

O ESTUDO DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE FRAÇÕES PEPTÍDICAS COMO FONTE DE NITROGÊNIO NA FERMENTAÇÃO DE DIFERENTES AÇÚCARES POR LEVEDURAS INDUSTRIAIS.

Wesley de Oliveira Rosa, José Roberto Ernandes, Margareth Batistote, Eduardo Maffud Cilli e Messias Miranda Júnior. – Bioquímica - Química - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química – Instituto de Química, UNESP - Campus de Araraquara.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos eucariotos mais simples e seu metabolismo é altamente versátil, podendo crescer em muitas fontes de carbono fermentescível e não-fermentescível, e há milênios tem sido utilizada na panificação e na produção de cervejas (1;2). Devido a sua importância biotecnológica e pelo fato da levedura se constituir num excelente modelo de célula eucariótica, os vários mecanismos que regulam o seu metabolismo tem sido objeto de muito estudo. Muitos aspectos dos mecanismos de regulação e de sinalização celulares relativos à utilização de açúcares e de outras fontes de carbono já são bem conhecidos (3;5). Entretanto, no cultivo de qualquer tipo de células não apenas os açúcares estão presentes, mas são necessárias a presença de vitaminas, sais e uma fonte de nitrogênio. Do ponto de vista quantitativo, carbono e nitrogênio são os principais nutrientes de leveduras, e este fato sugere que o fluxo destes nutrientes e as suas interações constituam parâmetros importantes na regulação do metabolismo celular.

Resultados obtidos em nossos laboratórios mostraram que a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio tem um efeito importante no desempenho fermentativo de leveduras industriais, interferindo com a produção de biomassa e de etanol. Este trabalho teve como o objetivo específico o estudo da utilização de frações peptídicas isolada da peptona por diferentes linhagens de leveduras industriais e seu efeito no metabolismo celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Fiso, *Saccharomyces cerevisiae*, levedura da 'Fleischmann e Royal Produtos Alimentícios Ltda'; **A3**, *Saccharomyces cerevisiae*, tipo 'Ale'; **L52**, *Saccharomyces cerevisiae* - *uvarum* (*carlsbergensis*), tipo 'Lager', ambas de cervejaria, cedidas pela Labatt Brewery of Canada.

MEIOS DE CULTIVO

As células de levedura foram mantidas em meio YPD contendo 1,0% (p/v) de extrato de levedo; 1,0% (p/v) de peptona; 2,0% de glicose; 2,0 % (p/v) de ágar e água destilada. O meio básico de cultivo foi preparado duas vezes concentrado, contendo YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônio. A fonte de carbono foi preparada separadamente, também duas vezes concentrada. Ambas as soluções tiveram o pH ajustado para 5,0 e foram esterilizados. Como fonte de nitrogênio utilizamos duas frações de peptídeos isoladas de peptona por cromatografia de filtração, uma identificada como fração 4-8 constituída exclusivamente de peptídeos e a fração 9-14, constituída de peptídeos menores e de aminoácidos livres.

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

1. Determinação do crescimento celular (Biomassa)

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

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

onde *f*, fator de conversão de absorbância em massa seca, para a levedura *S. cerevisiae* é 0,6711.

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).

3. Determinação do açúcar residual

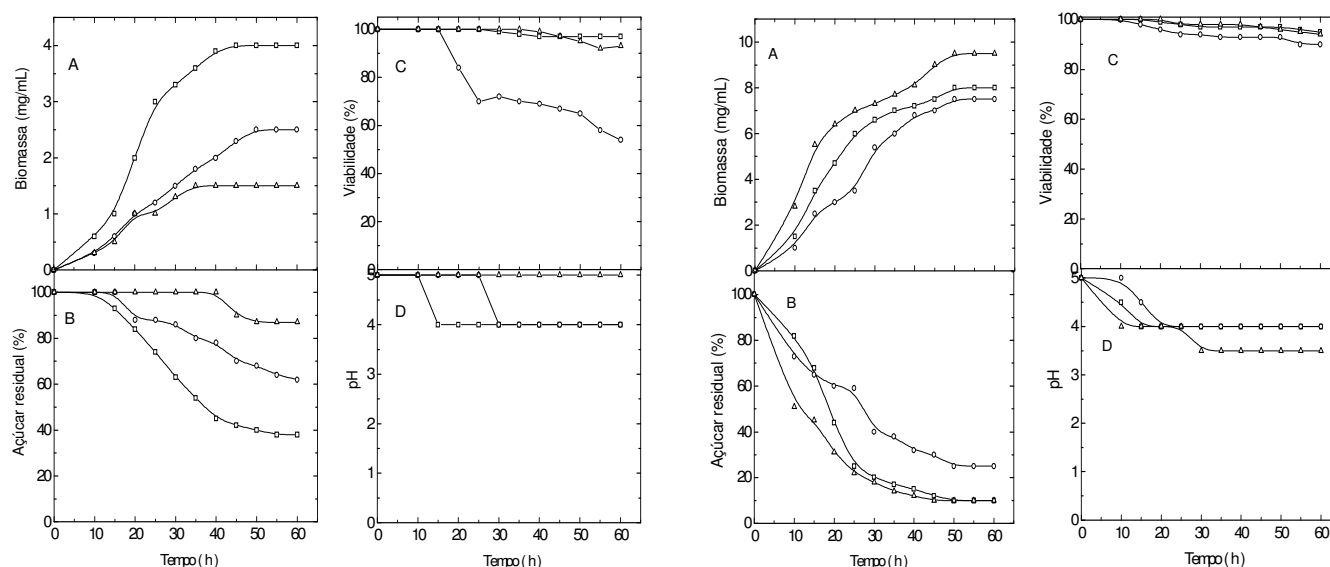
A consumo de nutrientes (fonte de carbono) foi determinado através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (MILLER, 1959).

Preparação das frações peptídicas a partir de peptona

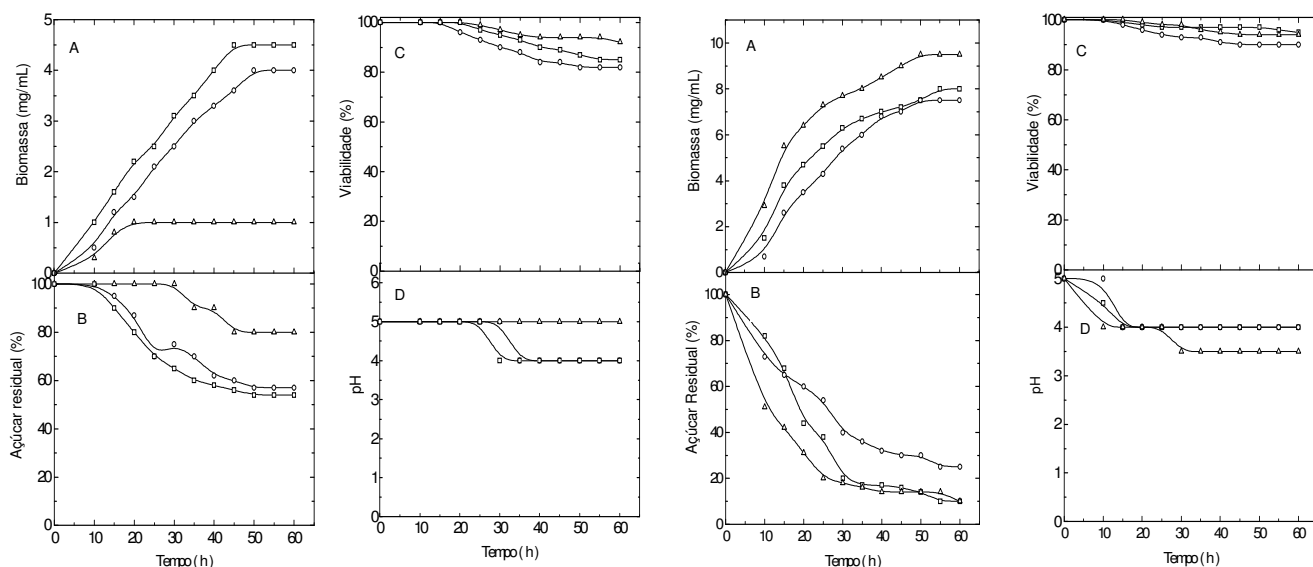
Para a separação das frações peptídicas a partir da peptona foi utilizada uma coluna cromatográfica clássica com resina Sephadex G-25, acoplado a uma bomba de vácuo e um coletor de frações. Foi aplicada uma solução de peptona contendo 0,5 g/mL, e a coluna foi eluída com uma solução de acetato de amônio,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

RESULTADOS

Neste trabalho utilizando as frações peptídicas isoladas da peptona. Os dados mostram as linhagens industriais crescidas em glicose e maltose 2% (p/v). Pode-se observar que na fração 4-8, em glicose, o maior acúmulo de biomassa ocorreu para a linhagem Fiso, seguido pela linhagem L52. A linhagem A3 foi a que apresentou menor acúmulo de biomassa. Na fração de (9-14), todas as linhagens crescem bem, sendo que a linhagem A3 que apresenta maior acúmulo de biomassa (Figuras 1 e 2). Em maltose 2% (p/v) observa-se que as linhagens Fiso e L52 apresentaram crescimento semelhante, e que o crescimento da linhagem A3, mesmo em maltose, assemelha-se ao detectado no meio com glicose (Figura 3). Os dados obtidos no meio com a fração (9-14) como fonte e nitrogênio, mostrado na figura 4, o crescimento das linhagens industriais é intenso, sendo que a linhagem A3 é a que produz mais biomassa.



Figuras 1 e 2. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), viabilidade celular (C) e pH (D). Linhagem A3 (Δ), L52 (o) e Fiso (\square), crescimento em meio YNB contendo 1% (p/v) da fração (4 - 8) (**Figura 1**) e 1% (p/v) da fração (9 - 14) (**Figura 2**) em 2% (p/v) de glicose. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.



Figuras 3 e 4. Produção de biomassa (A), açúcar residual (B), viabilidade celular (C) e pH (D). Linhagem **A3** (Δ), **L52** (o) e **Fiso** (□), crescimento em meio **YNB** contendo 1% (p/v) da fração (4 - 8) (**Figura 3**) e 1% (p/v) da fração (9 – 14) (**figura 4**) em 2% (p/v) de maltose. Condições de cultivo: 30°C, 250 rpm e pH inicial 5,0.

CONCLUSÕES

As linhagens apresentaram diferente produção de biomassa quando cultivadas em meios contendo frações isoladas da peptona como fonte de nitrogênio:

A linhagem Fiso é que apresentou maior produção de biomassa na fração (4-8) tanto em maltose como em glicose como fonte de carbono. A linhagem L52 tem crescimento similar ao da linhagem Fiso em maltose, mas inferior na presença de glicose. A produção de biomassa pela linhagem A3 em glicose e maltose 2%, na fração de (4-8), é inferior aos da outras linhagens.

Na fração de (9-14), constituída de peptídeos menores e aminoácidos, as linhagens A3, Fiso e L52 apresentaram um bom crescimento celular, sendo que a linhagem A3 foi a que produziu mais biomassa.

Os dados mostrados neste trabalho sugerem que os diferentes perfis de crescimento para as linhagens industriais podem refletir diferenças nas capacidades das leveduras em utilizar fontes de nitrogênio na forma de peptídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. WILLS, C. (1990) Regulations of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 245- 280.
02. ROSEN, K. Production of baker's yeast. In Berry, D.R., Russel, I. and Stewart, G.G. (ed) *Yeast Biotechnology*, Allen and Unwin, London, 1987, 471-500.
03. RONNE, H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*, 1, 12-17.

04. GANCEDO, J. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 334-361.
05. SCHNEPER, L., DUVEL, K. and BROACH, R.J. (2004) Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 07, 624-630.
06. LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.(1981) Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v. 11, p. 641-649.
07. MILLER, G. L.(1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-430.