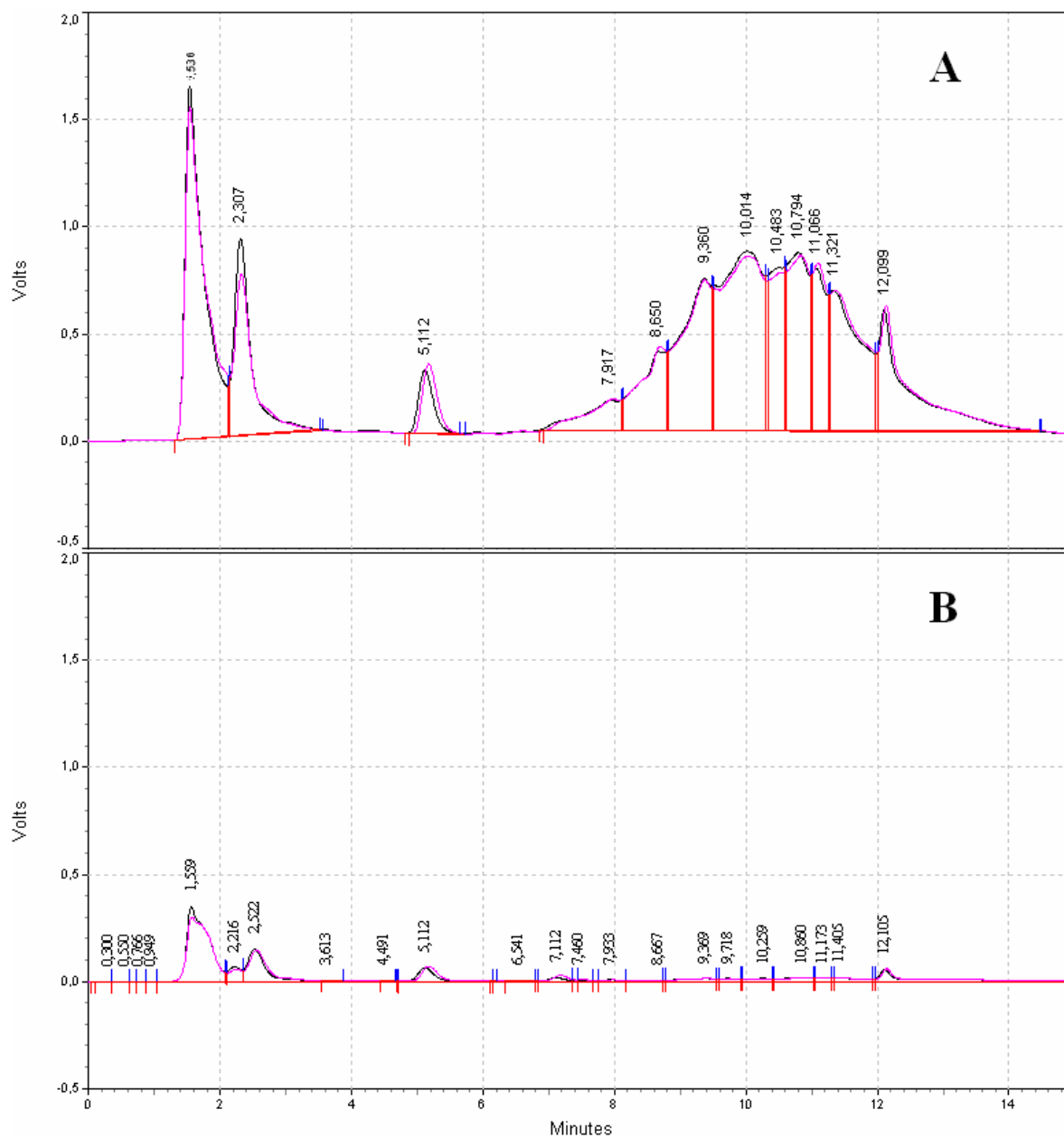


Figura 26: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) após 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 (●) e VIN13 (●) em meio contendo 1% (p/v) de peptona e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C.

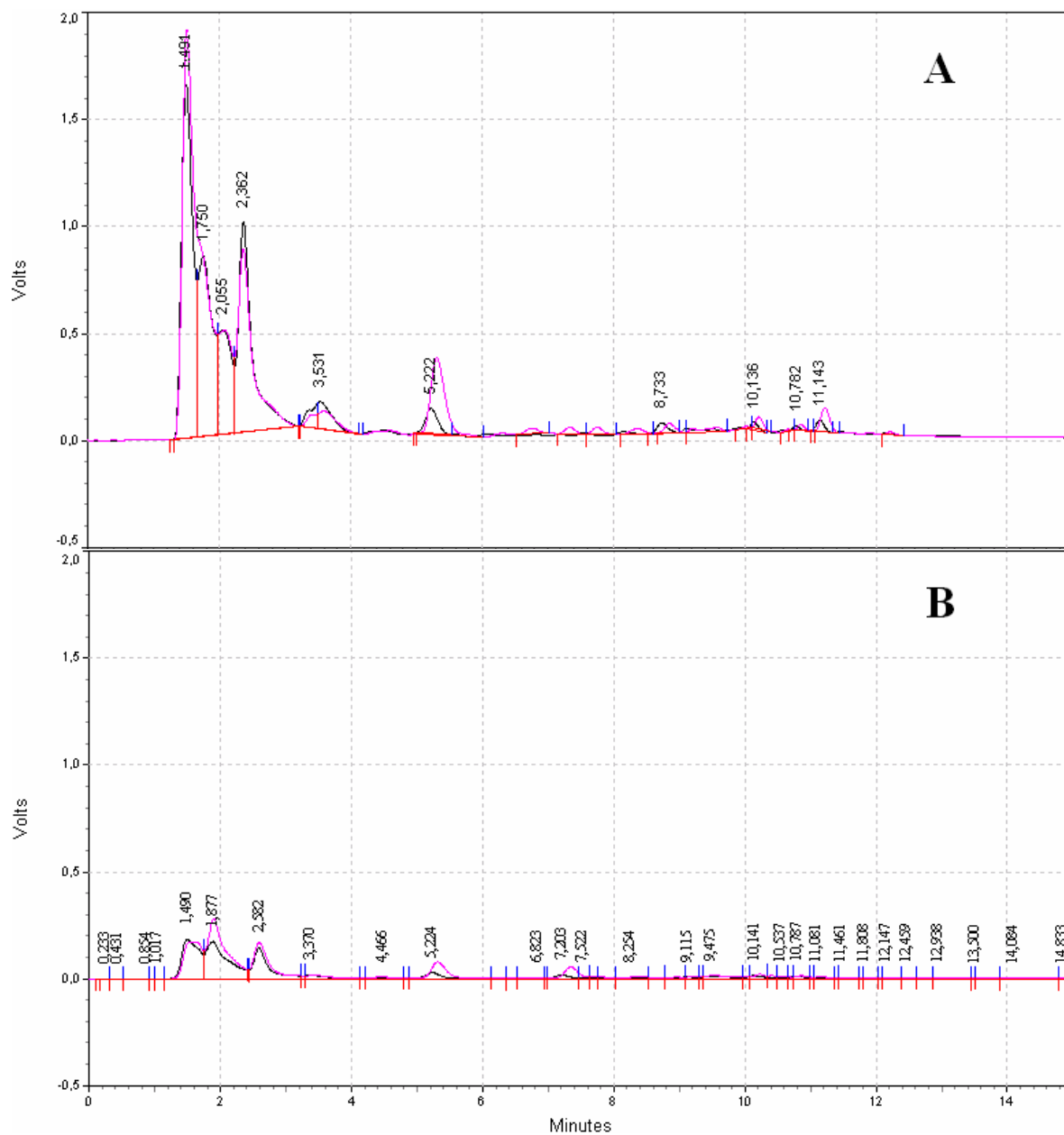


Figura 27: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) após 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 (●) e VIN13 (●) em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C e 200rpm.

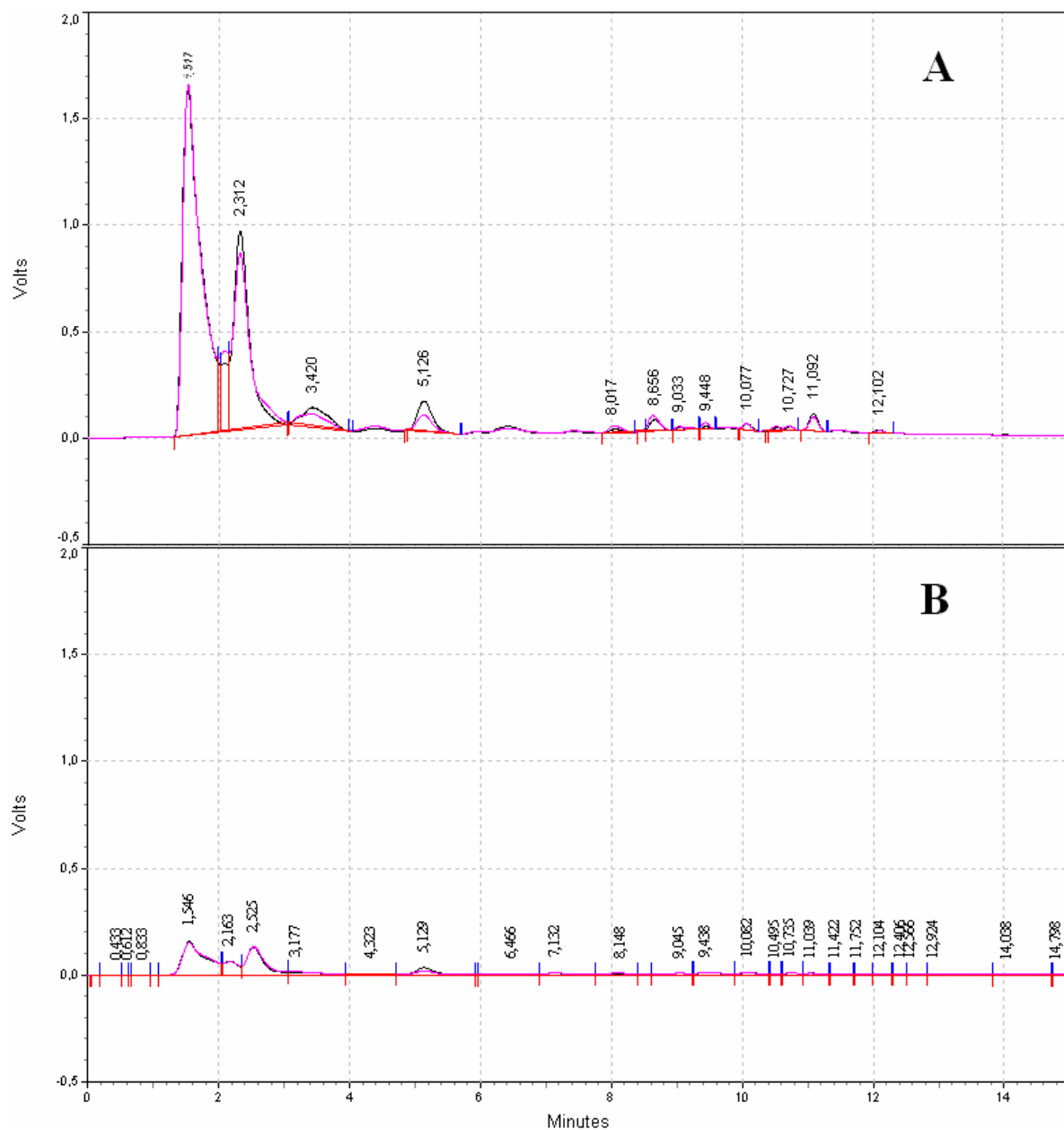


Figura 28: Cromatograma de distribuição de peptídeos, por HPLC em 220nm (A) e 280nm (B) após 60h de cultivo de *S. cerevisiae* VIN7 (●) e VIN13 (●) em meio contendo 1% (p/v) de casaminoácidos e 20% (p/v) de glicose mais frutose, a 30°C.

Discussão

V. Discussão

Considerando que em todos os processos industriais em que se utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* os meios devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono, além de sais e vitaminas (COOPER, 1982; HORAK, 1997), e que a maioria dos meios industriais contém açúcares e compostos nitrogenados com composição estruturalmente complexa (MORENO-ARRIBAS *et al.*, 2002; STEWART & RUSSEL, 1998), os resultados apresentados nesta dissertação foram obtidos em meios de cultura que continham como fonte de carbono: glicose 20% (p/v), frutose 20% (p/v) e uma mistura equimolar de glicose mais frutose com 20% (p/v) de concentração final; e como fonte de nitrogênio os meios continham peptona, casaminoácidos e sulfato de amônio na concentração de 1% (p/v). Utilizou-se diferentes fontes de nitrogênio, pois a complexidade estrutural da fonte nitrogenada exerce forte impacto no metabolismo fermentativo de leveduras industriais (CRUZ *et al.*; 2002; CRUZ *et al.*, 2003; BATISTOTE *et al.*; 2006).

O objetivo central deste estudo foi observar a utilização preferencial de glicose sobre frutose em meios contendo fontes de nitrogênio estruturalmente complexas, e se estas fontes poderiam interferir com a já conhecida discrepância na utilização destes açúcares por leveduras vinícolas VIN7 e VIN13. Além disso, um diferencial relativo a outros trabalhos foi a disponibilidade de oxigênio, obtida em diferentes condições de crescimento: com e sem agitação. Esta condição de crescimento foi oferecida na tentativa de entender como a levedura responderia frente a elevada ou baixa concentração de oxigênio, pois as características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* sob condição fermentativa, respiratória e respirofermentativa sempre atraiu muita atenção, tanto porque é um dos poucos organismos eucarióticos que podem crescer em condições anaeróbicas, quanto pela sua importância industriais de crescimento em condições aeróbias e anaeróbias para produção de etanol, proteínas, biomassa celular, e outros produtos (WIEBE *et al.*, 2007). Cumpre salientar que foi realizada uma maior quantidade de análises quando o cultivo foi feito com os meios contendo uma mistura equimolar de glicose mais frutose, obtendo-se assim dados mais completos, já que o meio de cultura utilizado na produção vinícola apresenta como constituinte esses dois carboidratos com concentração em torno de 20% (p/v) (BERTHELIS *et al.*, 2004; BERTHELIS *et al.*, 2007).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* necessitam relativamente de altos níveis de nutrientes para completar a fermentação de vinho e produzir etanol. O nitrogênio assimilável é identificado como um nutriente essencial para completar um processo fermentativo de forma eficiente (VILANOVA *et al.*, 2007). A composição dos constituintes nitrogenados em mosto de vinho tem importância decisiva no desempenho fermentativo das leveduras, e quantidades adequadas dos constituintes utilizados como fonte de carbono e nitrogênio é considerado um fator importante para se completar a fermentação industrial (STEWART & RUSSEL, 1998). As principais fontes de nitrogênio assimiláveis por leveduras são aminoácidos, peptídeos e amônio (VILANOVA *et al.*, 2007). Tal habilidade requer permeases para o transporte desses compostos e enzimas para a geração de amônio pelo seu metabolismo (IRAQUI *et al.*, 1999; MAGASANIK & KAISER, 2002). As fontes de nitrogênio são rapidamente acumuladas pelas leveduras na fase inicial da fermentação, onde são necessários aminoácidos para a síntese de proteínas e produção de biomassa. A insuficiência de compostos nitrogenados no meio de cultura pode provocar baixa produção de biomassa e etanol com conseqüente fermentação problemática, onde se obtém uma fermentação incompleta ("stuck fermentation") ou longa ("sluggish fermentation") (BELTRAN *et al.*, 2005; VILANOVA *et al.*, 2007).

Estudos realizados mostraram que as leveduras respondem diferentemente quanto a eficiência, quando são utilizadas fontes de nitrogênio que apresentam diferentes complexidades estruturais, onde muitas vezes a dificuldade em utilizar esses compostos nitrogenados provocam menor produção de biomassa com perda da viabilidade celular e com conseqüente redução na eficiência do processo (CRUZ *et al.*; 2002; CRUZ *et al.*, 2003; BATISTOTE *et al.*; 2006). Além da fonte nitrogenada, também foi observado que as leveduras sofriam forte influência do tipo da fonte de carbono.

Os estudos iniciais e mais completos foram realizados utilizando como fonte de carbono glicose mais frutose na concentração de 20% (p/v). Para as duas linhagens utilizadas, a fonte nitrogenada que propiciou melhores condições fermentativas foi a peptona, nas duas condições de cultivo, com maior produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono. Em todas as condições de cultivo, a linhagem VIN13 sempre produziu mais biomassa que a linhagem VIN7, e nos experimentos agitados, sempre manteve sua viabilidade mais elevada, conseqüentemente consumindo a fonte de carbono e produzindo mais etanol. Para os cultivos não agitados, as duas linhagens mantiveram a viabilidade celular

elevada, consumiram eficientemente a fonte de carbono e produziram eficientemente etanol, nas três fontes de nitrogênio utilizadas. Os resultados obtidos mostraram o forte impacto que a agitação exerce sobre o processo fermentativo, de modo que, nas análises realizadas sem agitação, foram observados valores consideráveis de manutenção da viabilidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol, principalmente no meio suplementado com sulfato de amônio, onde as linhagens VIN7 e VIN13 produziram concentrações elevadas de etanol próximo aos valores obtidos com peptona e casaminoácidos. A elevada produção de etanol observada nos cultivos não agitados foi possível em consequência do metabolismo fermentativo das leveduras em baixas concentrações de oxigênio o que também provoca menor produção de biomassa (WIEBE *et al.*, 2007). Apesar da perda da viabilidade celular observada nos cultivos agitados, a produção de biomassa foi maior, porém com menor produção de etanol, mostrando que a fisiologia respiratória de *Saccharomyces cerevisiae* se adequou a condição do cultivo agitado (WIEBE *et al.*, 2007).

Da mesma forma que para os estudos realizados com glicose mais frutose, nos estudos realizados com glicose 20% (p/v), utilizando a linhagem VIN7, tanto nas análises realizadas com agitação como para as realizadas sem agitação, a fonte nitrogenada que propiciou melhores condições fermentativas foi a peptona, com maior produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono, no entanto, somente para os experimentos realizados sem agitação a fonte de carbono foi eficientemente consumida nas três fontes de nitrogênio utilizadas. Nos cultivos utilizando as linhagens VIN7 e VIN13, para as duas condições de cultivo, peptona foi a fonte nitrogenada que propiciou condições mais favoráveis de fermentação, e no caso dos experimentos não agitados, também houve consumo eficiente da fonte de carbono. O diferencial da linhagem VIN13 em relação a VIN7 foi observado nos cultivos agitados, suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, onde houve maior manutenção da viabilidade e consumo eficiente da fonte de carbono.

Para as análises realizadas com frutose 20% (p/v), utilizando ambas as linhagens, nas duas condições de cultivo, peptona foi a fonte nitrogenada que propiciou melhores condições fermentativas. Os estudos utilizando frutose mostraram que quando o experimento não foi agitado, houve perda da viabilidade celular e consumo ineficiente da fonte de carbono nos meios contendo casaminoácidos e sulfato de amônio, e este efeito foi mais acentuado na linhagem VIN7, que quando cultivada em

meio contendo glicose e glicose mais frutose consumiu eficientemente a fonte de carbono. As duas linhagens de levedura não fermentaram frutose tão eficientemente como ocorreu com glicose e glicose mais frutose, e os efeitos sobre os parâmetros fermentativos refletiram acentuadamente nos experimentos sem agitação, onde se observou a utilização diferenciada de frutose pelas duas linhagens em meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, de forma que a quantidade de açúcar residual e a perda de viabilidade foram maiores para a linhagem VIN7.

A suplementação com sulfato de amônio induziu o desempenho fermentativo inferior para as duas linhagens utilizadas, principalmente quando os cultivos foram realizados com agitação, onde houve menor produção de biomassa e considerável perda da viabilidade celular. A menor produção de biomassa se deve, em parte, ao fato da levedura necessitar de uma quantidade de energia extra para sintetizar seus aminoácidos e proteínas, devendo ser sintetizados a partir da fonte de carbono e do íon amônio. A síntese de aminoácidos gera um excesso de prótons que devem ser bombeados para fora da célula com o objetivo de manter o pH intracelular constante, resultando na acidificação do meio de cultura. Essa acidificação do meio pode influenciar negativamente no transporte de amônio e no crescimento celular (WIAME *et al.*, 1985; CRUZ *et al.*, 2003). Para contornar tal problema principalmente na suplementação com sulfato de amônio, foram adicionados pequenos volumes de NaOH na tentativa de manter o pH do meio de cultura em torno de 5,0, o que resultou, principalmente nos cultivos realizados sem agitação, em uma maior produção de biomassa com consumo eficiente da fonte de carbono e produção de elevados níveis de etanol nos cultivos contendo glicose mais frutose.

Os resultados obtidos dos cultivos realizados sem agitação para as três fontes de carbono sugerem que a fonte nitrogenada peptona propicia condições eficientes para o crescimento das leveduras. Já na suplementação com casaminoácidos, os resultados obtidos mostraram que há menor produção de biomassa, porém com manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono para os cultivos realizados com glicose e glicose mais frutose. Para os cultivos realizados com agitação para as três fontes de carbono utilizadas, peptona foi a fonte nitrogenada que propiciou melhores condições de fermentação com elevada produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono. Os resultados obtidos sugerem que a fonte nitrogenada, o tipo da fonte de carbono e as condições de cultivo podem interferir diretamente na eficiência da fermentação.

Um dos aspectos mais intrigantes nestes estudos foi a verificação da participação da fonte de nitrogênio no desempenho fermentativo das leveduras industriais. Tanto a peptona como os casaminoácidos apresentam composição complexa de aminoácidos livres, além de uma quantidade considerável de aminoácidos na forma peptídica. Os peptídeos encontram-se em maior quantidade em peptona, e eles já se constituem em um conjunto de compostos complexos, pois além de diferentes tamanhos apresentam diferentes seqüências de aminoácidos. É neste quadro complexo de fontes de nitrogênio que as leveduras têm que ajustar o seu metabolismo. Aparentemente, o cultivo agitado foi o que se mostrou mais sensível a variação da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio, e nesta condição, peptona foi a fonte nitrogenada que propiciou melhor desempenho fermentativo. No cultivo não agitado, até a complementação com sulfato de amônio se mostrou adequada, frente aos parâmetros considerados. Neste sentido parece que a presença de oxigênio induz um forte efeito metabólico nas leveduras, mesmo em condições de repressão catabólica intensa, como no caso da presença de alta concentração de glicose e frutose.

Peptona e casaminoácidos são fontes nitrogenadas comerciais de hidrolisado enzimático de proteínas e hidrolisado ácido de proteínas apresentando em sua composição grande quantidade de aminoácidos complexados na forma de peptídeos e menor fração na forma de aminoácidos livres, sendo em peptona 10,68% e em casaminoácidos 32,22% na forma livre. As análises da distribuição de peptídeos também mostraram que peptona e casaminoácidos diferem quanto a sua composição, por apresentarem peptídeos de diferentes tamanhos e/ou seqüência. Os resultados obtidos das análises de aminoácidos após a fermentação mostraram em peptona, para as duas linhagens utilizadas, nas duas condições de cultivo, que 20h após o cultivo quase todos os aminoácidos livres foram consumidos, e após a hidrólise ácida, o aumento da concentração de aminoácidos foi gradativo, podendo ser um indicativo do aumento de aminoácidos, peptídeos e/ou proteínas no meio de cultura por perda e/ou secreção pelas leveduras. Apesar de a secreção de proteases não ser uma habilidade comumente atribuída a *Saccharomyces cerevisiae* há controvérsias quanto a tal característica, como observado em trabalhos anteriores (FEUILLAT *et al.*, 1980; ORMROD *et al.*, 1991; ALEXANDRE *et al.*, 2001), trabalhando com produção de proteases extracelulares em fermentação alcoólicas e produção de enzimas proteolíticas em cerveja, respectivamente.

As análises da distribuição de peptídeos também confirmaram que após o processo fermentativo, outras frações peptídicas, diferentes das encontradas no meio de cultura não fermentado, encontravam-se no meio fermentado. A liberação de peptídeos pela levedura em questão também foi observada, porém em condições enológicas, onde o autor registrou um aumento de compostos nitrogenados a partir de 144h de fermentação (ALEXANDRE *et al.*, 2001).

Devido as diferentes constituições das fontes de nitrogênio, as leveduras dependem da capacidade de transporte de aminoácidos e peptídeos através da membrana plasmática para que estes nutrientes sejam utilizados (HORÁK, 1997; WILES *et al.*, 2006). A seleção e regulação do nitrogênio assimilável são mecanismos celulares para prevenir ou reduzir a síntese desnecessária de enzimas e permeases para a utilização de fontes nitrogenadas secundárias quando há disponibilidade de fontes primárias (MAGASANIK & KAISER, 2002).

Devido a capacidade que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta em selecionar os nutrientes a serem utilizados (PIERCE, 1987; IRAQUI *et al.*, 1999), o que também pode ocorrer para frações peptídicas, como observado no presente trabalho, onde ambas as linhagens consumiram parcialmente as frações correspondentes ao tempo de 7 a 13 min em 220nm, em cultivos agitados suplementados com peptona. As frações III e IV em 220nm também foram eficientemente consumidas nas duas condições de cultivo, ao passo que na suplementação com casaminoácidos, a fração peptídica III em 280nm foi eficientemente consumida por ambas as linhagens nas duas condições de cultivo.

Os resultados apresentados nessa dissertação mostram que a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio, o tipo da fonte de carbono e as condições em que se realizam os cultivos interferem diretamente no desempenho fermentativo das leveduras. A produção de biomassa e de etanol e a manutenção da viabilidade celular variam para as linhagens estudadas, isto é, se mostraram dependentes tanto da fonte de carbono como para a fonte de nitrogênio e a interação em o metabolismo do carbono e do nitrogênio podem ser responsáveis pelas alterações dos parâmetros fermentativos das leveduras. Esperamos que esses resultados juntamente com outros estudos realizados em outros laboratórios auxiliem na compreensão do metabolismo desses microrganismos, uma vez que *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo mundialmente utilizado na produção de insumos biotecnológicos e responsável por elevados valores econômicos gerados nessas indústrias.

Considerações Finais

VI. Considerações Finais

Os resultados descritos neste trabalho sugerem que o tipo da fonte de carbono, a complexidade estrutural da fonte nitrogenada e a forma de cultivo causam diferentes efeitos sobre o metabolismo das linhagens vinícolas. Neste estudo as leveduras em diferentes meios foram cultivadas com e sem agitação, com o objetivo de se observar o efeito da presença do oxigênio no processo fermentativo.

Em cultivos agitados (presença do oxigênio), peptona foi a fonte nitrogenada que propiciou melhor desempenho fermentativo para as linhagens estudadas, com maior produção de biomassa e etanol, além de propiciar a manutenção da viabilidade celular. A presença de oxigênio exerceu forte impacto no metabolismo das leveduras nos meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, com menor produção de biomassa, perda na viabilidade celular e redução no consumo da fonte de carbono e conseqüentemente menor produção de etanol.

Os efeitos da agitação foram confirmados quando foram realizados experimentos não agitados (menor concentração de oxigênio), nos quais surpreendentemente, para as duas linhagens estudadas o consumo do açúcar foi eficiente e com a produção de alta concentração de etanol, nas três fontes de nitrogênio, apesar do baixo acúmulo de biomassa.

As linhagens de levedura não fermentaram frutose eficientemente como ocorreu com glicose e glicose mais frutose, e os efeitos sobre os parâmetros fermentativos refletiram, acentuadamente, nos experimentos sem agitação suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio, porém, a linhagem VIN13 mostrou ser mais eficiente que a linhagem VIN7, pois sempre produziu mais biomassa e manteve sua viabilidade mais elevada e consumiu mais eficientemente a fonte de carbono.

A manutenção do pH do meio suplementado com sulfato de amônio tornou o processo fermentativo eficiente nos cultivos não agitados em meios contendo glicose e glicose mais frutose.

Análise da composição de aminoácidos

As análises da composição de aminoácidos em peptona e casaminoácidos mostraram que peptona contém 10,68% de aminoácidos livres e casaminoácidos 32,22%.

Os resultados obtidos com peptona mostraram nas duas condições de cultivo para as duas linhagens analisadas, que 20h após o cultivo, quase todos os aminoácidos livres foram consumidos, e com o decorrer da fermentação houve aumento na concentração de aminoácidos no meio de cultura, observado após a hidrólise ácida do meio fermentado. O aumento da quantidade de aminoácidos na forma peptídica nos estágios finais de fermentação sugere que pode estar havendo perda e/ou secreção de compostos nitrogenados para o meio de cultura.

Perfil de distribuição de peptídeos

As leveduras, além de aminoácidos na forma livre, podem utilizar pequenos peptídeos como fonte de nitrogênio. A análise por HPLC mostra que a peptona é constituída de uma mistura complexa de peptídeos de diferentes tamanhos e composições. Como esperado, a análise do casaminoácidos mostra a distribuição de peptídeos bem menos complexa que a de peptona. Durante o cultivo várias frações peptídicas presentes tanto na peptona como em casaminoácidos são consumidas, mas uma fração considerável de peptídeos permanece no meio de cultivo. A comparação dos cromatogramas antes e após fermentação mostra o aparecimento de outras bandas peptídicas. O estudo da utilização de frações peptídicas ainda não está concluído, mas a análise comparativa mostra que as linhagens assemelham-se quanto ao consumo de frações peptídicas, tanto na suplementação com peptona, quanto na suplementação com casaminoácidos.

Referências

VII. Referências

- ALEXANDRE, H.; HEINTZ, D.; CHASSAGNE, D.; GUILLOUX-BENATIER, M.; CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M. Protease A activity and nitrogen fractions release during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 235-240, 2001.
- ALFENORE, S.; MOLINA-JOUVE, C.; GUILLOUET, S. E.; URIBELARREA, J. J.; GOMA, G.; BENBADIS, L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 67-72, 2002.
- ANGIER, N. A stupid cell with all the answers. **Discover**, v.19, p. 71-86, 1986.
- BATISTOTE, M.; CRUZ, S. H.; ERNANDES, J. R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine yeasts Influenced by complexity of nitrogen source. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 2, p. 84-91, 2006.
- BEESEER, A. E.; COOPER, T. G. Control of nitrogen catabolite repression is not affected by the tRNA^{Gln-CUU} mutation, with result in constitutive pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 8, p. 2472-2476, 1999.
- BELTRAN, G.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; ROSÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMON, J. M. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on kinetics and nitrogen consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 996-1002, 2005.
- BERNARD, E. A. Hexokinases from yeast. **Methods in Enzymology**, v. 42, p. 6-20, 1975.
- BERTHELIS, N. J.; CORDERO OTERO, R. R.; BAUER, F. F.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 683-689, 2004.
- BERTHELIS, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S.; THEVELEIN, J. M. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 1083-1091, 2008.

BEUDEKER, R. F.; VAN DAM, H. W.; VAN DER PLATA, 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.; FRAENKEL, D. G. Envolvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 1730-1734, 1983.

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: Cols Spring Harbor, 1982.

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.

DYNESEN, J.; SMITS, H. P.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Carbon catabolite repression of the invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose and manose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 579-582, 1998.

ENTIAN, K. D.; BARNETT, J. A. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, p. 506-510, 1992.

ENTIAN, K. D.; MACKE, D. Genetic evidence for a role of hexokinase isozyme PII in carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 870-874, 1982.

FEUILLAT, M.; BRILLANT, G.; ROCHARD, J. Mise en évidence d'une production de protéases exocellulaires per les levures au cours de la fermentation alcoolique du mout de raisin. **Conn Vigne Vin**, v. 14, p. 37-52, 1980.

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

GASCH, A. P.; WERNER-WASHBURN, M. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. **Functional Integrative Genomics**, v. 2, p. 181-192, 2002.

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, p. 546-547, 1996.

HOLZER, H. Catabolite inactivation in yeast. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 1, p. 178-181, 1976.

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.

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 acid and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the *AGP1* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 2, p. 989-1001, 1999.

JAUNIAUX, J. C.; GRENSON, M. *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 190, p. 39-44, 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.

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.

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, p. 1-18, 2002.

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 of the characterization of proteins and peptides in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 63-75, 2002.

ORMROD, I. H. L; LALOR, E. F.; SHARPE, F. R. The release of yeast proteolytic enzymes into beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 97, p. 441-443, 1991.

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

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and Regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 554-569, 1999.

PEREZ, M.; LUYTEN, K.; MICHEL, R.; RIOU, C.; BLONDIN, B. Analisis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low and high-affinity Hxt transporters are expressed. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 351-361, 2005.

PETER, G. J.; DURING, L.; AHMED, A. 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.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 36-43, 2006.

SALMON, J. M.; VINCENT, O.; MAURICIO, J. C.; BELY, M.; BARRE, P. Sugar transport inhibition and apparent loss of stuck enological fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 953-958, 1989.

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.; SONG, W.; ZHANG, L.; NAIDER, F.; BECHER, J. M.; STACEY, G. An arabidopsis peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1289-1299, 1994.

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

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, n. 1, p. 67-83, 2000.

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

VARELA, C.; CARDENAS, J.; MELLO, F.; AGOSIN, E. Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions. **Yeast**, v. 22, p. 369-383, 2005.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 145-157, 2007.

WIEBE, M. G.; RINTALA, E.; TAMMINEN, A.; SIMOLIN, H.; SALUSJARVI, L.; TOIVARI, M.; KOKKONEN, J. T.; KIURU, J.; KETOLA, R. A.; HUUSKONEN, A.; MAAHEIMO, H.; RUOHONEN, L.; PENTTILA, M. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 1, p. 140-154, 2008.

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

WILES, A. M.; CAI, H.; NAIDER, F.; BECKER, M. Nutrient regulation of oligopeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 152, p. 3133-3145, 2006.

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.