

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**FERNANDA BADOTTI**

**CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE LEVEDURAS  
ASSOCIADAS À PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL E  
ESTUDOS BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO DE SACAROSE  
POR LINHAGENS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Florianópolis**

**2005**

**FERNANDA BADOTTI**

**CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE LEVEDURAS  
ASSOCIADAS À PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL E  
ESTUDOS BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO DE SACAROSE  
POR LINHAGENS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da  
Universidade Federal de Santa Catarina, visando  
à obtenção do grau de Mestre em Ciência dos  
Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk  
Co-orientador: Prof. Dr. Ernani Sant'anna

**Florianópolis  
2005**

Dedico este trabalho ao meu pai, Juscelino Badotti e  
à minha avó, Maria Odete Badotti.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Boris, por compartilhar seus conhecimentos, pela dedicação e exemplo de profissional. Agradeço imensamente pelas oportunidades proporcionadas durante o tempo de trabalho junto.

À colega de laboratório e “parceira” Denise, que muito contribuiu para este trabalho.

À vizinha e amiga Simone, pelas correções e pela solidariedade.

Ao Luciano, pela amizade e companheirismo.

A todos aqueles que estiveram presente no período de execução deste trabalho e que de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação profissional e pessoal, especialmente Cláudia, Marcelo, Sérgio, Luiz, Maria Luiza, Ricardo, Patrícia, Maurício, Cristiane e Carine.

Aos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos.

Ao professor Ernani, pelas contribuições e oportunidades oferecidas.

Aos professores Hernán, Nelson, Afonso e Risoleta, que permitiram o uso de seus equipamentos.

Ao professor Carlos Rosa, pela oportunidade e permissão de realizar alguns experimentos em seu laboratório. Agradeço pela excelente recepção, auxílio e incentivo.

À Anne, que gentilmente me recebeu em sua casa, à Roberta, extremamente paciente e dedicada, Dora e Carol pela calorosa acolhida em Belo Horizonte.

Ao Sr. V.I.S., produtor de cachaça e seus funcionários, por permitirem a coleta de amostras em sua cachaçaria.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Fundação de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (FUNCITEC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A sacarose é o principal açúcar utilizado em processos industriais fermentativos, sua adequada metabolização pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* é fundamental para a otimização desses processos, seja visando o maior rendimento em etanol, a produção de biomassa ou a formação de compostos secundários. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características bioquímicas e microbiológicas da etapa fermentativa para a produção de cachaça em Santa Catarina, procurando justificar os motivos pelos quais a bebida catarinense é tão pouco valorizada. Além disso, as vias de metabolização de sacarose foram caracterizadas molecularmente. Para o primeiro objetivo proposto, foram coletadas amostras dos processos fermentativos em uma cachaçaria localizada na grande Florianópolis, que utiliza caldo-de-cana ou melado como substratos. As análises realizadas revelaram significativa presença de bactérias e leveduras diferentes de *S. cerevisiae* no caldo, o que não acontece com o melado. Ainda, através de ensaios bioquímicos, mostrou-se que significativas variações podem ocorrer na composição de açúcares do melado. Finalmente, a avaliação das 16 linhagens de levedura isoladas durante o processo, revelou que não há relação entre a atividade invertase presente nas células e a capacidade de fermentar sacarose. A análise molecular da utilização desse dissacarídeo por *S. cerevisiae* mostrou que cepas sem atividade invertase ou cepas sem os principais transportadores de hexoses, e, portanto incapazes de fermentar glicose e frutose, continuam fermentando sacarose graças à captação direta do açúcar para o interior da célula. A seguir, foi desenvolvida e caracterizada uma linhagem de levedura capaz de metabolizar a sacarose através de um transportador de baixa afinidade pelo substrato. Essa levedura engenheirada apresenta um metabolismo de sacarose predominantemente oxidativo, produzindo menos etanol e mais biomassa quando crescida em condições aeróbicas. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o monitoramento da composição dos substratos e da eficiência dos processos fermentativos, associado a boas práticas de fabricação, tornariam a composição da cachaça catarinense menos sujeita a variações, melhorando sua qualidade e valor comercial. Além disso, a caracterização molecular do transporte ativo e da fermentação de sacarose por *S. cerevisiae*, bem como a utilização de linhagens com aumentada produção de biomassa, constituem importantes avanços na otimização de processos industriais que utilizam caldo-de-cana como substrato, tais como a produção de bebidas alcoólicas, álcool combustível e leveduras de panificação.

Palavras-chave: Sacarose. *S. cerevisiae*. Otimização de processos fermentativos.

## ABSTRACT

Sucrose is the major sugar used in industrial fermentative processes, and its correct metabolism by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is required to optimize these processes, either looking at enhanced ethanol production, biomass production, or production of other metabolites. In this work we analyzed the biochemical and microbiological characteristics of the fermentative step during *cachaça* production in Santa Catarina. Moreover, we performed a molecular characterization of the sucrose utilization pathways in *S. cerevisiae*, which allowed the development of strategies in order to optimize the industrial production of this yeast. For the first proposal, samples were taken from a fermentative processes of a *cachaça* distillery located in Florianópolis, which utilizes sugarcane juice or molasses (*melado*) as substrates. Our analysis revealed significant amounts of bacteria and yeasts in the sugarcane juice, but not in the *melado*. However, we found significant variations in the sugar composition of the *melado*, while sucrose was the major sugar found in the sugarcane juice. The analysis of several yeast strains isolated during the process revealed a poor correlation between invertase activity of the cells, and their sucrose fermentation capacity. The molecular analysis of sucrose utilization by *S. cerevisiae* revealed that yeast strains lacking invertase, or strains that lack the major hexose transporters and thus are incapable of fermenting glucose or fructose, still ferment sucrose efficiently due to the direct uptake of the sugar into the cells. We then developed and characterize a strain that metabolizes sucrose through a low-affinity transporter. This engineered strain shows an enhanced oxidative metabolism of sucrose, producing less ethanol and more biomass under aerobic growth conditions. Thus, from the analysis of our results we can conclude that monitoring the substrate composition and the efficiency of the fermentative processes, together with good manufacturing practices, may turn the *cachaça* composition less variable, improving its quality and commercial value. Furthermore, the molecular characterization of active sucrose transport and fermentation by *S. cerevisiae*, and the utilization of strains with increased biomass production, constitute important developments to optimize yeasts for sugarcane-based industrial processes, like production of distilled beverages, fuel ethanol, and baker's yeast.

Key words: Sucrose, *S. cerevisiae*, Optimization of fermentation processes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Composição de açúcares no caldo-de-cana .....	24
Figura 2.2. Composição de açúcares no melado.....	24
Figura 2.3. Análise microbiológica do caldo-de-cana .....	25
Figura 2.4. Análise microbiológica do início do processo fermentativo que utiliza caldo-de-cana.....	26
Figura 2.5. Concentração de leveduras ao longo dos processos fermentativos .....	27
Figura 2.6. Evolução do processo fermentativo no primeiro ciclo analisado.....	28
Figura 2.7. Evolução do processo fermentativo no segundo ciclo analisado.....	29
Figura 2.8. Evolução do processo fermentativo no terceiro ciclo analisado.....	29
Figura 2.9. Cariotipagem de algumas leveduras isoladas .....	32
Figura 3.1. Modelo atual do metabolismo da sacarose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
Figura 3.2. Fermentação aeróbica de sacarose por cepas de <i>S. cerevisiae</i> com gene <i>SUC2</i> ou <i>SU3</i> .....	47
Figura 3.3. Fermentação aeróbica em batelada de sacarose pela cepa 1403-7A.....	49
Figura 3.4. Fermentação aeróbica em batelada de sacarose pela cepa KY73.....	49
Figura 4.1. Análise cinética do cotransporte sacarose-H <sup>+</sup> .....	63
Figura 4.2. Crescimento aeróbico em batelada com 20 g/L sacarose.....	64
Figura 4.3. Efeito da antimicina A no crescimento aeróbico em batelada com sacarose.....	65
Figura 4.4. Fermentação em batelada com altas concentrações de células.....	67
Figura 4.5. Fermentação em batelada de 250 g/L sacarose.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Cepas isoladas na cachaçaria durante três ciclos fermentativos .....	31
Tabela 2.2. Atividade invertase e eficiência fermentativa das cepas isoladas na cachaçaria.....	33
Tabela 3.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> usadas neste estudo.....	44
Tabela 3.2. Velocidade específica de crescimento, produção de etanol em sacarose, transporte ativo e hidrólise de sacarose pelas diferentes cepas de levedura.....	47
Tabela 4.1. Velocidade específica de crescimento, biomassa produzida e rendimento em etanol das linhagens 1403-7A e LCM001.....	63



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>14</b>
<b>2: Caracterização bioquímica e microbiológica da fermentação artesanal para produção de cachaça em Santa Catarina.....</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Análises microbiológicas.....	20
2.2.2 Análises bioquímicas.....	21
2.2.3 Determinação da atividade invertase.....	21
2.2.4 Testes fermentativos em batelada.....	22
2.2.5 Cariotipagem.....	22
<b>2.3 RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Análise bioquímica e microbiológica dos substratos.....	23
2.3.2 Análise bioquímica e microbiológica dos processos fermentativos.....	25
2.3.3 Identificação das cepas de levedura isoladas.....	30
2.3.4 Parâmetros fermentativos das linhagens para a produção de cachaça.....	32
<b>2.4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>3: Transporte ativo e fermentação de sacarose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 Cepas de leveduras, meios e condições de crescimento.....	44
3.2.2 Ensaio de fermentação.....	45
3.2.3 Ensaio de transporte.....	45
3.2.4 Ensaio enzimático.....	45
3.2.5 Determinação de sacarose, glicose, frutose e etanol.....	46
<b>3.3 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
3.3.1 Fermentação de sacarose por cepas <i>SUC2</i> ou <i>SUC3</i> .....	46
3.3.2 Fermentação de sacarose por uma cepa <i>suc<sup>-</sup></i> sem invertase.....	48
3.3.3 Fermentação de sacarose por uma cepa sem transportadores de hexoses.....	48
<b>3.4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

<b>4: Modificando o metabolismo de sacarose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>56</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>60</b>
4.2.1 Cepas de leveduras, meios e condições de crescimento.....	60
4.2.2 Ensaio de transporte.....	60
4.2.3 Ensaio de fermentação e avaliação bioquímica do processo fermentativo.....	61
<b>4.3 RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
<b>4.4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>5 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>76</b>
<b>APÊNDICE A: Artigo publicado na revista</b> <b><i>Brazilian Archives of Biology and Technology</i></b> .....	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é atualmente o principal microrganismo utilizado na produção de bebidas alcoólicas, álcool combustível e panificação (INGLEDEW, 1993). Isto se deve ao fato dessa levedura ser um eficiente fermentador de açúcares, mesmo na presença de oxigênio (LAGUNAS, 1979, 1986). Além disso, as células de *S. cerevisiae* constituem um excelente modelo experimental de estudo dos fenômenos de biologia celular, molecular e bioquímica das células eucarióticas (BOTSTEIN; FINK, 1988).

Apesar do grande interesse da indústria produtora de álcool em aumentar o rendimento em etanol através do melhoramento de linhagens de leveduras, nem todas as indústrias de fermentação têm por finalidade obter, a partir de carboidratos, etanol em concentração máxima. Na produção de bebidas alcoólicas, a formação de outras substâncias, de ação organoléptica, são tão importantes quanto o álcool etílico e o produto final é, comercialmente, mais valioso que o da indústria alcooleira (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983). A composição do substrato controla muitos aspectos da fermentação na produção de bebidas e as linhagens de levedura devem ser selecionadas para se adaptar ao meio particular de cada processo (WATSON, 1993).

No Brasil, o caldo-de-cana é utilizado para produzir uma bebida destilada muito popular, a cachaça. Essa bebida, obtida pela destilação de mosto fermentado de cana-de-açúcar, é o terceiro destilado mais consumido no mundo, ficando atrás apenas da vodka e do whisky. O Brasil produz anualmente 1,5 bilhão de litros de cachaça, que rendem aproximadamente US\$ 500 milhões ao país (VASCONCELOS, 2003). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Cachaça de Alambique (IBCA), dos 1,5 bilhão de litros produzidos por ano, aproximadamente 1,0 bilhão é de cachaça industrial, produzida em destilarias, e o restante, de cachaça artesanal, feita em pequenos alambiques. O setor reúne cerca de 30 mil produtores, que lançam no mercado 5 mil marcas. São aproximadamente 400 mil empregos diretos. São Paulo é o líder na produção, com 44%, seguido de Pernambuco e Ceará, com 12% cada um. Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás e Espírito Santo, cada um com 8% do mercado, completam a lista dos principais fabricantes. Analisando apenas os números da cachaça artesanal, Minas Gerais é o principal centro produtor. O estado tem 8.466 alambiques que produzem 230 milhões de litros por ano (VASCONCELOS, 2003).

A produção de cachaça no país destina-se quase totalmente ao mercado interno. Contudo, a bebida vem conquistando novos mercados. Em 2002, foram exportados 14,8 milhões de litros (1% da produção) para 70 países. A Europa compra cerca de 60% do total exportado, sendo a

Alemanha a maior importadora com 30% do total (VASCONCELOS, 2003). No Brasil, a padronização na qualidade da cachaça resultaria em melhor aceitação do produto tanto por consumidores, como por novos apreciadores, criando condições para aumentar o volume de exportações (BOZA; HORII, 1998). Além disso, o fato de cachaça e rum serem consideradas a mesma bebida no mercado norte-americano, prejudica as exportações. A OMA (Organização Mundial das Aduanas) coloca tanto o rum como a aguardente na categoria geral dos destilados de cana-de-açúcar (WINCK, 2003).

Em Santa Catarina, a exemplo de Minas Gerais, a produção de cachaça ocorre em escala artesanal, realizada por milhares de pequenos agricultores, muitos dos quais trabalham de forma clandestina. O estado possui cerca de 1200 produtores e somente 20 são legalizados (informação verbal)<sup>1</sup>. Essa atividade não tem destaque no contexto nacional, entretanto, já foi a base econômica de milhares de produtores no estado. O Programa Cachaça Catarinense, uma parceria do SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial), SEBRAE (Serviço de apoio às micro e pequenas empresas) e EPAGRI (Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de Santa Catarina) reúne 63 produtores em todo o estado e objetiva o reconhecimento nacional da nossa cachaça.

Como mencionado anteriormente, a levedura *S. cerevisiae* também é utilizada para a produção de álcool combustível. Em 2004, a produção mundial de álcool foi em torno de 45 bilhões de litros, volume que vem aumentando nos últimos dez anos e, graças a políticas ambientalistas adotadas por certos governos, encontra-se em plena expansão (BERG, 2004; ZANIN et al., 2000). Os países que contribuem com grande parte da produção global são o Brasil (53% do total) e Estados Unidos (19%), seguidos por China, Índia e Rússia. No Brasil, o mercado de açúcar e álcool, principais produtos do cultivo da cana-de-açúcar, fatura cerca de US\$ 7,5 bilhões/ano. O país é o maior produtor de açúcar a partir de cana e o único a implantar, em larga escala, combustível alternativo ao petróleo, o álcool, reconhecido mundialmente por preservar o meio ambiente e por suas vantagens sociais e econômicas. Esse setor industrial gera ao Brasil mais de 600.000 empregos diretos (ZANIN et al., 2000). Atualmente, o maior uso do etanol é

<sup>1</sup> Notícia fornecida por ALTMANN, R. durante o I Seminário da cachaça de Santa Catarina. Palestra: Certificação de qualidade e origem como estratégia de agregação e renda, em Florianópolis, em julho de 2002.

como aditivo para a gasolina, já que reduz a emissão de monóxido de carbono, óxidos de nitrogênio e hidrocarbonetos, além de constituir fonte renovável de energia (WHEALS et al., 1999).

Além da produção de aguardente e álcool, a cana-de-açúcar é o substrato de preferência na produção de leveduras de panificação. Essas são ainda conhecidas como fermento e são utilizadas principalmente na manufatura de pães. As linhagens da levedura, quando incorporada às massas, fermentam os açúcares presentes para produzir etanol e dióxido de carbono. Esse último exerce papel fundamental no aumento de volume da massa, bem como na formação da estrutura e textura do produto final. Além dessas propriedades, a adição de leveduras contribui com o sabor do pão (ROSE; VIJAYALAKSHMI, 1993).

No Brasil, o segmento de panificação e confeitaria possui um faturamento anual de aproximadamente R\$ 25 bilhões e é responsável pela criação de 550.000 empregos. O consumo de pão no Brasil (27 Kg/ano/pessoa) é bem inferior ao de países como a Alemanha (91 Kg per capita/ano), maior consumidor mundial, e representa metade da porção recomendada pela OMS (Organização Mundial de Saúde – ONU) e pela FAO (Food and Agricultural Organization). Apesar de não se destacar no consumo de pão, os altos lucros atingidos nos últimos anos pelo setor no Brasil justificam as profundas transformações que suas indústrias vêm sofrendo, num movimento em direção à modernização, melhoria da qualidade e aumento da produtividade (SINDIPAN, 2005).

Os setores industriais citados estão constantemente investindo no desenvolvimento de linhagens de leveduras mais adequadas aos seus interesses, quer sejam o rendimento em etanol, a alta produção de biomassa ou a adequada formação de compostos secundários. Assim, células com aumentada tolerância a altas concentrações de etanol e a altas temperaturas ou, ainda, linhagens de leveduras floculantes, que dispensam a etapa de centrifugação, estão sendo introduzidas em algumas destilarias (WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000).

No primeiro capítulo deste trabalho abordamos o processo de produção de cachaça em Santa Catarina. A bebida produzida no estado é pouco valorizada devido à falta de padronização e investimentos, além disso, há pouco estudo disponível a seu respeito. A partir de análises bioquímicas e microbiológicas realizadas em amostras coletadas numa cachaçaria localizada na grande Florianópolis, procuramos gerar conhecimento e propor soluções para agregar valor ao produto.

O segundo capítulo faz uma análise das vias de utilização da sacarose por *S. cerevisiae*. Através do uso de cepas sem atividade invertase e de cepas sem os principais transportadores de hexoses, e portanto incapazes de fermentar glicose e frutose, demonstramos que a sacarose pode ser fermentada eficientemente graças à captação direta do açúcar para o interior da célula. No terceiro, a partir dos conhecimentos adquiridos, obtivemos uma nova linhagem modificada geneticamente capaz de produzir maior concentração de biomassa quando crescida aerobicamente, mantendo a capacidade de fermentar altas concentrações de sacarose. Estes dois últimos capítulos abrem novas perspectivas para a utilização de leveduras em processos fermentativos industriais a partir da cana-de-açúcar, matéria-prima abundante e barata no Brasil.

## REFERÊNCIAS

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. *Alimentos e bebidas produzidas por fermentação*. São Paulo: Edgard Blucher, 1983.

BERG, C. World fuel ethanol - analysis and outlook. Disponível em:<<http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>>. Acesso em: 5 jan. 2004, 10:30:00.

BOTSTEIN, D.; FINK, G.R. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*, v.240, p.1439-1443, 1988.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.18, p.391-396, 1998.

INGLEDEW, W.M. Yeasts for production of fuel ethanol. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S (eds). *The yeasts*. San Diego, USA: Academic Press, 1993. v.5, p.245-291.

LAGUNAS, R. Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cel. Biochem.*, v.27, p.139-146, 1979.

LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.2, p.221-228, 1986.

ROSE, A.M.; VIJAYALAKSHMI. Baker's yeasts. In: ROSE, A.M.; HARRISON, J.S (eds). *The yeasts*. 2th ed. San Diego:Academic Press, 1993.

SINDIPAN – Sindicato da indústria da panificação e confeitaria. Disponível em <<http://www.sindipan.org.br>>. Acesso em: 6 fev. 2005, 18:30:00.

VASCONCELOS, Y. Cachaça sem mistério. *Rev. Pesquisa Fapesp*, v. 87, p.74-77, 2003.

WATSON, D.C. Yeasts in distilled alcoholic-beverage production. In: ROSE, A.M.; HARRISON, J.S (eds). *The yeasts*. 2th ed. San Diego:Academic Press, 1993.

WHEALS, A.E. et al. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.*, v.17, p.482-487, 1999.

WINK, A. Cachaça e rum. *Rev. Empreendedor*, Dez 2003. Disponível em:<<http://www.empreendedor.com.br/visualizar.php?revista=4&edição=158&secao=171&pagina=2>>. Acesso em:10 fev. 2005, 16:30:00.

ZANIN, G.M. et al. Brazilian bioethanol program. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.84-86, p.1147-1161, 2000.

## **2 Caracterização bioquímica e microbiológica da fermentação artesanal para a produção de cachaça em Santa Catarina**

— Trabalho a ser submetido para publicação na revista *Ciência e Tecnologia de Alimentos* ou *Brazilian Journal of Food Technology*

### **RESUMO**

Com a finalidade de agregar valor à cachaça artesanal produzida em Santa Catarina foram realizadas análises microbiológicas e bioquímicas durante o processo fermentativo de produção dessa bebida. Assim, três ciclos fermentativos, que utilizam caldo-de-cana ou melado como substratos, foram acompanhados em uma cachaçaria localizada na grande Florianópolis. A análise microbiológica revelou significativa presença de bactérias no caldo-de-cana, o mesmo não ocorrendo para o melado. Por outro lado, o caldo-de-cana apresentou maior homogeneidade na composição de açúcares, sendo a sacarose o principal substrato a ser fermentado pelas leveduras. A avaliação do consumo dos açúcares e da produção de etanol mostraram que o processo fermentativo é eficiente para ambos os substratos. Além disso, foram isoladas e identificadas 16 cepas de leveduras, sendo que não foi encontrada nenhuma correlação entre a capacidade de fermentar a sacarose e a atividade invertase presente nas células. A higienização da cana e dos equipamentos envolvidos na produção da cachaça poderiam evitar a presença de microrganismos indesejáveis. Ainda, análises dos açúcares que compõe os substratos e acompanhamento do consumo dos mesmos durante o processo fermentativo tornariam o produto menos sujeito a variações, melhorando sua qualidade e valor comercial.

Palavras-chave: Caldo-de-cana. *Saccharomyces*. Cachaça



## 2.1 INTRODUÇÃO

A cachaça é definida como uma bebida com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume, obtida pela destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentado (BRASIL, 2002). O passo inicial e de grande importância na produção dessa bebida consiste na escolha das variedades de cana. Na seleção da matéria-prima deve-se levar em conta a diversidade do solo, condições culturais e industriais da variedade. Para otimizar o processo de produção de cachaça, a cana deve estar perfeitamente madura e apresentar boas condições fitossanitárias. A safra de cana ocorre de maio a dezembro e cada variedade tem seu ponto de maturação em determinada época (AQUARONE et al., 1983; CETEC, 1994).

Escolhido o tipo de cana, procede-se com a trituração da mesma nas moendas, que deve possibilitar o máximo de extração do caldo-de-cana. O caldo obtido pela moagem é constituído de 78-86% de água, 11-18% de sacarose, 0,2-1,0% de açúcares redutores, 0,3-0,5% de cinzas e 0,5-1,0% de compostos nitrogenados. Esse líquido, depois de coado, constitui um mosto a ser fermentado pelas leveduras. A fermentação ideal ocorre com concentração de açúcares em torno de 14 a 16°Brix e pH entre 5,2 e 5,8 (AQUARONE et al., 1983; LIMA, 2001).

As leveduras são responsáveis pela fermentação dos açúcares do mosto, bem como pela produção de diversos outros compostos que contribuem para as qualidades organolépticas da cachaça (SCHWAN et al., 2001). Alguns alambiques iniciam o processo fermentativo com leveduras prensadas de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*), enquanto outros desenvolvem o fermento na própria cachaçaria (fermento caipira), de acordo com técnicas regionais. Nesse processo, leveduras selvagens, provenientes dos equipamentos de moagem e da dorna de fermentação, são multiplicadas usando caldo-de-cana como substrato por 5-10 dias, até atingirem concentração suficiente para iniciar um ciclo fermentativo (PATARO et al., 1998, 2000, 2002; SCHWAN et al., 2001). Diferente do que ocorre para a cerveja ou o vinho, não existem no mercado cepas de leveduras especialmente comercializadas para a produção da cachaça, sendo que a cada ciclo de produção são isoladas novas variedades, com características nem sempre adequadas (AQUARONE et al., 1983; SCHWAN et al., 2001).

O ciclo fermentativo para a produção de cachaça resulta no consumo dos açúcares totais presentes no caldo e ocorre num período que pode variar de 18 a 48 horas (PATARO et al., 2002). Os recipientes de fermentação podem ser abertos ou fechados e o material ideal para sua

construção é aquele que facilita a limpeza e não propicia acúmulo de contaminantes (AQUARONE et al., 1983). A sucessiva adição de açúcares na dorna caracteriza a produção de aguardente como um processo fermentativo em batelada alimentada. Esse sistema permite aumentar o rendimento e também o limite de tolerância das células ao etanol e ao choque osmótico provocado pelas altas concentrações de açúcar. Após a fermentação, as leveduras sedimentam (SOARES; VROMAN, 2003) e o mosto é retirado para ser destilado. As células depositadas no fundo da dorna são reaproveitadas em vários ciclos fermentativos (MAIA; RIBEIRO; SILVEIRA, 1995).

Durante o processo de fermentação, o caldo-de-cana é freqüentemente adicionado à dorna, desta forma, os microrganismos presentes estão em constante sucessão. *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura predominante, mas os gêneros *Kloeckera*, *Candida*, *Kluyveromyces* e *Pichia* são comumente isolados. Bactérias também podem estar presentes, principalmente em meios pouco ácidos ou em altas temperaturas (GUERRA et al., 2001; MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 1998, 2000; SCHWAN et al., 2001). As características do processo fermentativo para a produção de cachaça, tais como constante adição de altas concentrações de açúcar, alta temperatura e altas concentrações de etanol, podem ser responsáveis pela seleção de linhagens de leveduras (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 2000, 2002). O melhoramento da qualidade da cachaça passa, necessariamente, pela seleção de cepas apropriadas, como ocorre na produção de vinho (QUEROL et al., 1992). O uso de linhagens selecionadas favorece o início mais rápido do processo e os riscos de contaminação apresentados pela fermentação espontânea podem ser evitados, favorecendo menor competição por nutrientes essenciais, maior rendimento e qualidade do produto resultante (FLEET; LAFON-LAFOURCADE; RIBÉREAU-GAYONI, 1985; SANNI; LONNER, 1993).

Na fabricação de cachaça, o principal açúcar encontrado no mosto é a sacarose e o primeiro passo para sua utilização pela levedura *S. cerevisiae* é a hidrólise extracelular, através da enzima invertase. Desta forma, obtém-se glicose e frutose, que são transportadas para o interior da célula, degradadas pela via glicolítica até piruvato e transformadas em etanol e gás carbônico pelo processo de fermentação alcoólica (BARNETT, 1981; GANCEDO; SERRANO, 1989). Em geral, a frutose é metabolizada mais lentamente que a glicose, podendo ocasionar fermentações incompletas com conseqüentes perdas de produtividade (BERTHELIS et al., 2004). Vários estudos têm demonstrado, ainda, a presença de uma outra via metabólica de utilização da

sacarose que envolve o transporte ativo do açúcar para o interior da célula (BARFORD; MWESIGYE, 1996).

O mosto fermentado passa a se chamar vinho, que deve acusar 0°Brix se o processo tiver sido conduzido de forma correta. O vinho é composto principalmente de água (80-90%), álcool etílico (6-10%) e produtos secundários de fermentação alcoólica (1-3%) (AQUARONE et al., 1983). Finalmente, o vinho é destilado e origina-se a cachaça. Esse processo é fundamental na obtenção de bebida de boa qualidade, pois, além de separar, selecionar e concentrar os componentes pelo uso do calor, ainda são promovidas algumas reações químicas. Desta forma, os componentes do vinho podem aumentar, diminuir ou ainda originar novos compostos durante a destilação (BOZA; HORII, 1998).

O cobre é o material mais utilizado para a confecção de destiladores e ainda que possa levar à contaminação do destilado por íons cúprico (LIMA-NETO et al., 1994), esse metal é importante para a qualidade sensorial da cachaça (CARDOSO et al., 2003; NASCIMENTO, 1998). Além disso, estudos demonstraram que a ausência de cobre no destilador e/ou nas colunas conduz a um defeito organoléptico no produto, que apresentaria aroma típico de sulfetos. A presença do cobre tem sido, ao lado da falta de padrões de qualidade, um dos principais obstáculos para a exportação de cachaça, pois, a maioria dos países não permite importação de bebidas contaminadas por esse metal (DAHER; FREITAS, 1980; FARIA, 1989).

O envelhecimento é o responsável pelo “amaciamento” e “gosto redondo” da cachaça (AQUARONE et al., 1983). Nesse período ocorrem reações como oxidação e esterificação, que tornam o produto significativamente melhor do ponto de vista sensorial. Os principais compostos extraídos da madeira pelos destilados são: óleos voláteis, substâncias tânicas, açúcares e glicerol, ácidos orgânicos não-voláteis e esteróides, que modificam o sabor, o aroma e a coloração da bebida (CARDELLO; FARIA, 1998). No âmbito internacional, o carvalho é a madeira tradicionalmente empregada na confecção de barris. No Brasil, várias madeiras estão sendo testadas para o envelhecimento da cachaça, entretanto, ainda existem poucos estudos aplicados na caracterização dos compostos extraídos de cada tipo durante o envelhecimento (DIAS; MAIA; NELSON, 1998).

A cachaça produzida em Santa Catarina é pouco valorizada e praticamente não existem estudos acerca do processo de fabricação dessa bebida. Os produtores, de maneira geral, não se preocupam em controlar as variáveis do processo, como qualidade da matéria-prima,

temperatura, concentração inicial e consumo dos açúcares, pH e contaminações durante a etapa fermentativa. Deste modo, geram um produto não padronizado. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo analisar as características bioquímicas (consumo de açúcares e produção de etanol) e microbiológicas da fermentação para a produção artesanal da cachaça na região da grande Florianópolis. Além disso, pretendemos selecionar e isolar as cepas mais eficientes, de forma a otimizar o processo e evitar contaminações. O eficaz controle do processo de produção da cachaça poderá agregar valor ao produto catarinense, torná-lo padronizado, aumentando sua venda e incentivando os produtores.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Análises microbiológicas**

A cada etapa selecionada do processo fermentativo (início, meio e fim), amostras do mosto foram coletadas da dorna e imediatamente resfriadas a 4°C. A seguir, a amostra foi convenientemente diluída com água destilada estéril e plaqueada em meio WL (Difco) contendo 0,4% extrato de levedura, 0,5% triptona, 5% glicose, 0,055% fosfato de potássio monobásico, 0,0425% cloreto de potássio, 0,0125% cloreto de cálcio, 0,0125% sulfato de magnésio, 0,00025% cloreto férrico, 0,00025% sulfato de manganês, 0,0022% verde de bromocresol e 2% ágar, como descrito por Pallman e colaboradores (2001). As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 48 horas e as colônias formadas, identificadas e quantificadas, sendo o resultado expresso em UFC/mL. As características morfológicas dessas colônias foram então analisadas e o uso da microscopia óptica (STUDAR<sup>LAB</sup>) permitiu diferenciar bactérias de leveduras. As leveduras que apresentavam maior número de colônias foram isoladas, ainda em meio WL, para posterior identificação e testes fermentativos. Para identificar as cepas selecionadas foi utilizado o Kit Api 20C AUX (BioMérieux) e os procedimentos padrão e as chaves de identificação de acordo com Kurtzman e Fell (1998). As cepas isoladas foram mantidas a 4°C em meio YPD sólido contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar (todos Sigma, USA).

### **2.2.2 Análises bioquímicas**

Alíquotas das mesmas amostras coletadas para análise microbiológica foram centrifugadas (2600 g, 3 minutos) e o sobrenadante armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A sacarose foi dosada enzimaticamente, de acordo com a metodologia descrita por Holmes (1997), com 42 U/mL de invertase comercial (Sigma) em tampão fosfato de sódio (0,05 M ácido cítrico, 0,09 M fosfato de sódio dibásico) pH 4,5, sendo que a glicose gerada na reação foi quantificada enzimaticamente com glicose oxidase e peroxidase utilizando-se um kit enzimático comercial (Analisa Diagnóstica Ltda). Os açúcares redutores foram quantificados com ácido dinitrosalicílico como descrito por Miller (1959). A frutose foi estimada pela diferença entre a concentração de açúcares redutores totais e a glicose presente nas amostras. A concentração de etanol foi determinada enzimaticamente utilizando-se 0,25 U/mL de álcool oxidase (Sigma, USA) e 2 U/mL de peroxidase (Toyobo, Brasil) em tampão fosfato (0,07%  $\text{H}_2\text{PO}_4$  e 3,43%  $\text{HPO}_4$ ) pH 7,5 contendo 0,014% aminoantipirina e 0,056% fenol segundo a metodologia descrita por Salgado et al. (2000). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **2.2.3 Determinação da atividade invertase**

Nas cepas isoladas da cachaçaria, foi determinada a atividade invertase como descrito por Silveira, Carvajal e Bon (1996). Inicialmente, as células foram multiplicadas em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) em agitador horizontal a 160 rpm e  $28^{\circ}\text{C}$  até atingirem uma concentração de 0,7 mg de células (peso seco)/mL. A seguir, as células foram lavadas duas vezes com tampão 50 mM acetato de sódio pH 5,0 e suspensas no mesmo tampão contendo 50 mM NaF de forma a atingir uma concentração de 5 mg de células (peso seco)/mL. A suspensão foi mantida nesse tampão a  $30^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e a seguir incubadas por 5 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$  com 100 mM de sacarose. Após parar a reação enzimática a  $100^{\circ}\text{C}$  por 5 min, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para dosar a glicose formada. A atividade enzimática é expressa em  $\mu\text{moles}$  de glicose produzida por min e por mg de célula (peso seco).

#### **2.2.4 Testes fermentativos em batelada**

Para determinar a eficiência fermentativa (conversão de substrato em etanol) das cepas isoladas, as mesmas foram pré-crescidas em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose) em agitador horizontal a 28°C e 160 rpm por 48 horas. A seguir, concentrações de biomassa equivalentes foram inoculadas em meio rico YP (1% de extrato de levedura, 2% de peptona) contendo diferentes fontes de carbono numa concentração de 2% (glicose, sacarose, frutose, maltose, e galactose). Esses meios foram incubados por 20 horas nas mesmas condições que o pré-inóculo. As amostras foram então centrifugadas e o etanol determinado como no item 2.2.2.

#### **2.2.5 Cariotipagem**

A cariotipagem das linhagens de leveduras isoladas foi realizada através da técnica de eletroforese de pulso invertido (PFGE). As amostras de cromossomos foram preparadas como descrito por Gerring, Connely e Hieter (1991) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% em tampão TBE (45 mM Tris-base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA). O tempo total de corrida foi de 42 horas, com pulsos Norte/Sul e Leste/Oeste de 140 V durante 34 horas e meia, 20 V durante 30 minutos (Programa 1), 75 V durante 6 horas e meia e finalmente, 15 V durante 30 minutos (Programa 2). A eletroforese foi realizada em cuba hexagonal (GeneNavigator, Amersham Pharmacia Biotech) usando 2,5 L de tampão TBE. O gel foi então corado por 30 minutos em 200 mL de água contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e descorado em água por mais 30 minutos para ser em seguida fotografado sob lâmpada ultravioleta.

### **2.3 RESULTADOS**

Durante três ciclos produtivos, amostras do início, meio e fim dos processos fermentativos foram coletadas em uma cachaçaria situada na região da grande Florianópolis. Essa cachaçaria foi escolhida por representar a situação da maioria dos produtores da região no que diz respeito às condições higiênico-sanitárias, aos equipamentos disponíveis, à forma de conduzir o processo e ao conhecimento técnico.

O produtor utiliza como inóculo uma mistura de leveduras selvagens e fermento comercial seco. Essa mistura de leveduras é multiplicada até concentração suficiente para iniciar um ciclo fermentativo usando caldo-de-cana como meio de cultura. A mesma biomassa de células é utilizada ora para fermentar o caldo-de-cana, ora para fermentar o melado. As dornas utilizadas na cachaçaria são de madeira, com capacidade para armazenar cerca de 2000 litros. A fermentação inicia com 100-150 litros de fermento, sendo o restante do volume completado com caldo-de-cana ao longo do processo. Já no caso do melado, o mesmo é adicionado em duas ocasiões, diluído em água. O processo fermentativo dura 36-48 h, dependendo das condições do fermento (que é reutilizado) e da temperatura ambiente.

### **2.3.1 Análise bioquímica e microbiológica dos substratos**

Inicialmente, avaliamos o teor de açúcares nos dois substratos (caldo-de-cana e melado) utilizados no processo de fermentação para a produção de cachaça. As amostras de caldo-de-cana continham entre 162 a 197 g/L de açúcares totais, apresentando altos teores de sacarose (~90%) e baixas quantidades de glicose e frutose (Figura 2.1). Com relação ao melado, analisamos três amostras, duas utilizadas pelo produtor e uma amostra de origem comercial. Esses substratos continham de 48 a 59% de açúcares totais, sendo que duas das amostras analisadas (uma proveniente da cachaçaria e a comercial) continham cerca de 68% de sacarose, 17% de frutose e 15% de glicose (Figura 2.2). Entretanto, a outra amostra da cachaçaria continha apenas 7% de sacarose e o total de açúcares restante era de glicose e frutose (Figura 2.2). Considerando que o melado é o produto da concentração do caldo-de-cana, o teor de sacarose esperado para esse substrato é superior ao de açúcares redutores, o que não aconteceu numa das amostras. Como o melado utilizado na cachaçaria é obtido de fornecedores externos e não são realizadas análises que confirmariam sua composição, nossos resultados indicam que o produtor pode ter adquirido melação (sub-produto do refino do açúcar) no lugar do melado para a produção de cachaça.

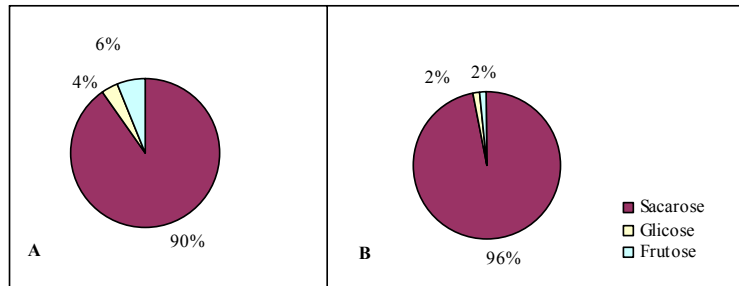


Figura 2.1. Composição de açúcares em duas amostras de caldo-de-cana (A e B) provenientes da cachaçaria em estudo.

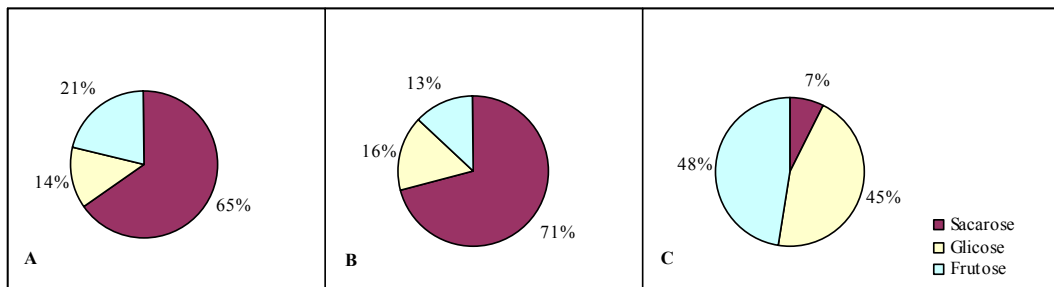


Figura 2.2. Composição de açúcares em três diferentes amostras de melado. A figura identificada com a letra A refere-se à amostra de melado comercial, enquanto as figuras B e C referem-se às amostras obtidas na cachaçaria.



A análise microbiológica mostrou que o caldo-de-cana utilizado na cachaçaria apresenta elevados níveis de contaminação, pois todas as amostras analisadas continham significativa concentração de bactérias, inclusive, numa delas, o número de colônias (UFC/mL) desses microrganismos foi superior ao número de leveduras (Figura 2.3). Além disso, encontramos nas amostras de caldo-de-cana uma grande variedade de morfotipos de leveduras (dados não mostrados). Tal resultado era esperado, levando-se em conta que após a colheita, nenhuma higienização foi realizada na cana. A moenda e as mangueiras que conduzem o caldo até a dorna também não foram limpas em nenhum momento durante o período de trabalho na cachaçaria. De acordo com nossas análises, ao contrário do que ocorre com o caldo-de-cana, nenhum microrganismo está presente no melado e contaminações poderiam ocorrer apenas em virtude da qualidade microbiológica da água utilizada para diluir esse substrato.

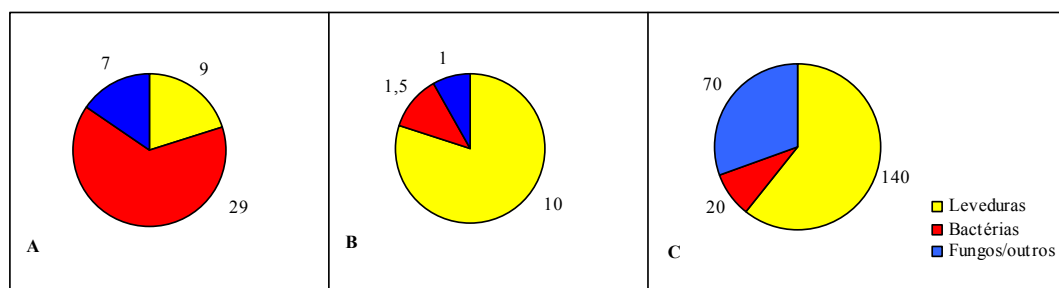


Figura 2.3. Análise microbiológica do caldo-de-cana utilizado em três diferentes ciclos fermentativos (A, B e C) para a produção de cachaça artesanal. Os valores expressos no gráfico referem-se a 10<sup>5</sup> UFC/mL.

### 2.3.2 Análise bioquímica e microbiológica dos processos fermentativos

No início da fermentação do caldo-de-cana (aproximadamente 1,5 hora após adição ao fermento), o número de bactérias reduziu significativamente quando comparado com o substrato em duas das fermentações acompanhadas e chegou a zero, na diluição utilizada, numa terceira (Figura 2.4). A competição por nutrientes e a produção de etanol pelas leveduras faz com que

estas predominem ao longo do processo fermentativo. Assim, somente leveduras foram isoladas no meio e no final da fermentação do caldo-de-cana. Observamos também que a concentração (UFC/mL) de leveduras aumenta no início e diminui no final do processo (Figura 2.5). Considerando que o caldo é constantemente adicionado ao fermentador, a redução no número de células pode estar ocorrendo pela conseqüente diluição das mesmas. Pode ainda estar havendo morte celular ou, provavelmente, já estaria ocorrendo floculação e sedimentação das células de levedura. Em nenhuma das etapas do processo que utiliza o melado encontramos bactérias, mas somente leveduras. Da mesma forma que para o caldo, percebemos a redução no número de leveduras (UFC/mL) do meio para o fim da fermentação (Figura 2.5).

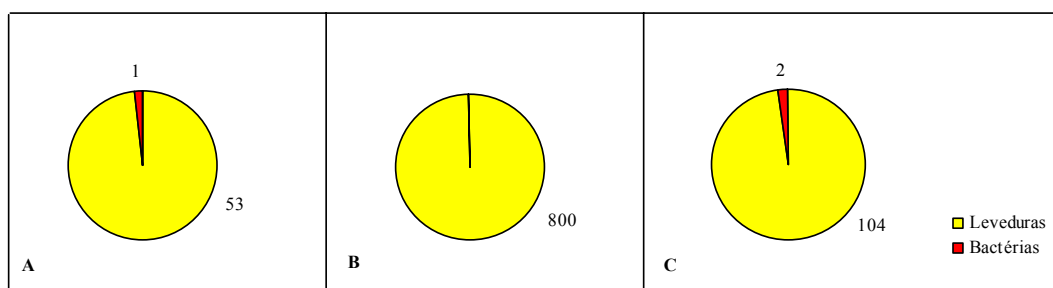


Figura 2.4. Análise microbiológica do início do processo fermentativo que utiliza caldo-de-cana para a produção de cachaça. Três diferentes ciclos de fermentação (Figuras A, B e C) foram acompanhados. O número de colônias indicado refere-se a  $10^7$  UFC/mL.

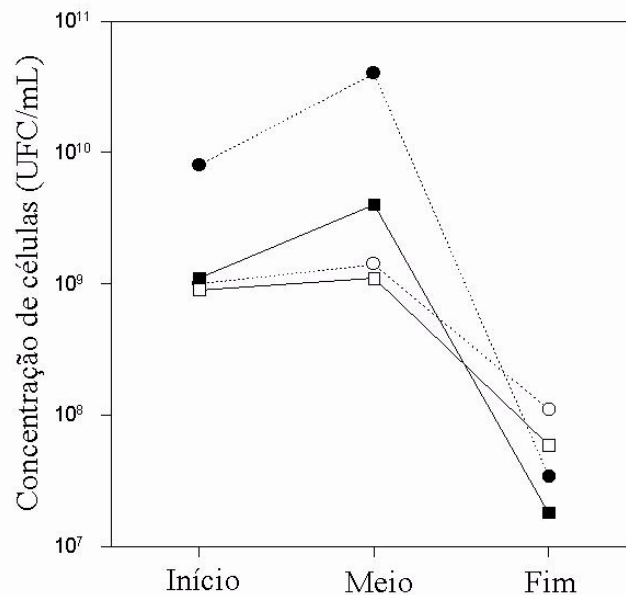


Figura 2.5. Concentração de leveduras (UFC/mL) ao longo dos processos fermentativos que utilizam caldo-de-cana (○, ●) ou melado (■, □) como substrato. As cores diferentes nos símbolos indicam ciclos fermentativos distintos.

Ainda, analisamos o consumo dos açúcares e a produção de etanol durante três diferentes ciclos de fermentação, em que foram utilizados o caldo-de-cana e o melado como substratos (Figuras 2.6, 2.7 e 2.8). A concentração de etanol formada (entre 8-11%) corresponde àquela normalmente obtida em processos de produção de cachaça. Observamos que no meio das fermentações, comparando com o início, há grande consumo de sacarose e produção dos monossacarídeos glicose e frutose, podendo esta última atingir concentração de 5% (Figura 2.7). No final dos processos fermentativos foi verificada a ausência de glicose no vinho, restando apenas traços de sacarose e frutose que não ultrapassavam a concentração de 1% (Figuras 2.6-2.8). Percebemos também uma grande variação no conteúdo de açúcares quando comparamos o início dos processos que utilizam caldo-de-cana e melado, o que já era esperado, uma vez que nenhuma padronização do teor de açúcares foi realizada no substrato antes de iniciar a fermentação.

Apesar de o caldo-de-cana ser continuamente adicionado à dorna e, por isso, uma amostra desse substrato não ser representativa do todo, avaliamos a eficiência do processo fermentativo. Nos três ciclos analisados, considerando a concentração de açúcares no caldo, podemos afirmar

que a produtividade em etanol foi alta e próxima (93 a 100%) à máxima teórica. Esse resultado indica que as leveduras utilizadas pelo produtor estavam bem adaptadas ao processo que utiliza caldo-de-cana como substrato. Como o melado é diluído de forma imprecisa para iniciar a fermentação, o mesmo cálculo não pode ser realizado para esse substrato.

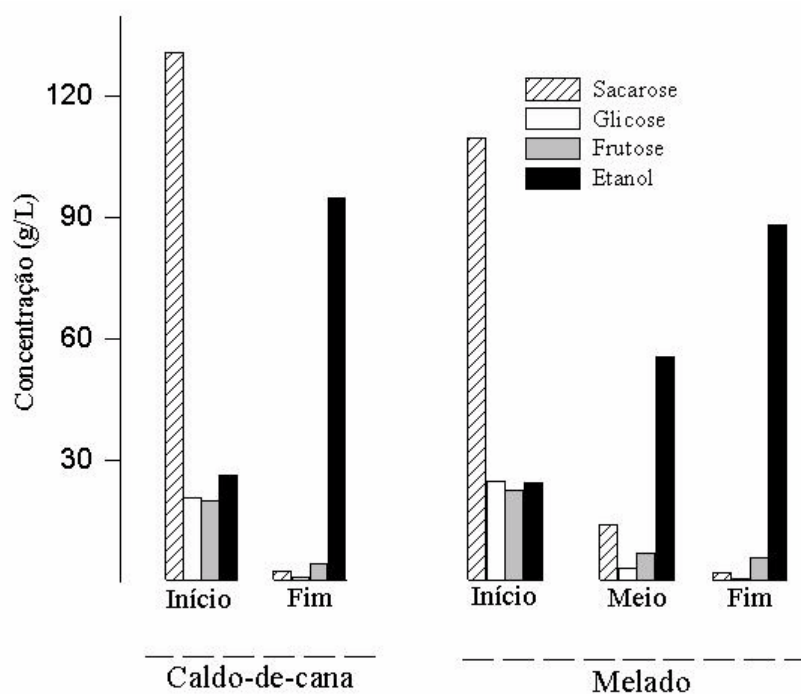


Figura 2.6. Evolução do processo fermentativo (início, meio e fim) no primeiro ciclo analisado. O consumo dos açúcares e a produção de etanol foram determinados para os processos que utilizam caldo-de-cana e melado como substratos.

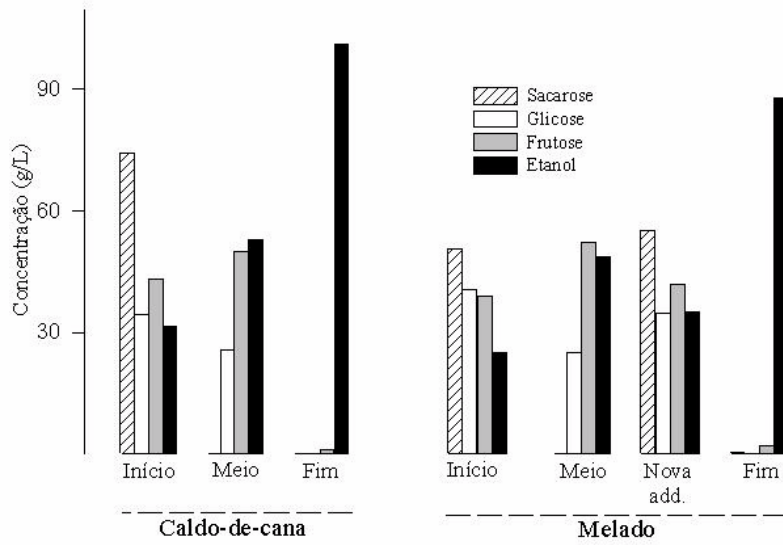


Figura 2.7. Evolução do processo (início, meio, fim e após nova adição de melado) no segundo ciclo de fermentação analisado. O consumo dos açúcares e a produção de etanol foram avaliados para os processos que utilizam caldo-de-cana e melado como substratos.

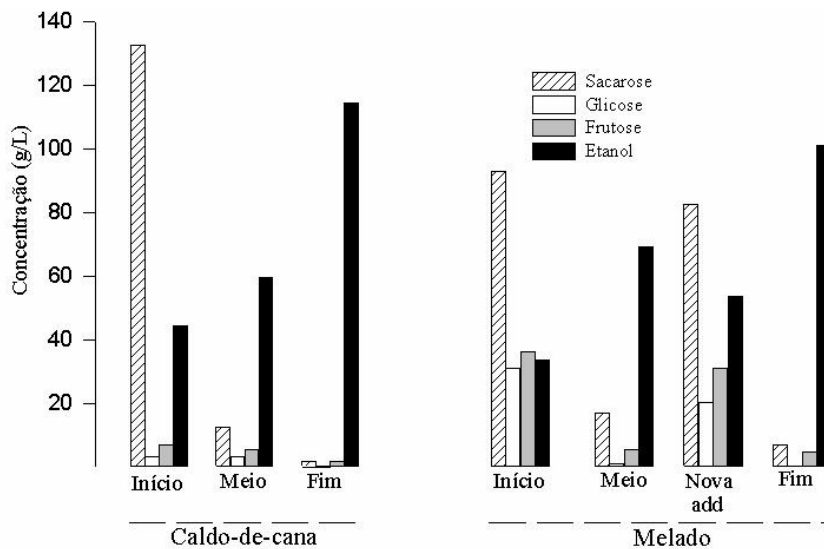


Figura 2.8. Evolução do processo fermentativo (início, meio, fim e após nova adição de melado) no terceiro ciclo analisado. O consumo dos açúcares e a produção de etanol foram determinados para os processos que utilizam caldo-de-cana e melado como substratos.

### 2.3.3 Identificação das cepas de levedura isoladas

O meio de cultivo WL tem sido descrito como ideal para isolar, identificar e acompanhar processos fermentativos industriais (PALLMANN et al., 2001). Nesse meio, as colônias adquirem diferentes colorações, formato e textura, o que permitiria quantificar a contribuição de cada uma no processo fermentativo. Portanto, utilizando esse meio, selecionamos e isolamos 16 diferentes cepas de levedura (identificadas por números aleatórios), predominantes durante a fermentação do caldo-de-cana e do melado. Na Tabela 2.1 estão descritas as morfologias das 16 linhagens em meio WL e a identificação pelo *Kit Api* e pelo método da *replica-plate*. A morfologia das cepas em meio WL varia dentro da mesma espécie, geralmente com respeito ao tamanho e à cor das colônias. A levedura encontrada em maior número, como esperávamos, foi *S. cerevisiae*, sendo que em menor quantidade isolamos os gêneros *Kloeckera* e *Candida*. Os dois métodos utilizados para identificação não divergem quanto aos resultados obtidos, exceto com relação à cepa 103, que o *Kit Api* estabelece como *C. colliculosa* e a *replica-plate* como *C. bombicola*. Apesar das semelhanças quanto aos resultados, o *Kit Api* apresenta difícil leitura, por isso, várias cepas não foram caracterizadas com esse método. Sob tal ponto de vista, o método da *replica-plate* é vantajoso, pois todas as linhagens puderam ser identificadas.

No intuito de melhor caracterizar os isolados, foram também realizadas análises do seu cariótipo através de eletroforese de campo pulsado (PFGE). Como mostra a Figura 2.9, duas das leveduras identificadas como *S. cerevisiae* (cepas 113 e 114), de fato, apresentaram o padrão típico de cromossomos desta espécie (GERRING, CONNELLY, HIETER, 1991), enquanto para a cepa 111 verificamos um número reduzido de cromossomos, de maior tamanho, condizente com os dados publicados para o cariótipo (8 cromossomos) da levedura *C. guilliermondii* (DOI et al., 1992).

Tabela 2.1. Cepas isoladas na cachaçaria durante três ciclos fermentativos. São mostradas as características morfológicas no meio WL e a identificação pelo *Kit Api 20C AUX* (BioMérieux) ou pelo método da *replica-plate*.

Cepas	Morfologia das colônias em meio WL			Identificação Kit Api	Identificação “réplica-plate”
	Cor	Tamanho	Aspecto		
01	verde-amarelada, centro levemente escuro	grande	redonda, borda regular	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
02	branca, levemente esverdeada	média	redonda, borda regular	n.i. <sup>a</sup>	<i>S. cerevisiae</i>
03	branca, levemente esverdeada	pequena	redonda, borda regular	n.i.	<i>S. cerevisiae</i>
06	amarelo-creme esverdeado, meio levemente esverdeado, fundo esverdeado	grande	brilhosa, redonda, bordas irregulares, cerebróide	n.i.	<i>S. cerevisiae</i>
101	verde escuro com centro mais claro, fundo esverdeado	grande	cremosa, redonda, achatada, borda regular	<i>Kloeckera sp.</i>	<i>Kloeckera sp.</i>
102	verde claro com centro escuro, fundo amarelo com verde circular	pequena	cremosa, redonda, formato botão, borda regular	n.i.	<i>Kloeckera sp.</i>
103	esverdeada, com centro escuro, fundo amarelo com verde circular	pequena	cremosa, redonda, formato botão, borda regular	<i>C. colliculosa</i>	<i>C. bombicola</i>
107	branco-amareladas, fundo verde-claro	grande	cremosa	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
108	esverdeadas, fundo mais escuro	pequena	cremosa, redonda	n.i.	<i>S. cerevisiae</i>
110	brancas, fundo branco	pequena	cremosa, redonda, formato botão, borda regular	<i>C. guillermondii</i>	<i>C. guillermondii</i>
111	verde-claro, borda escura	pequena	redonda, formato botão, borda regular	n.i.	<i>C. guillermondii</i>
113	brancas, borda azul-esverdeada escuro	grande	cremosa, redonda, borda regular	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
114	branco/verde-azulado, centro verde	grande	redonda, borda regular	n.i.	<i>S. cerevisiae</i>
201	branca, fundo branco	média	cremosa, redonda, borda regular, em torre	n.i.	<i>S. cerevisiae</i>
202	branca, fundo branco	média	borda irregular, aspecto de concha, em torre	n.i.	<i>S. cerevisiae</i>
204	esverdeada, fundo esverdeado	média	cremosa, redonda, borda regular, em torre	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>

<sup>a</sup>não foi possível a identificação.

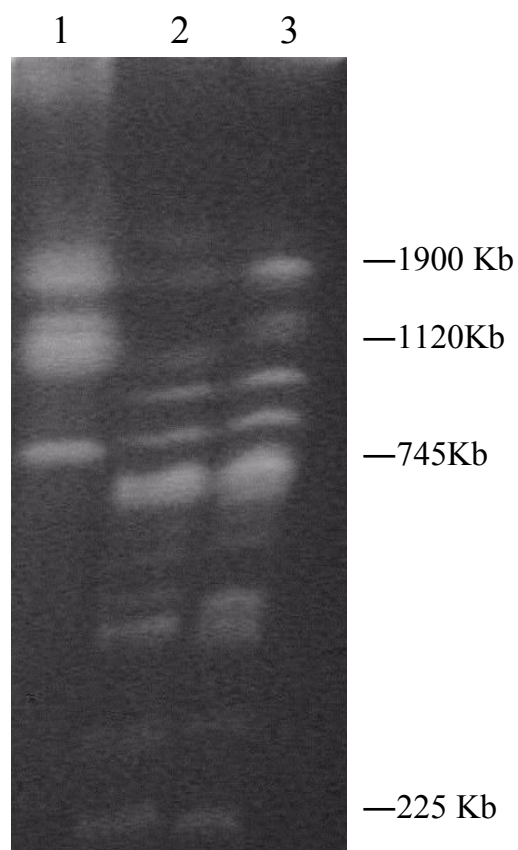


Figura 2.9. Cariotipagem de algumas leveduras isoladas. Os cromossomos das cepas 111 (canaleta 1), 113 (canaleta 2) e 114 (canaleta 3) foram separados por eletroforese de campo pulsado como descrito em Material e Métodos.

#### 2.3.4 Parâmetros fermentativos das linhagens para a produção de cachaça

Para melhor caracterizar as linhagens isoladas avaliamos a atividade invertase e a capacidade das mesmas para fermentar diferentes açúcares. Os valores para o primeiro critério variaram significativamente, desde leveduras que não apresentaram atividade invertase, como as cepas 101, 110 e 111 até outras com altos níveis desta enzima, cepas 01, 06 e 107 (Tabela 2.2). De qualquer forma, não encontramos relação entre os níveis de atividade invertase e a capacidade de fermentar sacarose. Mesmo as leveduras que aparentemente não possuem essa enzima (*C. guillermondii* e um dos isolados de *Kloeckera sp.*) produzem quantidades significativas de etanol a partir de sacarose. Nas condições testadas, as cepas 03, 06, 202 e 204 (todas *S. cerevisiae*) foram as maiores produtoras de etanol a partir de sacarose (Tabela 2.2). Essas linhagens também



apresentaram boa capacidade fermentativa em glicose e frutose, açúcares gerados na clivagem da sacarose. Finalmente, os isolados 01 e 204 produziram quantidades significativas de etanol a partir de maltose e galactose, outros dois açúcares importantes em processos fermentativos industriais.

Tabela 2.2. Atividade invertase e eficiência fermentativa das cepas isoladas na cachaçaria.

Cepa	Atividade invertase extracelular (nmol/mg min)	Produção de etanol <sup>a</sup> (g/L) a partir de:				
		glicose	sacarose	frutose	maltose	galactose
01	340,2	3,0	3,6	2,8	2,9	2,1
02	11,2	4,0	3,9	3,2	1,7	1,8
03	30,0	4,1	4,4	3,5	1,9	1,7
06	247,0	3,8	4,1	3,3	1,5	1,3
101	0,0	2,7	1,9	2,4	1,3	1,1
102	35,1	3,4	3,3	2,3	1,2	1,0
103	22,5	3,1	3,3	2,7	1,3	0,9
107	105,9	3,4	3,0	2,6	2,1	1,1
108	66,9	3,4	3,3	2,7	2,2	1,3
110	0,5	3,0	2,5	2,1	1,4	1,1
111	0,0	3,4	3,3	2,6	1,1	1,1
113	75,5	3,3	3,3	2,7	1,2	1,7
114	20,5	3,1	2,9	2,2	1,2	1,4
201	18,4	3,8	2,9	3,0	2,3	2,4
202	52,0	4,0	4,1	3,3	1,7	1,4
204	30,0	4,0	4,3	3,7	3,0	2,3

<sup>a</sup>determinado após 20 h de incubação.

## 2.4 DISCUSSÃO

Após análise de alguns parâmetros bioquímicos e microbiológicos do processo fermentativo para a produção de cachaça artesanal, podemos ressaltar alguns aspectos de extrema importância para obter fermentações mais regulares e mais fáceis de serem controladas. A análise bioquímica dos substratos confirmou que a sacarose constitui o principal açúcar presente no caldo-de-cana, enquanto as amostras do melado adquirido pelo produtor nem sempre contêm a composição esperada de açúcares, pois uma das amostras avaliadas apresentou maior concentração de monossacarídeos do que de sacarose. É importante lembrar que altas concentrações de frutose não são recomendáveis pela dificuldade que as leveduras normalmente têm de fermentar esse açúcar (BERTHELS et al., 2004).

Entretanto, do ponto de vista microbiológico, o caldo-de-cana é uma fonte constante de contaminações tanto por bactérias quanto por outras leveduras que não *S. cerevisiae*. A presença de bactérias pode prejudicar o andamento da fermentação e ocasionar a formação de compostos indesejáveis, que alteram o sabor da cachaça. Além disso, a competição por nutrientes pode favorecer a redução da concentração de leveduras ao longo dos processos. Medidas simples de higienização da cana antes da moagem, bem como a limpeza dos equipamentos a cada ciclo fermentativo podem reduzir significativamente o conteúdo de contaminantes no mosto, favorecendo o controle do processo. Outro fator que contribui para a falta de controle no processo é o fato de as dornas utilizadas pelo produtor serem construídas em madeira, material que dificulta a higienização. Além do mais, pelos anos de uso, apresentam rachaduras, que servem de depósito para bactérias. Schwan e colaboradores (2001) já haviam chamado a atenção para o problema da contaminação por bactérias em fermentadores construídos com esse material. Assim, apesar de o melado ser o substrato mais adequado do ponto de vista microbiológico, seu uso pode comprometer o processo pela falta de padronização na composição de açúcares. A prévia análise desse substrato poderia selecionar os fornecedores, evitando prejuízos ao produtor.

Durante este trabalho foram isoladas 16 cepas de levedura que representam os principais morfotipos encontrados nos processos fermentativos. *S. cerevisiae* foi a espécie predominante, isolada durante todo o processo fermentativo, com ambos os substratos estudados. Já os gêneros *Kloeckera* e *Candida* foram encontrados apenas no caldo-de-cana, o que indica que não prevalecem durante a fermentação. Outros trabalhos já haviam demonstrado o predomínio de *S.*

*cerevisiae* em ciclos fermentativos para a produção de cachaça (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 2000). Neste ponto, é importante salientar a dificuldade metodológica existente para identificar contaminações por microrganismos. A identificação das espécies através de kits, testes de crescimento ou assimilação de determinados nutrientes é um processo demorado e nada trivial. Mesmo técnicas mais modernas, como a cariotipagem (PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001), ainda requerem um tempo considerável para serem executadas. Até obter algum resultado, as dornas de fermentação já podem estar seriamente comprometidas pela contaminação. Técnicas mais rápidas, como PCR e análise de restrição de DNA mitocondial, poderão, no futuro, permitir um maior controle do processo fermentativo quando utilizados substratos não estéreis como o caldo-de-cana (GUERRA et al., 2001; PATARO et al., 2000; SOUZA-LIBERAL et al., 2005).

Os parâmetros que identificam a linhagem ideal para produção de cachaça ainda não estão bem definidos, talvez pela diversidade de lugares e formas com que a bebida é produzida nas diferentes regiões do país. Entretanto, alguns trabalhos têm analisado as características de várias cepas, levando em consideração, principalmente, os parâmetros cinéticos e a produção de compostos secundários (ANDRIETTA; MIGLIARI; ANDRIETTA, 1999; MUNIZ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003). Outros estudos têm avaliado a presença de leveduras floculantes em processos fermentativos. Apesar da floculação e da sedimentação das células auxiliarem na separação das leveduras, esta característica pode também levar a fermentações incompletas, devido ao menor contato das células com os açúcares do meio (LUDWIG; OLIVA-NETO; DE-ANGELIS, 2001; RIBEIRO; HORII, 1999; SILVA, 2003). É importante salientar que as características avaliadas neste trabalho para as cepas isoladas (eficiência fermentativa e atividade invertase) mostraram pouca correlação entre os níveis da enzima invertase presente nas diferentes linhagens e a capacidade de fermentar sacarose.

## REFERÊNCIAS

ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. *Soc. Technol. Alcool Beb.*, v.17, p.54-59, 1999.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. *Alimentos e bebidas produzidas por fermentação*. São Paulo: Edgard Blucher, 1983.

BARFORD, J.P.; MWESIGYE, P.K. Mechanism of sucrose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.42, p.297-306, 1996.

BARNETT, J.A. The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv. Carboh. Chem. Biochem.*, v.39, p.347-404, 1981.

BERTHELS, N.J., et al. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.*, v. 4, p.683-689, 2004.

BOZA, Y.; HORII, J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.18, p.391-396, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto n. 4072 de 3 de janeiro de 2002. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 3 de Jan. 2002, p.9134-9136.

CARDELO, H.M.A.B.; FARIA, J.B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus Alba L.*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.18, p.169-175, 1998.

CARDOSO, D. R., et al. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana: parte II. *Quím. Nova*, v.26, p.165-169, 2003.

CETEC (Centro Tecnológico de Minas Gerais). *Manual para produção artesanal de cachaça*. Belo Horizonte: CETEC, 1994.

DAHER, A.L.K.; FREITAS, R.J.S. Determinação de cobre em bebidas. *Arquiv. Biol. Tecnol.*, v. 23, p. 1-9, 1980.

DIAS, S.; MAIA, A.; NELSON, D. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.18, p.331-334, 1998.

DOI, M., et al. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel-electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* v.138, p.2243-2251, 1992.

FARIA, J.B. *A influência do cobre na qualidade das aguardentes de cana (Saccharum officinarum, L.)*. São Paulo, 1989. 88p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, (USP).

FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environment Microbiol.*, v.48, p.1034-1038, 1985.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. *The yeast*, v.3, p.205-259, 1989.

GUERRA, J.B., et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.33, p.106-111, 2001.

GUERRING, S.L.; CONNELLY, C.; HIETER, P. *Methods in enzymology*, v.194, p.61-62, 1991.

HOLMES, E.W. Coupled enzymatic assay for the determination of sucrose. *Anal. Biochem.*, v.244, p.103-109, 1997.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The yeast: A taxonomic study*. Amsterdã: Elsevier Science Publisher, 1998.

LIMA, U.A. *Biotechnologia: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher, v.4, p.145-207, 2001.

LIMA-NETO, B. S., et al. O cobre em aguardentes brasileiras: sua quantificação e controle. *Quím. Nova.* v.17, p.220. 1994.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; DE-ANGELIS, D.F. Quantificação da flocculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes de fermentação alcoólica. *Ciên. Tecnol. Aliment.*, v.21, p.63-68, 2001

MAIA, A.B.R.A.; RIBEIRO, J.C.G.M.; SILVEIRA, L.C. *I Curso associação mineira de produtores de cachaça de qualidade-Produção artesanal de cachaça de qualidade*. Belo Horizonte. AMPAQ, 1995. 104p.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v.31, p.426-428, 1959.

MORAIS, P.B., et al. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.13, p.241-243, 1997.

MUNIZ, J.B., et al. Potencialidades de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de aguardente artesanal. In: Simpósio nacional de fermentações, 2003. CD-ROOM.

NASCIMENTO, R. F., et al. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. *Quím. Nova*, v.21, p.735-739, 1998.

OLIVEIRA, E.S., et al. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, v.19, p.241-243, 2003.

PALLMAN, C.L., et al. Use of WL medium to profile native flora fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, v.52, p.198-203, 2001.

PATARO, C., et al. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. *Rev. Microbiol.*, v.29, p.104-108, 1998.

PATARO, C., et al. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p.1-9, 2000.

PATARO, C., et al. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the artisanal Brazilian cachaça. *Braz. J. Microbiol.*, v.33, p.202-208, 2002.

QUEROL, A., et al. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts strains. *Appl. Environment Microbiol.*, v.58, p.2948-2953, 1992.

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo-de-cana. *Sci. Agric.*, v.56, p.255-263, 1999.

SALGADO, A.M., et al. Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. *Biotechnol. Letters.*, v.22, p.327-330, 2000.

SANNI, A.I.; LONNER, C. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiol.*, v.10, p.517-523, 1993.

SCHWAN, R.F., et al. Microbiology and physiology of cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.79, p.89-96, 2001.

SILVA, C.L.C. *Seleção de linhagens de Saccharomyces cerevisiae flocculantes e linhagens não produtoras de H<sub>2</sub>S e sua influência na qualidade da cachaça*. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BON, E.P.S. Assay for *in vivo* yeast invertase activity using NaF. *Anal. Biochem.*, v.238, p.26-28, 1996.

SOARES, E.V.; VROMAN, A. Effect of different starvation conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 325-330, 2003.

SOUZA LIBERAL, A.T., et al. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.40, p.19-23, 2005.

### 3 Transporte ativo e fermentação de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*

— Artigo publicado na revista internacional indexada *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, p.119-127, 2004 (Apêndice A).

#### RESUMO

A sacarose é a principal fonte de carbono utilizada por *Saccharomyces cerevisiae* durante a produção de álcool combustível, fermento de panificação e diversas bebidas destiladas. O objetivo deste trabalho foi analisar a contribuição para a fermentação de sacarose de uma via pouco caracterizada de utilização desse açúcar por células de *S. cerevisiae*, o seu transporte ativo através da membrana plasmática e posterior hidrólise intracelular. A utilização de uma cepa de levedura sem a enzima invertase mostrou que aquela é capaz de fermentar sacarose eficientemente graças ao transporte direto do açúcar para o interior da célula, sem ocorrer produção de glicose e frutose no meio durante o processo fermentativo. Adicionalmente, uma cepa de levedura sem os principais transportadores de hexoses (*hxt1-hxt7* e *gal2*) e, portanto, incapaz de crescer ou fermentar glicose e frutose, também fermenta sacarose eficientemente. A caracterização molecular do transporte ativo e fermentação de sacarose por células de *S. cerevisiae* abre novas oportunidades para otimizar leveduras para processos industriais que utilizam cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cotransporte Sacarose-H<sup>+</sup>. Invertase. *Saccharomyces cerevisiae*.



### 3.1 INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada em grande escala para a produção industrial de etanol a partir de vários produtos agrícolas ricos em açúcar. Esse bioetanol é amplamente reconhecido por ser um substituto ou um aditivo apropriado para a gasolina e por não agredir o meio ambiente. Mais de 70% da produção mundial de etanol é utilizada como combustível, uma porcentagem que vem aumentando a cada ano. O Brasil é o maior produtor e consumidor de álcool combustível e a partir de 1999 tornou-se também o maior exportador desse produto (BERG; 2004; LAVE; GRIFFIN; MACLEAN, 2001; LUGAR; WOOLSEY, 1999; WYMAN, 1999). A sacarose é, provavelmente, o açúcar mais importante na utilização industrial da levedura *S. cerevisiae*. Mais de metade da produção mundial de etanol depende da eficiente fermentação de meios ricos em sacarose, como caldo-de-cana e melaços. Essas matérias-primas também são utilizadas para a produção de leveduras de panificação e para a produção de diversas bebidas alcoólicas destiladas (SCHWAN et al., 2001; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000). Apesar de a seleção do homem ter favorecido linhagens e genótipos com características desejadas, melhorias ainda são necessárias para aumentar a produtividade e diminuir custos nas aplicações industriais dessa levedura. Por exemplo, a habilidade de células de *S. cerevisiae* em fermentar altas concentrações de sacarose, como as encontradas nas massas de pão doce ou em mostos *very-high-gravity* (VHG), é menor do que a verificada em outros processos fermentativos (BAJAJ; TAANK; THAKUR, 2003; EVANS, 1990; JONES; THOMAS; INGLEDEW, 1994).

É geralmente aceito que as células de *S. cerevisiae* possuem uma invertase extracelular ( $\beta$ -D-frutose 1,6-bisfosfatase, EC 3.2.1.2.6) que hidrolisa sacarose em glicose e frutose, açúcares que são captados para o interior da célula por transportadores de hexoses e metabolizados através da glicólise (Figura 3.1). Essa enzima, codificada por um ou mais genes *SUC* (*SUC1* a *SUC5* e *SUC7*) (NAUMOV et al., 1996), tem sido um paradigma para o estudo da síntese protéica e regulação da expressão gênica. Esses genes geram dois RNAs mensageiros diferentes: um transcrito maior, que codifica para uma invertase com uma seqüência sinalizadora requerida para a secreção fora da célula e um transcrito menor, sem a seqüência sinalizadora, codificando para uma forma intracelular da enzima (CARLSON; BOTSTEIN, 1982). Enquanto o primeiro RNA mensageiro é reprimido por altas concentrações de sacarose ou por seus produtos de hidrólise (glicose e frutose), a invertase intracelular é expressa constitutivamente. Foi também estabelecido que a eficiente expressão de invertase requer baixos níveis de glicose e frutose no meio

(DYNESEN et al., 1998; HAQ, SHAFIQ, ALI, 2003; HERWING et al., 2001; OZCAN et al., 1997).

Embora seja esperado que uma alta atividade invertase garanta a eficiente fermentação da sacarose, vários trabalhos têm demonstrado uma correlação inversa entre os níveis dessa enzima e a *performance* fermentativa das células (ECHEGARAY et al., 2000; EVANS, 1990; MYERS; LAWLOR; ATTFIELD, 1997; ODA; OUCHI, 1990; TAKESHIGE; OUCHI, 1995). De fato, foi demonstrado em 2004 por Greig e Travisano, que a eficiência de leveduras que não possuem genes *SUC* em meios contendo sacarose pode ser superior àquela de leveduras que produzem essa enzima, especialmente em altas densidades celulares, comumente encontradas em processos fermentativos. Além disso, a correlação inversa entre a atividade invertase e a capacidade fermentativa das células é aumentada em meios ou massas que contenham altas concentrações de sacarose. Isto parece ser uma consequência do repentino choque osmótico sofrido pelas células quando altas concentrações de sacarose são rapidamente convertidas em concentrações ainda mais altas de glicose e frutose (MYERS; LAWLOR; ATTFIELD, 1997; TAKESHIGE; OUCHI, 1995).

A análise da expressão gênica em condições de alta concentração de glicose e frutose tem revelado diversas adaptações metabólicas, incluindo um aumento na reciclagem fútil da trealose, do glicerol e do glicogênio, além de uma aumentada produção de ácidos acético e succínico (ERASMUS; VAN DER MERWE; VAN VUUREN, 2003). Sob essa condição de estresse, menos etanol é produzido.

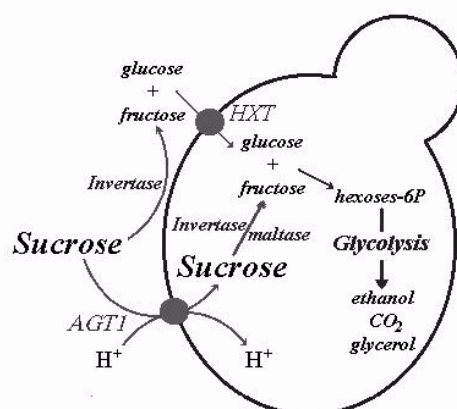


Figura 3.1. Modelo atual do metabolismo da sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. A sacarose pode sofrer hidrólise pela invertase periplasmática ou pode ser transportada ativamente pela permease *AGTI* e então, ser clivada pela maltase ou invertase intracelular.

No presente trabalho analisamos uma via pouco caracterizada de utilização de sacarose por *S. cerevisiae*. Diversos trabalhos têm mostrado que as velocidades de fermentação e o crescimento dessa levedura em sacarose só se encaixam num modelo composto pela contribuição tanto da captação direta da sacarose como pela captação dos seus produtos de hidrólise para o interior da célula (BARFORD; PHILLIPS; ORLOWSKI, 1992; MWESIGYE; BARFORD, 1996; ORLOWSKI; BARFORD, 1991). A análise da captação direta de sacarose por *S. cerevisiae* revelou a presença de um cotransporte sacarose- $H^+$  (MWESIGYE; BARFORD, 1994, 1996; SANTOS et al., 1982), que de acordo com Stambuk e colaboradores (1999) é mediado pela permease *AGTI*. Essa permease é um cotransportador geral de  $\alpha$ -glicosídeos- $H^+$ , capaz de transportar sacarose e trealose com alta afinidade, enquanto maltose, maltotriose e  $\alpha$ -metilglicosídeo são captados com baixa afinidade (STAMBUK; DE ARAÚJO, 2001; STAMBUK; BATISTA; DE ARAÚJO, 2000). O transporte ativo de sacarose justificaria a existência da invertase intracelular constitutiva, embora a sacarose possa também ser hidrolisada por outras glicosidases intracelulares, como a  $\alpha$ -glicosidase (maltase), que tem a mesma afinidade e atividade com sacarose e maltose (KAHN; ZIMMERMANN; EATON, 1973; TABATA et al., 1984).

Embora as células que expressam este transporte ativo apresentem em sacarose velocidades específicas de crescimento maiores (MWESIGYE; BARFORD, 1996; ORLOWSKI;

BARFORD, 1991; STAMBUK; BATISTA; DE ARAÚJO, 2000), é necessário determinar a contribuição da permease *AGT1* para a fermentação desse açúcar, já que nem todos os açúcares transportados pela permease, como maltotriose e trealose, são eficientemente fermentados pelas células de levedura (MALLUTA; DECKER; STAMBUK, 2000; STAMBUK et al., 1999; ZASTROW et al., 2000, 2001). No intuito de determinar a contribuição do transporte ativo para a fermentação de sacarose, analisamos a fermentação desse açúcar por cepas de levedura sem invertase e por cepas sem os principais transportadores de hexoses (*hxt1* a *hxt7*, e *gal2*) e, portanto, incapazes de fermentar ou crescer em glicose e frutose.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Cepas de leveduras, meios e condições de crescimento**

O genótipo das cepas de *S. cerevisiae* usadas neste estudo estão descritas na Tabela 3.1. As células foram crescidas em meio rico YP contendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de sacarose (todos SIGMA, USA). O meio teve seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico e foi, posteriormente, autoclavado a 120°C por 20 minutos. Como a cepa KY73 não cresce em sacarose, glicose ou frutose (Tabela 3.2), essa cepa e sua parental selvagem (MC966A) foram crescidas em meio YP contendo 20 g/L de maltose (SIGMA, USA). As células foram cultivadas aerobicamente em erlenmeyers (100 ml de cultura em frascos de 500 mL) a 28°C em agitador a 160 rpm. A densidade óptica da cultura foi medida a 570 nm e usada para determinar a taxa de crescimento ( $\mu$ ). A concentração de células é expressa como peso seco, determinado com células filtradas, lavadas com água destilada e secas a 80°C por 48 horas. As células foram centrifugadas (2500 g, 3 min) na fase exponencial de crescimento e lavadas duas vezes com água destilada a 4°C antes de serem utilizadas.

Tabela 3.1. Cepas de *S. cerevisiae* usadas neste estudo.

Cepa	Genótipo relevante ou descrição	Fonte ou referência
1412-4D	<i>MATa AGT1 SUC3 MAL3 MGL3 MGL2 MEL1 ade2</i>	Yeast Genetic Stock Center (ATTC #208022)
1403-7A	<i>MATa AGT1 suc<sup>-</sup> MAL4<sup>c</sup> MGL3 gal3 gal4 trp1 ura3</i> Linhagem incapaz de produzir invertase extracelular	Yeast Genetic Stock Center (ATTC #208023)
MC966	<i>MATa AGT1 SUC2 MAL2 GAL MEL ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112</i>	Reifenberger <i>et al.</i> (1997)
KY73	<i>hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt3Δ::LEU2::hxt6 hxt2Δ::HIS3 gal2Δ hxt5::LEU2 hxt7::HIS3</i> derivada da MC966A Linhagem sem os principais transportadores de hexoses	Kruckeberg <i>et al.</i> , (1999)

### 3.2.2 Ensaios de fermentação

As células pré-crescidas por 12-16 horas em meio rico YP foram incubadas a 28°C em meio sintético (4 g/L de base nitrogenada para leveduras sem aminoácidos - Difco - e 10 g/L de sulfato de amônia) contendo 20 g/L sacarose e 10 g/L de células de levedura. Amostras das culturas foram centrifugadas (3400 g, 1 min) em intervalos regulares e os sobrenadantes usados para determinação de sacarose, glicose, frutose e etanol como descrito no item 3.2.5.

### 3.2.3 Ensaios de transporte

As células crescidas como descrito acima, para os ensaios de fermentação, foram centrifugadas durante a fase exponencial de crescimento, lavadas duas vezes com água destilada e suspensas a uma densidade celular de 15 g/L com água destilada a 4°C. O cotransporte de prótons durante a captação de sacarose (concentração final 5 mM) foi determinado através do registro da mudança de pH na suspensão de leveduras como descrito previamente (STAMBUK *et al.*, 1998; STAMBUK; DE ARAUJO, 2001; STAMBUK; BATISTA; DE ARAÚJO, 2000) usando um pHmetro PHM84 acoplado a um registrador TT1 Servograph (Radiometer, Copenhagen). A taxa de transporte foi expressa como μmol de sacarose transportada a 28°C/[g de

células de levedura seca por min]. Todas as análises foram realizadas em triplicata com erro padrão menor que 15%.

### **3.2.4 Ensaio enzimáticos**

A hidrólise da sacarose pela invertase periplasmática foi determinada *in vivo*, com células inteiras, previamente incubadas em 50 mM de fluoreto de sódio (SILVEIRA; CARVAJAL; BON, 1996), usando 0,1 M sacarose em tampão 50 mM acetato de sódio pH 5,0 (tampão A). Para a determinação da invertase intracelular, o extrato de células foi obtido a partir de uma suspensão a 15 g/L em tampão B (0,1 M MOPS-NaOH, pH 6,8) gelado, contendo 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila, 20 % (v/v) glicerol e 1 mM EDTA. As células foram rompidas por agitação vigorosa em *vortex* na presença de 1,5 g/mL de bolinhas de vidro (0,5 mm de diâmetro) por cinco períodos de 1 minuto à temperatura ambiente, seguidos por intervalos de 1 minuto, quando os tubos foram mantidos em gelo. Os extratos foram centrifugados (10.000 g, 5 min) e o sobrenadante utilizado para a determinação da hidrólise de sacarose pela invertase usando 0,1 M de sacarose em tampão A, ou hidrólise pela maltase usando 0,1 M de sacarose em tampão B (KAHN; ZIMMERMANN; EATON, 1973, TABATA et al., 1984). O conteúdo de proteína no extrato celular foi determinado como descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão. Foram utilizados controles com células ou extratos previamente fervidos e todos os ensaios foram executados em triplicata com erros menores que 10 %. A atividade enzimática é expressa como mU/g de célula seca ou proteína, onde uma unidade corresponde a 1  $\mu$ mol de glicose produzida/min a 28°C.

### **3.2.5 Determinação de sacarose, glicose, frutose e etanol**

A sacarose foi quantificada enzimaticamente, de acordo com Holmes (1997), usando 42 U/mL de invertase (Sigma, USA) em tampão fosfato cítrico (0,05 M ácido cítrico, 0,09 M fosfato de sódio dibásico) pH 4,5, seguido da quantificação da glicose formada. A glicose foi determinada através do método glicose oxidase e peroxidase usando um kit comercial (Analisa Diagnóstica Ltda., Brasil). A concentração de açúcares redutores foi determinada utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS) como descrito por Miller (1959) e a de frutose foi calculada a partir da

diferença entre a quantidade de açúcares redutores e a de glicose presente na mesma amostra. O etanol foi determinado utilizando álcool oxidase (Sigma, USA) e peroxidase (Toyobo, Brasil) como descrito por Rodionov, Keppen e Sukhacheva em 2002.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Fermentação de sacarose por cepas *SUC2* ou *SUC3*

A Figura 3.2 mostra a capacidade fermentativa de duas cepas diferentes. Ambas apresentam atividade invertase (Tabela 3.2), seja codificada pelo gene *SUC2* (cepa MC966A) ou pelo gene *SUC3* (cepa 1412-4D). Nos dois casos, a hidrólise da sacarose leva ao acúmulo de glicose e frutose no meio, açúcares que foram posteriormente fermentados pelas células. Ainda que a frutose seja utilizada ao mesmo tempo em que a glicose, esta última é consumida primeiramente, o que pode levar à sobra de frutose no final da fermentação e conseqüentes prejuízos na *performance* fermentativa (BERTHELIS et al., 2004; CASON; REID; GATNER, 1987; D'AMORE; RUSSEL; STEWART, 1989).

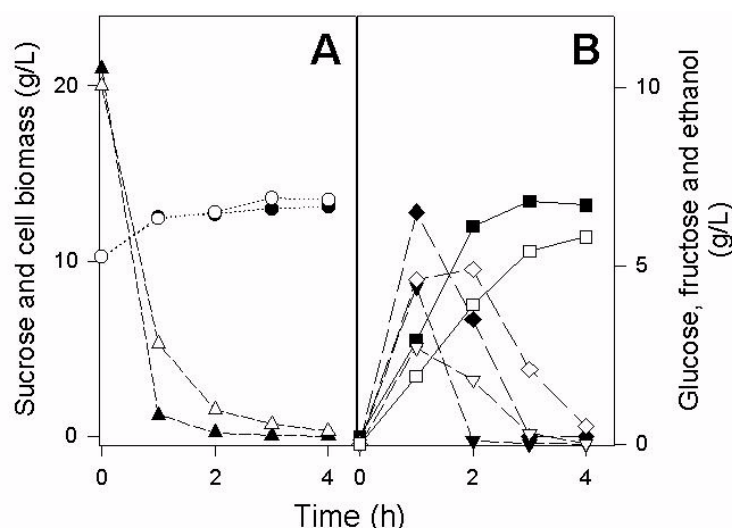


Figura 3.2. Fermentação aeróbica em batelada de sacarose por cepas de *S. cerevisiae* com o gene *SUC2* (cepa MC966A, símbolos abertos) ou *SUC3* (cepa 1412-4D, símbolos fechados) a 28°C e 160 rpm. No gráfico A, a concentração de sacarose (triângulos) e a biomassa de células de leveduras (círculos) são mostradas. No gráfico B, estão representadas a concentração de glicose (triângulos invertidos), frutose (diamantes) e etanol (quadrados) durante o processo fermentativo.

Tabela 3.2. Velocidade específica de crescimento e produção de etanol em sacarose, transporte ativo e hidrólise de sacarose pelas diferentes cepas de levedura.

Cepa:	$\mu_{\text{suc}}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{E/s}$ (g etanol/g açúcar consumido)	Cotransporte Sacarose-H <sup>+</sup> ( $\mu\text{mol}/[\text{g min}]$ )	Hidrólise da sacarose (mU/[g min]) por		
				Células inteiras	Extrato celular	
					pH 5,0	pH 6,8
1412-4D	0,24	0,33	– <sup>a</sup>	35	ND <sup>b</sup>	ND
MC966A	0,24	0,32	52	38	765	1.580
KY73	NC <sup>c</sup>	0,36	50	327	1.415	1.350
1403-7A	0,24	0,33	24	–	<50	1.620

<sup>a</sup>não detectado, <sup>b</sup>não determinado, <sup>c</sup>nenhum crescimento.

### 3.3.2 Fermentação de sacarose por uma cepa *suc*<sup>-</sup> sem invertase

A cepa 1403-7A tem sido descrita como uma levedura sem atividade invertase (KHAN; ZIMMERMANN; EATON, 1973; ODA; OUCHI, 1991) e nossos resultados confirmaram que células inteiras dessa cepa foram incapazes de hidrolisar sacarose (Tabela 3.2), indicando que a linhagem, de fato, não possui atividade invertase periplasmática. Entretanto, essa cepa foi capaz de crescer em meio YP contendo sacarose com a mesma velocidade específica de crescimento que as cepas 1412-4D e MC966A (Tabela 3.2). Como mostra a Figura 3.3, a sacarose também foi eficientemente fermentada pela cepa 1403-7A, com nenhuma glicose ou frutose sendo produzida durante o consumo desse açúcar.

Ainda que a cepa 1403-7A não possua atividade invertase intracelular, apresenta significativa cotransporte sacarose-H<sup>+</sup>, bem como, hidrólise de sacarose pela maltase intracelular (Tabela 3.2), atividades que certamente permitem crescimento e fermentação desse dissacarídeo sem que ocorra sua hidrólise extracelular.

### 3.3.3 Fermentação de sacarose por uma cepa sem transportadores de hexoses

O transporte de glicose e frutose em leveduras é mediado por uma grande família de genes transportadores de hexoses, que codificam permeases que diferem em relação a suas propriedades cinéticas e de regulação (OZCAN; JOHNSTON, 1999). Entretanto, evidências experimentais têm implicado oito membros da família *HXT* (*HXT1-HXT7* e *GAL2*) no transporte



metabolicamente significativo de hexoses (KRUCKEBERG et al., 1999; MAIER et al., 2002; REIFENBERGER; BOLES; CIRIACY, 1997). Uma cepa que não possui os genes desses transportadores de hexoses (KY73, Tabela 3.1) não pode crescer em sacarose (Tabela 3.2) nem em glicose ou frutose (dados não mostrados). Essa cepa foi então pré-crescida em maltose e sua capacidade de fermentar sacarose analisada (Figura 3.4). Nossos resultados mostram que, apesar do consumo da glicose e da frutose estar severamente comprometido na cepa KY73, observamos eficiente fermentação da sacarose por essas células. Devido à alta atividade invertase nessa cepa (Tabela 3.2, vide também REIFENBERGER; BOLES; CIRIACY, 1997), alguma sacarose foi também hidrolisada e a glicose e a frutose produzidas permaneceram inutilizadas pela levedura (Figura 3.4). Essas células possuem significativa atividade de cotransporte sacarose- $H^+$ , bem como, hidrólise de sacarose pela invertase e maltase intracelulares (Tabela 3.2), o que permitiu a eficiente fermentação desse açúcar.

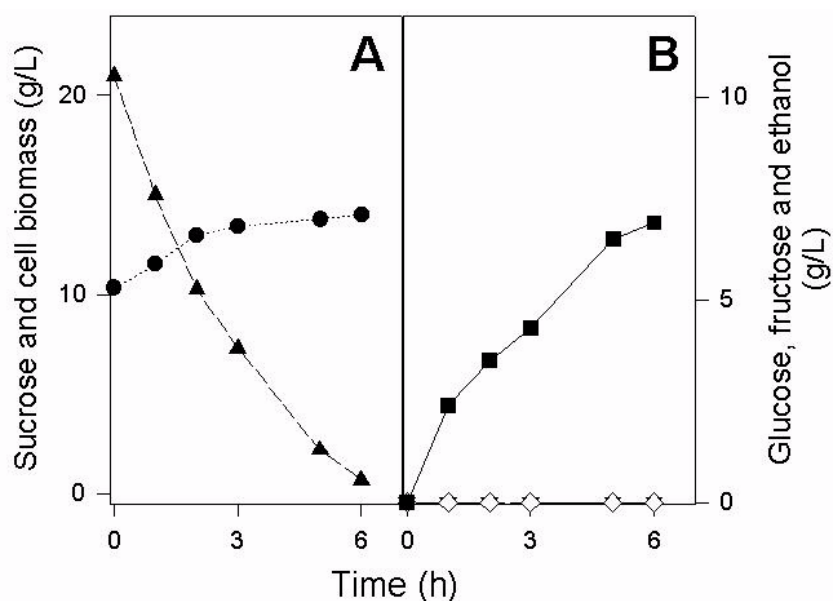


Figura 3.3. Fermentação aeróbica em batelada de sacarose pela cepa 1403-7A a 28°C e 160 rpm. No gráfico A são mostrados a concentração de sacarose (triângulos) e a biomassa celular (círculos), enquanto no gráfico B estão representadas a concentração de glicose (triângulos invertidos), frutose (diamantes) e etanol (quadrados) durante o processo fermentativo.

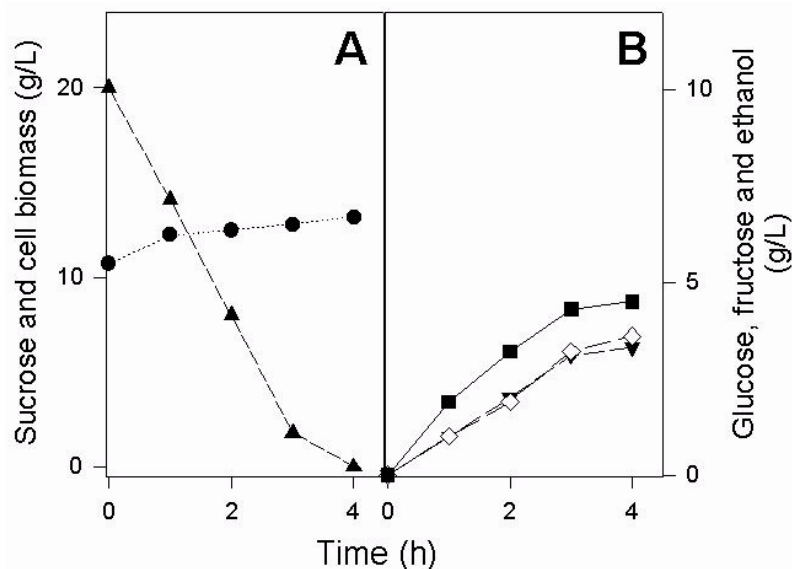


Figura 3.4. Fermentação aeróbica em batelada de sacarose pela cepa KY73 a 28°C e 160 rpm. No gráfico A são mostrados a concentração de sacarose (triângulos) e a biomassa de células de leveduras (círculos), enquanto no gráfico B estão representadas as concentrações de glicose (triângulos invertidos), frutose (diamantes) e etanol (quadrados) durante o processo fermentativo.

### 3.4 DISCUSSÃO

Embora  $\beta$ -frutosidases extracelulares estejam amplamente presentes em leveduras (BARNETT, 1981), diversas espécies podem metabolizar sacarose intracelularmente por meio de um transportador de sacarose presente na membrana plasmática, que permite o transporte direto do açúcar para o interior da célula. Algumas leveduras, como *Schizosaccharomyces pombe*, podem ainda metabolizar sacarose por ambas as vias: hidrólise extracelular e transporte ativo do açúcar para o interior da célula onde é clivada por uma enzima intracelular (REINDERS; WARD, 2001). Em todos os casos conhecidos, os metabolismos da sacarose e da maltose estão intimamente ligados, compartilhando os mesmos sistemas de transporte, enzimas hidrolíticas e/ou mecanismos regulatórios.

Através da utilização de uma cepa sem invertase e de outra incapaz de fermentar glicose e frutose, devido à ausência dos principais transportadores de hexoses, foi demonstrado que a sacarose pode ser fermentada de forma eficiente por células de *S. cerevisiae* através da captação

direta do açúcar a partir do meio, transporte provavelmente mediado pela permease *AGT1*, seguido da sua hidrólise intracelular. Devido ao requerimento energético para a captação direta do dissacarídeo, que pode consumir mais de 25% da energia produzida pela fermentação, maiores velocidades específicas de fermentação e/ou rendimento, comparados com a fermentação da glicose, têm sido reportadas para a fermentação da maltose por células de *S. cerevisiae* (WEUSTHUIS et al., 1993). A captação direta de maltose e sua hidrólise intracelular também permitem às células de levedura fermentar altas concentrações do açúcar com alto rendimento. Tentativas de melhorar a eficiência na fermentação da maltose durante condições de *VHG* em cervejaria têm revelado que o principal fator limitante na velocidade da fermentação é a expressão do transportador de maltose (KODAMA et al., 1994, 1995). Deste modo, estamos tentando aumentar a expressão da permease *AGT1* em células de levedura sem a invertase extracelular para analisar a capacidade fermentativa dessa cepa em sacarose e/ou caldo-de-cana. Seria também interessante testar a fermentação de altas concentrações de sacarose (>200 g/L) por essas cepas engenheiradas. Concluindo, esperamos que a caracterização molecular do transporte ativo e da fermentação da sacarose por *S. cerevisiae* abra novas oportunidades para a otimização de processos industriais que utilizam caldo-de-cana, incluindo a produção de bebidas destiladas, levedura de panificação e bioetanol.

## REFERÊNCIAS

BAJAJ, B.K.; TAANK, V.; THAKUR, R.L. Characterization of yeasts for ethanolic fermentation of molasses with high sugar concentrations. *J. Sci. Ind. Res.*, v.62, p.1079-1085, 2003.

BARFORD, J.P.; PHILLIPS, P.J.; ORLOWSKI, J.H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. Part 2. *Bioproc. Eng.*, v.7, p.303-307, 1992.

BARNETT, J.A. The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v.39, p.347-404, 1981.

BERG, C. World fuel ethanol - analysis and outlook. Disponível em:<<http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>>. Acesso em: 5 jan. 2004, 10:30:00.

BERTHELIS, N.J., et al. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Yeast Res.*, v.4, p.683-689, 2004.

BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell.*, v.28, p.145-154, 1982.

CASON, D.T.; REID, G.C.; GATNER, E.M.S. On the differing rates of fructose and glucose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, v. 93, p.23-25, 1987.

D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Sugar utilization by yeast during fermentation. *J. Ind. Microbiol.*, v.4, p.315-324, 1989.

DYNESEN, J., et al. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.50, p.579-582, 1998.

ECHEGARAY, O.F., et al. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. *Biomass Bioenerg.*, v.19, p.39-50, 2000.

ERASMUS, D.J.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.*, v.3, p.375-399, 2003.

EVANS, I.H. Yeast strains for baking: recent developments, In: SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M. (eds): *Yeast Technology.*, Berlin: Springer-Verlag, p 13-54, 1990.

GREIG, D.; TRAVISANO, M. The Prisoner's dilemma and polymorphism in yeast *SUC* genes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v.271, p.S25-S26, 2004.

HAQ, I.U.; SHAFIQ, K.; ALI, S. Substrate-induced repression of invertase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in submerged culture. *Pak. J. Botany.*, v.35, p.527-531, 2003.

HERWING, C., et al. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.76, p.247-258, 2001.

HOLMES, E.W. Coupled enzymatic assay for the determination of sucrose. *Anal. Biochem.*, v.244, p.103-109, 1997.

JONES, A.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Ethanol fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. *J. Agric. Food. Chem.*, v.42, p.1242-1246, 1994.

KHAN, N.A.; ZIMMERMANN, F.K.; EATON, N.R. Genetic and biochemical evidence of sucrose fermentation by maltase in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, v.123, p.43-50, 1973.

KODAMA, Y., et al. Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, v.53, p.24-29, 1995.

KODAMA, Y., et al. Yeast transformant for manufacturing beers by highgravity brewing. *Japan Patent*, v.06, p.245-759, 1994.

KRUCKEBERG, A.L., et al. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem. J.*, v.339, p.299-307, 1999.

LAVE, L.B.; GRIFFIN, W.M.; MACLEAN, H. The ethanol answer to carbon emissions. *Issues Sci. Technol.*, v.18, p.73-78, 2001.

LUGAR, R.; WOOLSEY, R. J. The new petroleum. *Foreign Aff.*, v.78, p.88-102, 1999.

MAIER, A., et al. Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7, or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res.*, v.2, p.539-550, 2002.

MALLUTA, E.F.; DECKER, P.; STAMBUK, B.U. The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Basic Microbiol.*, v.40, p.199-205, 2000.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.*

*Chem.*, v.31, p.426-429, 1959.

MWESIGYE, P.K.; BARFORD, J.P. Transport of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, v.77, p.687-690, 1994.

MWESIGYE, P.K.; BARFORD, J.P. Batch growth and transport kinetics of utilization of mixtures of sucrose and maltose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, v.82, p.101-108, 1996.

MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.M.; ATTFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.145-150, 1997.

NAUMOV, G.I., et al. Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.135, p.31-35, 1996.

ODA, Y.; OUCHI K. Discrimination of *SUC* gene from *MAL*-constitutive gene by the fermentability of fructooligosaccharide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.*, v.22, p.237-239, 1991.

ODA, Y.; OUCHI, K. Effect of invertase activity on the leavening ability of yeast in sweet dough. *Food Microbiol.*, v.7, p.241-248, 1990.

ORLOWSKI, J.H.; BARFORD, J.P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.37, p.215-218, 1991.

OZCAN, S., et al. Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast*, v.13, p.127-137, 1997.

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.63, p.554-569, 1999.

REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.*, v.245, p.324-333, 1997.

REINDERS, A.; WARD, J.M. Functional characterization of the  $\alpha$ -glucoside transporter Sut1p from *Schizosaccharomyces pombe*, the first fungal homologue of plant sucrose transporters. *Mol. Microbiol.*, v.39, p.445-454, 2001.

RODIONOV, Y.V.; KEPPEL, O.I.; SUKHACHEVA, M.V. A photometric assay for ethanol. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v.38, p.395-396, 2002.

SANTOS, E., et al. Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.216, p.652-660, 1982.

SCHWAN, R.F., et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.79, p.89-96, 2001.

SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BON, E.P.S. Assay for *in vivo* yeast invertase activity using NaF. *Anal. Biochem.*, v.238, p.26-28, 1996.

STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, v.89, p.212-214, 2000.

STAMBUK, B.U.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active  $\alpha$ -glucoside transport by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, v.1, p.73-78, 2001.

STAMBUK, B.U., et al. Active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.170, p.105-110, 1999.

STAMBUK, B.U., et al. Expression of high-affinity trehalose- $H^+$  symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1379, p.118-128, 1998.

TABATA, S., et al. Purification and characterization of  $\alpha$ -glucosidases produced by *Saccharomyces* in response to three distinct maltose genes. *Biochim. Biophys. Acta*, v.797, p.231-238, 1984.

TAKESHIGE, K., OUCHI, K. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. *J. Ferment. Bioeng.*, v.79, p.513-515, 1995.

WEUSTHUIS, R.A., et al. Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, p.3102-3109, 1993.

WHEALS, A.E., et al. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.*, v.17, p.482-487, 1999.

WYMAN, C.E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Ann. Rev. Energ. Environ.*, v. 24, p.189-226, 1999.

ZANIN, G.M., et al. Brazilian bioethanol program. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.84-86, p.1147-1161, 2000.

ZASTROW, C.R., et al. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.27, p.34-38, 2001.

ZASTROW, C.R., et al. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, v.22, p.455-459, 2000.



#### 4: Modificando o metabolismo de sacarose em *Saccharomyces cerevisiae*

### RESUMO

A ocorrência de fermentação em aerobiose, fenômeno descrito na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é altamente indesejada nos processos que visam a obtenção de biomassa por gerar perdas na produtividade. Desta forma, os atuais processos de produção de leveduras para panificação são executados por sistemas de batelada alimentada, que entre outras desvantagens, exigem constante monitoramento. Nesse trabalho, desenvolvemos e caracterizamos uma linhagem de *S. cerevisiae* engenheirada, de forma a metabolizar sacarose através de um transportador com baixa afinidade pelo substrato. A cepa engenheirada LCM001 cresce em sacarose com a mesma velocidade específica de crescimento que cepas contendo invertase ou o transportador de sacarose de alta afinidade, mas apresenta metabolismo predominantemente oxidativo, com menor produção de etanol e rendimento em biomassa 45% superior à sua parental. A LCM001 fermenta eficientemente altas concentrações de sacarose ou outros açúcares, como glicose e maltose. A utilização de linhagens com aumentada produção de biomassa e capacidade de fermentar sacarose em altas concentrações, como as encontradas no caldo-de-cana, poderá reduzir custos e aumentar a produtividade industrial desse microrganismo.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Sacarose. Biomassa.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A via glicolítica e suas enzimas foram conservadas durante a evolução. Entretanto, os mecanismos que controlam o metabolismo do carbono e a produção de energia têm se adaptado às necessidades de cada espécie ou tipo de célula. Os organismos aeróbicos respiram piruvato completamente até CO<sub>2</sub> com oxigênio como o aceptor final de elétrons, assim, fazendo máximo uso das transformações energéticas para a produção de ATP. Todavia, organismos aeróbicos facultativos podem fermentar a fonte de carbono para a rápida produção de energia, o que geralmente ocorre em condições de falta de oxigênio ou anaerobiose, mas que também é regulado pela disponibilidade da fonte de carbono (PFEIFFER; SCHUSTER; BONHOEFFER, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada pela humanidade durante milênios pela sua alta capacidade de fermentar açúcares. Essa levedura é capaz de produzir etanol tão logo a concentração de glicose atinja ~1 mM, independentemente da presença ou não do oxigênio (LAGUNAS, 1979; LAGUNAS, 1986; SONNLEITNER; KAPPELI, 1986; VERDUYN et al., 1984). A presença de glicose ou outros açúcares fermentáveis provoca uma série de alterações no metabolismo dessa célula, de forma a garantir o rápido consumo e fermentação da fonte de carbono. Pelo menos três diferentes receptores extracelulares para glicose têm sido descritos em leveduras, os que ativam a proteína quinase AMP-cíclico dependente e, portanto, estimulam o crescimento e os que regulam a expressão de uma grande família de transportadores de hexoses para garantir a eficaz captação do açúcar do meio (GELADÉ et al., 2003; JOHNSTON; KIM, 2005; LEMAIRE et al., 2004; MORIYA; JOHNSTON, 2004; ROLLAND; WINDERICKX; THEVELEIN, 2002). Além disso, uma série de estudos indicam a existência de um sensor intracelular, capaz de medir o fluxo glicolítico, favorecendo a rápida fermentação da glicose em detrimento da utilização de outras fontes de carbono ou mesmo da respiração do açúcar (BISSON; KUNATHIGAN, 2003; MORENO et al., 2005).

Em *S. cerevisiae*, a fermentação é consequência não só da baixa capacidade que a enzima piruvato desidrogenase possui, determinando um baixo fluxo do carbono para a oxidação mitocondrial, como também do controle exercido pela glicose em nível de transcrição, reprimindo uma série de enzimas requeridas para o metabolismo de outros açúcares, tais como a sacarose, a maltose e a galactose, a gliconeogênese, as enzimas respiratórias e o desenvolvimento mitocondrial. A essa série de acontecimentos dá-se o nome de repressão catabólica pela glicose (CARLSON, 1998; GANCEDO, 1998; GELADÉ et al., 2003; ROLLAND; WINDERICKX;

THEVELEIN, 2002; YIN et al., 2003). A baixas concentrações externas de glicose e em condições aeróbicas, etanol não é produzido e CO<sub>2</sub> é o principal produto obtido do catabolismo do carbono (POSTMA; SCHEFFERS; VAN DIJKEN, 1989).

Em processos voltados para a produção de biomassa, como a obtenção de fermento de panificação, extrato de levedo e proteínas heterólogas, a ocorrência de fermentação alcoólica é altamente indesejada por diminuir o rendimento em biomassa, já que parte do carbono é redirecionado à produção de metabólitos, como etanol e glicerol (VERDUYN, 1991; VERDUYN et al., 1990; VERDUYN et al., 1991). Com relação à produção de leveduras de panificação, os requisitos mais importantes no processo são o rápido crescimento e o alto rendimento em biomassa (BEUDEKER et al., 1990; EVANS, 1990). Além disso, as leveduras devem manter sua capacidade fermentativa para as aplicações práticas, neste caso, a fermentação dos açúcares presentes na massa de pão (VAN HOEK; VAN DIJKEN; PRONK, 1998).

Como em *S. cerevisiae* o controle da fermentação *versus* respiração é primariamente determinado pelo tipo e concentração da fonte de carbono, a multiplicação das células para a produção de fermento de panificação é executada em condições aeróbicas e por sistema de batelada alimentada, portanto, com adição controlada do açúcar. Geralmente, uma fase inicial de alimentação exponencial é seguida por fases de alimentação constante e em declínio, evitando-se assim a fermentação e maximizando a produção de biomassa (BEUDEKER et al., 1990; ENFORS; HEDENBERG; OLSSON, 1990). Apesar de o sistema de batelada alimentada ser o mais utilizado para a produção industrial de biomassa de leveduras, ele apresenta inconvenientes como o constante controle operacional e a variação de características entre as linhagens. Além disso, a incompleta mistura do açúcar e/ou o insuficiente suprimento de oxigênio durante a produção são potenciais causadores da produção de etanol (CANNIZZARO; VALENTINOTTI; VON STTOCKAR, 2004; WIN; IMPOOLSUP; NOOMHORM, 1996).

Ainda que centenas de anos tenham sido dedicados à pesquisa, os aspectos fundamentais no controle do metabolismo glicolítico e o passo chave na divisão do piruvato rumo à via fermentativa e/ou respiratória em leveduras são ainda pouco entendidos. De qualquer forma, há décadas tem-se tentado redirecionar o fluxo da glicose em direção à respiração para evitar a produção de etanol em altas concentrações de glicose extracelular. Basicamente, três abordagens diferentes têm sido propostas:

- Superexpressão do fator de transcrição *HAP4*, um regulador positivo da transcrição de genes envolvidos no metabolismo respiratório e biogênese mitocondrial. Linhagens de *S. cerevisiae* com superexpressão desse gene apresentam metabolismo mais oxidativo do que cepas selvagens, com redução da repressão por glicose, fazendo com que essa linhagem engenheirada apresente maior rendimento em biomassa (BLOM; TEIXEIRA DE MATOS; GRIVELL, 2000; GRIVELL; TEIXEIRA DE MATOS; BLOM, 1998; LASCARIS et al., 2002; VAN MARIS et al., 2001);
- Redução da repressão catabólica pela glicose, seja deletando o gene que codifica para hexoquinase II (*HXK2*), enzima que tem papel central no metabolismo da glicose e na repressão por glicose em *S. cerevisiae*, ou, ainda, através da deleção de reguladores como o *REG1* ou o repressor *MIG1*. Células sem esses genes apresentam crescimento mais oxidativo em altas concentrações de glicose, resultando também em maior produção de biomassa (DIDERICH et al., 2001, 2002; HERWIG et al., 2002; HERWIG; VON STOCKAR, 2002; KLEIN; OLSSON; NIELSEN, 1998; VAN DAM et al., 2002);
- Redução da captação de glicose pelas células. Considerando que o transporte através da membrana é o passo limitante na metabolização da glicose, foram deletados mais de 20 genes que codificam para transportadores de açúcares em *S. cerevisiae*, além de reintroduzir no genoma da levedura engenheirada um transportador mutante quimérico, denominado *TM6\**. Essa levedura também apresenta metabolismo respiratório com alta produção de biomassa em glicose (BILL et al., 2002; ELBING et al., 2004a; OTTERSTEDT et al., 2004).

O desenvolvimento destas linhagens tem contribuído enormemente para a compreensão do metabolismo glicolítico em leveduras, todavia, as mesmas apresentam limitada utilização industrial. Isto ocorre porque a glicose não é o principal substrato utilizado industrialmente, mas sim a sacarose. Matérias-primas ricas em sacarose, como caldo-de-cana e melaços, são utilizados mundialmente em grande escala para a produção de etanol, leveduras de panificação e bebidas alcoólicas (SCHWAN et al., 2001; WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000). No intuito de otimizar a utilização industrial de sacarose, neste trabalho descrevemos o desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de produzir altas concentrações de biomassa quando crescida em tal substrato, mantendo inalteradas a capacidade de fermentar altas concentrações de sacarose (>200 g/L) e a capacidade de fermentar eficientemente os principais açúcares (glicose e maltose) encontrados na massa de pão.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Cepas de leveduras, meios e condições de crescimento

A cepa de *S.cerevisiae* 1403-7A (ATCC # 208023. Genótipo relevante *MATa suc<sup>-</sup> MAL4<sup>c</sup> MGL3 gal3 gal4 trp1 ura3*) teve deletado do seu genoma o transportador de sacarose de alta afinidade, como descrito por Batista, Miletti e Stambuk, em 2004, dando lugar à cepa engenheirada LCM001. Métodos padrão para a transformação de leveduras, manipulação e análises de DNA foram seguidos (AUSUBEL et al., 1995). As células foram crescidas em meio rico YP contendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de sacarose (todos SIGMA, USA). O meio teve seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico e foi posteriormente autoclavado a 120°C por 20 minutos. A seguir, foram adicionados 3 mg/L antimicina A, um inibidor da cadeia respiratória (SIGMA, USA). As células foram cultivadas aerobicamente em erlenmeyers (100 ml de cultura em frascos de 500 mL) a 28°C em agitador a 160 rpm. A densidade óptica da cultura foi medida a 570 nm e usada para determinar a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ). A concentração total é expressa como peso seco, determinado com células filtradas, lavadas com água destilada e secas em microondas até peso constante. As células foram centrifugadas (2500 g, 3 min) na fase exponencial de crescimento e lavadas duas vezes com água destilada a 4°C antes de serem utilizadas para os ensaios de transporte e testes fermentativos.

### 4.2.2 Ensaios de transporte

As células crescidas como descrito no item 4.2.1 foram suspensas à densidade de 15 g/L com água destilada a 4°C. O cotransporte de prótons durante a captação de diferentes concentrações de sacarose foi determinado através do registro da mudança de pH na suspensão de leveduras como descrito previamente (STAMBUK et al., 1998; STAMBUK; DE ARAUJO, 2001; STAMBUK; BATISTA; DE ARAÚJO, 2000) utilizando-se um pHmetro PHM84 acoplado a um registrador TT1 Servograph (Radiometer, Copenhagen). A velocidade de transporte é expressa em  $\mu\text{mol}$  de sacarose transportada a 28°C/[g de células de levedura seca por min]. Todas as análises foram realizadas em triplicata com erro padrão menor que 15%.

#### 4.2.3 Ensaio de fermentação e avaliação bioquímica do processo fermentativo

As células de levedura coletadas na fase exponencial de crescimento foram suspensas a uma concentração final de 10 mg/mL e cultivadas em diferentes concentrações de sacarose como descrito por Badotti, Batista e Stambuk em 2004. Foram analisadas as concentrações de sacarose, glicose e açúcares redutores totais, bem como, a quantidade de etanol produzido, conforme os métodos descritos anteriormente (BADOTTI; BATISTA, STAMBUK, 2004).

### 4.3 RESULTADOS

A detalhada análise molecular da utilização de sacarose por *S. cerevisiae* tem revelado duas diferentes vias de metabolização desse açúcar: a hidrólise extracelular do dissacarídeo pela invertase, com posterior captação dos monossacarídeos (glicose e frutose) produzidos e a captação ativa do açúcar através do cotransporte sacarose-H<sup>+</sup> (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2004; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; MWESIGYE; BARFORD, 1996). Trabalhos têm demonstrado que não há correlação entre os níveis da enzima invertase e a capacidade de fermentar sacarose (JIMÉNEZ; BENÍTEZ, 1986). Deste modo, iniciamos nossa abordagem com uma cepa de levedura que não possui essa enzima (cepa 1403-7A), mas cresce e fermenta sacarose eficientemente graças à captação ativa do açúcar a partir do meio. Essa levedura possui um genótipo *MAL* constitutivo, importante em panificação para a correta fermentação dos açúcares presentes na massa (HIGGINS et al., 1999; ODA; OUCHI, 1990), e apresenta a mesma velocidade específica de crescimento em sacarose de cepas que possuem a enzima invertase, seja codificada pelo gene *SUC2* ou *SUC3* (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2004).

Como descrito anteriormente, para outras cepas selvagens de *S. cerevisiae* (STAMBUK; BATISTA; DE ARAUJO, 2000), a linhagem 1403-7A também apresenta atividade de transporte ativo de sacarose mediada por dois sistemas distintos, um com alta afinidade ( $K_m \sim 8$  mM) e outro com baixa afinidade ( $K_m \sim 120$  mM) pelo substrato (Figura 4.1). A seguir, deletamos do genoma dessa levedura o gene que codifica para o transportador de alta afinidade, seguindo metodologia descrita por Batista, Milette e Stambuk (2004). Como demonstramos na Figura 4.1, a

cepa engenheirada LCM001 obtida, de fato, apresentou apenas o transportador de sacarose com baixa afinidade.

A nova linhagem de *S. cerevisiae* continuou crescendo em sacarose com a mesma velocidade específica que a parental 1403-7A (Tabela 4.1), assim, maiores detalhes da cinética de crescimento dessas células foram avaliados. Utilizando sacarose como fonte de carbono, a cepa 1403-7A apresentou um típico crescimento aeróbico em batelada, onde as células crescem exponencialmente nas primeiras 25-30 horas, consomem o açúcar e produzem etanol (Figura 4.2). Com o término do substrato, as células param de crescer, dando lugar à chamada parada diaúxica, quando as células não estão mais reprimidas pela fonte de carbono e, entre outras funções, sintetizam a maquinaria enzimática que permite respirar o etanol produzido durante a primeira fase de crescimento exponencial (LEWIS et al., 1993). Conseqüentemente, ocorre uma segunda fase de crescimento aeróbico entre 40-60 horas após o início do processo, onde o etanol é consumido pelas células e a máxima concentração celular é atingida (Figura 4.2).

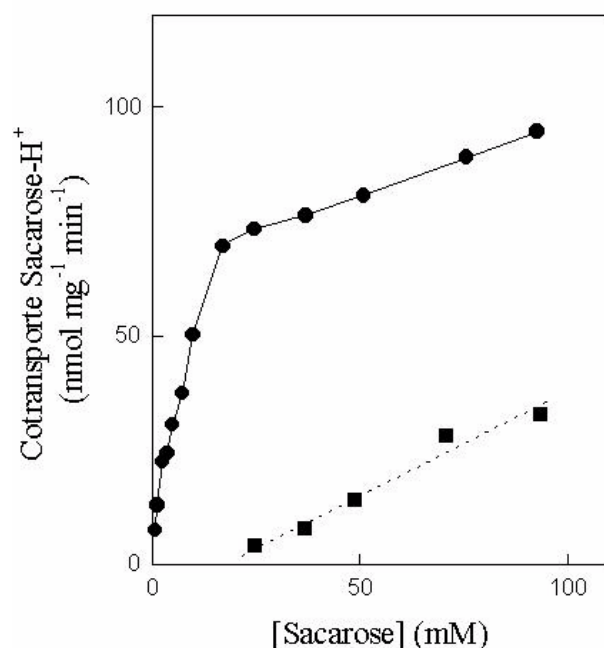


Figura 4.1. Análise cinética do cotransporte sacarose- $H^+$  pelas leveduras. A velocidade de transporte ativo de sacarose foi determinada com diferentes concentrações do substrato em células da cepa 1403-7A (●) e em células da linhagem engenheirada LCM001 (■), previamente crescidas em sacarose, como descrito em Material e Métodos.

Tabela 4.1. Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), biomassa produzida e rendimento em etanol ( $Y_{e/s}$ ) pelas linhagens 1403-7A e LCM001.

Cepa	Condição	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Biomassa (g/L)	$Y_{e/s}$ (g/g sacarose)
1403-7A	Crescimento (batelada) em sacarose	0,22	8,8	0,36
	idem acima + antimicina A	0,22	2,7	0,51
LCM001	Crescimento (batelada) em sacarose	0,24	12,8	0,16
	idem acima + antimicina A	0,12	2,8	0,49



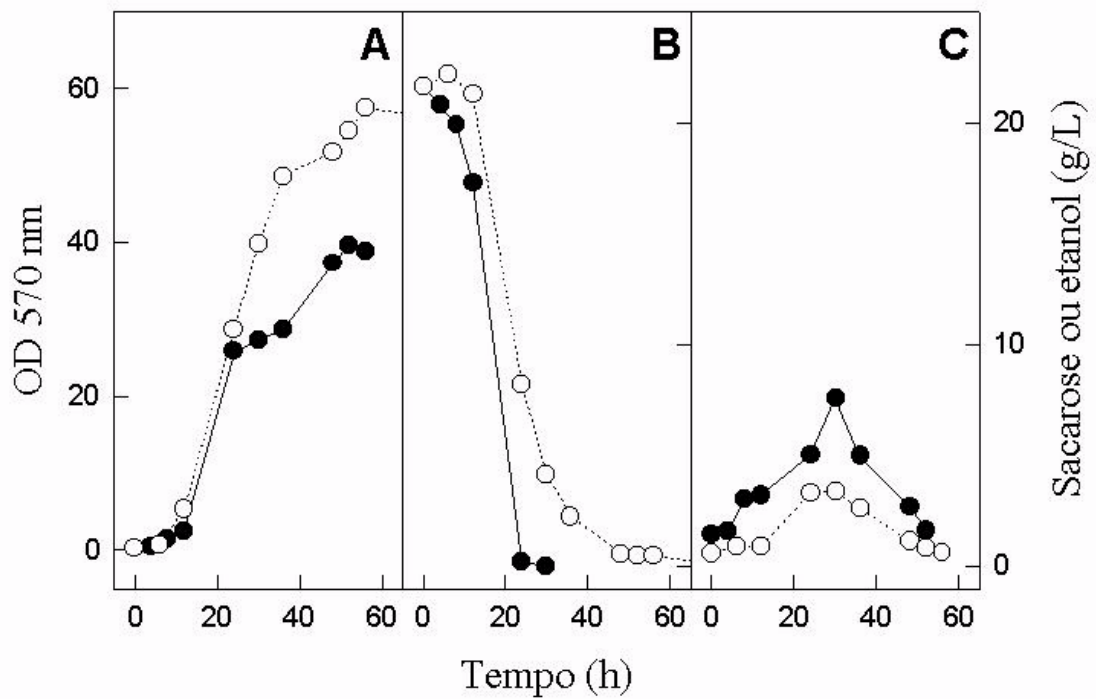


Figura 4.2. Crescimento aeróbico em batelada com sacarose como fonte de carbono. Células da cepa parental 1403-7A (●) e da cepa engenheirada LCM001 (○) foram inoculadas em meio rico YP contendo 20 g/L sacarose e tiveram o crescimento (A), o consumo de sacarose (B) e a produção de etanol (C) avaliados ao longo do tempo.

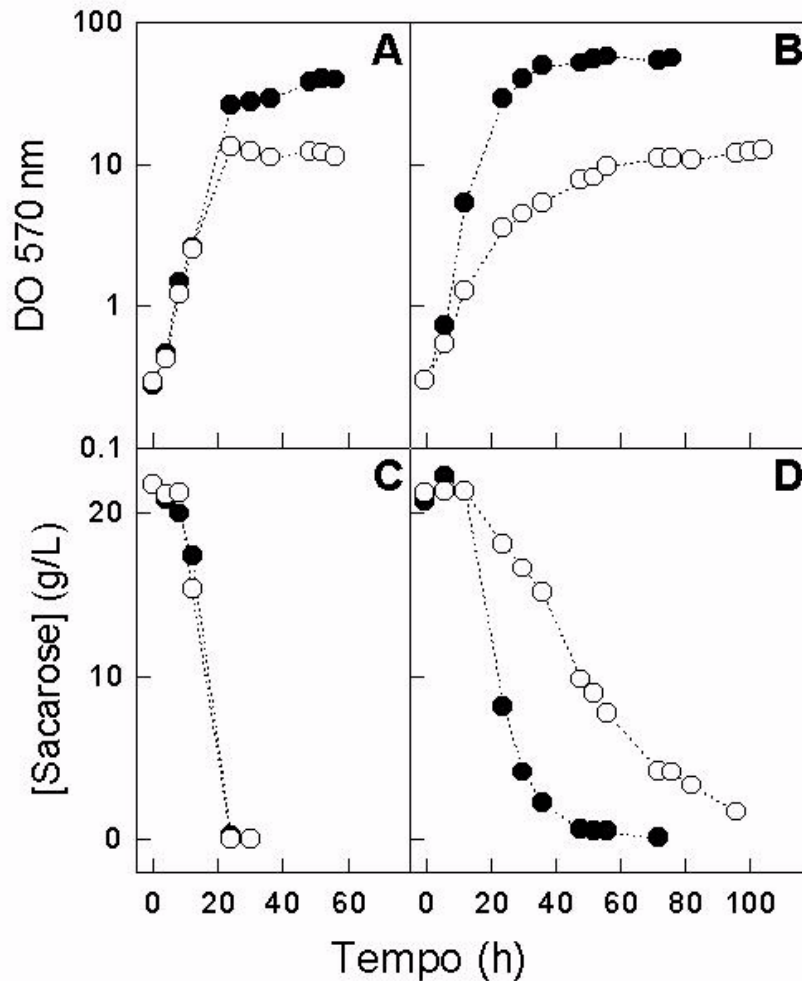


Figura 4.3. Efeito da antimicina A no crescimento aeróbico em batelada com sacarose (20 g/L) como fonte de carbono. Células da cepa parental 1403-7A (A, C) e da cepa engenheirada LCM001 (B, D) foram inoculadas na ausência (●) ou presença (○) de antimicina A. Foram ainda acompanhados o crescimento (A e B) e o consumo de sacarose (C e D) ao longo do tempo.

A cepa engenheirada LCM001 apresentou um crescimento claramente distinto daquele apresentado pela sua parental 1403-7A. Apesar de ambas possuírem a mesma velocidade específica de crescimento, a linhagem LCM001 consumiu mais lentamente a sacarose do meio, produziu significativamente menos etanol (metade) e não apresentou a chamada parada diaúxica, crescendo constantemente até atingir uma concentração de biomassa 45% superior àquela da cepa 1403-7A (Figura 4.2, Tabela 4.1). Inclusive, na LCM001, a fase de consumo do etanol ocorreu enquanto ainda existia sacarose no meio, indicando menor repressão catabólica pelo açúcar e sugerindo que as células estão mantendo uma alta taxa de crescimento graças à maior oxidação (respiração) do açúcar.

A contribuição da respiração para o crescimento celular foi avaliada utilizando-se um inibidor da cadeia de transporte de elétrons, a antimicina A. Como mostrado na Figura 4.3, a presença do inibidor não afetou a velocidade específica de crescimento nem o consumo da sacarose na cepa 1403-7A, confirmando o metabolismo fermentativo dessas células. Apenas a segunda fase do crescimento aeróbico foi afetada, levando a menor concentração celular e acúmulo de etanol no meio de cultura, praticamente o máximo teórico de conversão etanol/açúcar (Figura 4.3, Tabela 4.1). No caso da cepa engenheirada LCM001, a presença da antimicina A inibiu significativamente a velocidade específica de crescimento e o consumo de sacarose do meio, fazendo com que fossem necessárias mais de 100 horas de cultivo para que o açúcar fosse totalmente consumido e as células atingissem a mesma concentração de biomassa que a cepa parental na presença do inibidor (Figura 4.3, Tabela 4.1). Nesse caso, o etanol também não foi consumido pelas células, atingindo valores próximos ao máximo teórico. Esses resultados indicam que a cepa engenheirada LCM001 apresenta uma mudança no metabolismo da sacarose que provoca um maior direcionamento do açúcar através da respiração mitocondrial, com conseqüente ganho na produção de biomassa. Posteriormente, avaliamos a *performance* fermentativa em condições que simulam as fermentações industriais, isto é, fermentações em batelada com altas concentrações celulares. Para tanto, testamos uma concentração de 20 g/L sacarose (Figura 4.4), sendo que nessas condições a cepa engenheirada LCM001 apresentou um lento consumo do açúcar, sem ocorrer produção de etanol. Entretanto, quando analisamos a fermentação de altas concentrações (>200 g/L) de sacarose, a cepa LCM001 apresentou praticamente o mesmo padrão de consumo de sacarose e produção de etanol da cepa parental 1403-7A (Figura 4.5).

É importante salientar que o crescimento e/ou fermentação de outros açúcares, como glicose e maltose pela cepa engenheirada, é normal e indistinguível daquele apresentado pela cepa 1403-7A (dados não mostrados).

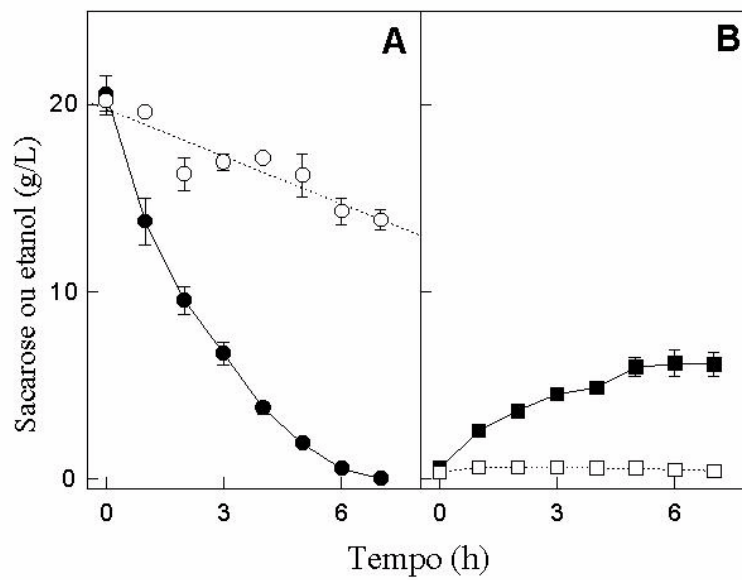


Figura 4.4. Fermentação em batelada com altas concentrações de células (10 g/L). No gráfico **A** é demonstrado o consumo do açúcar (20 g/L sacarose) e no gráfico **B**, a produção de etanol pelas linhagens 1403-7A (●, ■) e LCM001 (○, □).

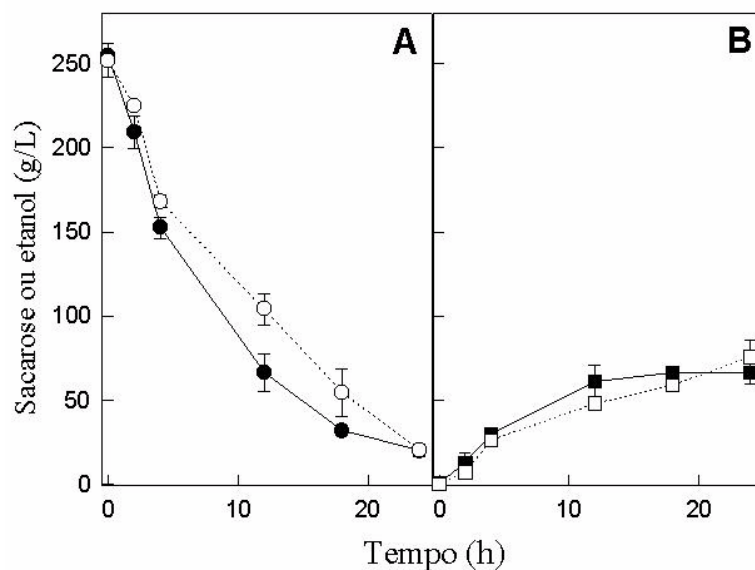


Figura 4.5. Fermentação em batelada de 250 g/L sacarose. No gráfico **A** é mostrado o consumo do açúcar e no gráfico **B**, a produção de etanol durante a fermentação com altas concentrações de células (10 g/L) da linhagem 1403-7A (●,■) e LCM001 (○, □).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Como mencionado na introdução, os conhecimentos adquiridos acerca do metabolismo da glicose por *S. cerevisiae* têm permitido provocar alterações nessas células visando o aumento na produção de biomassa (BILL et al., 2002; GRIVELL; TEIXEIRA DE MATTOS; BLOM, 1998; VAN DAM et al., 2002), seja pela superexpressão de ativadores da biogênese mitocondrial, como o *HAP4*, pela deleção de genes envolvidos na repressão catabólica pela glicose - como *HXK2*, *REG1*, *MIG1* - ou, ainda, pela redução do fluxo de hexoses para o interior da célula (deleção dos genes *HXT1-17*, *GAL2*, etc.). Ainda que os trabalhos nessa área tenham gerado importantes conhecimentos, as linhagens desenvolvidas possuem grandes limitações do ponto de vista industrial por apresentarem problemas na regulação e/ou utilização de outros açúcares utilizados industrialmente, como a sacarose, a galactose e maltose (ELBING et al., 2004b; ENTAIN, 1980; ENTIAN; LOUREIRODIAS, 1990; KLEIN; OLSSON; NIELSEN, 1998; KLEIN et al., 1999; LASCARIS et al., 2004; RAAMSDONK et al., 2001).

Considerando que a sacarose é o principal açúcar a ser utilizado pela levedura *S. cerevisiae* em processos industriais, neste trabalho modificamos o metabolismo desse açúcar levando em consideração a recente caracterização molecular das enzimas e transportadores envolvidos na fermentação dessa fonte de carbono (BADOTTI; BATISTA; STAMBUK, 2004; BATISTA; MILETTI; STAMBUK, 2004; MWESIGYE; BARFORD, 1996; STAMBUK; BATISTA; DE ARAUJO, 2000). A cepa engenheirada LCM001, por não possuir nem a enzima invertase, nem o transportador de sacarose de alta afinidade, depende de um sistema de transporte de baixa afinidade ( $K_m > 100 \text{ mM}$ ) para captar o açúcar do meio. Essa cepa cresce em batelada com sacarose como fonte de carbono, com a mesma velocidade específica que cepas com invertase e/ou com o transportador de sacarose de alta afinidade, mas o faz direcionando boa parte do carbono proveniente do açúcar para a respiração celular, produzindo ~50% menos etanol e ~45% mais biomassa que a linhagem parental. Ainda que a fermentação de baixas concentrações de sacarose estivesse comprometida nessas células, a fermentação de altas concentrações, como as encontradas na produção industrial de álcool combustível, ocorreu normalmente.

O desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de produzir altas concentrações de biomassa a partir de sacarose é extremamente útil na produção de leveduras de panificação, produção de extrato de levedo e/ou proteínas heterólogas. Seria interessante verificar o comportamento dessa levedura engenheirada em sistemas que simulam a produção de leveduras de panificação, como o crescimento em batelada alimentada (VAN HOEK et al., 2000). Acreditamos que essa levedura, por preferencialmente respirar a sacarose, necessite menos controle da alimentação do fermentador, podendo, inclusive, serem utilizadas concentrações mais altas do substrato, o que favoreceria a velocidade de crescimento da levedura. Desta forma, o ganho em produtividade seria duplo: maior biomassa formada em tempo menor. Finalmente, é importante considerar que a cepa engenheirada LCM001 cresce e fermenta normalmente outros açúcares importantes na aplicação de leveduras, como na fermentação dos açúcares presentes na massa de pão. Pretendemos avaliar a *performance* dessa linhagem na fermentação de massa de pão para confirmar que as propriedades necessárias à utilização dessa levedura em panificação foram conservadas.

## REFERÊNCIAS

- AUSUBEL, F.M., et al. *Short protocols in molecular biology*. New York: Wiley, 1995.
- BADOTTI, F.; BATISTA, A.S.; STAMBUK, B.U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.47, p.s119-s127, 2004.
- BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* v.8, p.26-33, 2004.
- BEUDEKER, R.F., et al. Developments in bakers' yeast production. *Yeast Biotechnol. Biocat.* p.103-146, 1990.
- BILL, R. et al. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing chimeric glucose transporters. *World Pat.* WO0200880, 2002.
- BISSON, L.F.; KUNATHIGAN, V. On the trail of an elusive flux sensor. *Res. Microbiol.*, v.154, p.603-610, 2003.
- BLOM, I.; TEIXEIRA DE MATOS, J. M.; GRIVELL, L.A. Redirection of the respirofermentative distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.1970-1973, 2000.
- CANNIZZARO, C.; VALENTINOTTI, S.; VON STTOCKAR, U. Control of yeast fed-batch process through regulation of extracellular ethanol concentration. *Bioproc. Biosys. Eng.* v.26, p.377-383, 2004.
- CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v.8, p.560-564, 1998.
- DIDERICH J.A., et al. Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, p.1587-1593, 2001.
- DIDERICH, J.A., et al. Effects of a hexokinase II deletion on the dynamics of glycolysis in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, v.1482, p.1-8, 2002.

ELBING, K., et al. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.5323-5330, 2004a.

ELBING, K., et al. Transcriptional responses to glucose at different glycolytic rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, v.271, p.4855-4864, 2004b.

ENFORS, S.O.; HEDENBERG, J.; OLSSON, K. Simulation of the dynamics in the bakers' yeast process. *Bioproc. Eng.* v.5, p.191-198, 1990.

ENTIAN, K.D. A defect in carbon catabolite repression associated with uncontrollable and excessive maltose uptake. *Mol. Gen. Genet.*, v.179, p.169-175, 1980.

ENTIAN, K.D.; LOUREIRODIAS, M.C. Misregulation of maltose uptake in a glucose repression defective mutant of *Saccharomyces cerevisiae* leads to glucose poisoning. *J. Gen. Microbiol.* v.136, p.855-860, 1990.

EVANS, I.H. Yeast strains for baking: recent developments; *In* Spencer, J.F.T., and Spencer, D.M. (eds): *Yeast Technology.*, Berlin, Springer-Verlag, p. 13-54, 1990.

GANCEDO, J. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, p.334-361, 1998.

GELADÉ, R., et al. Multi-level response of the yeast genome to glucose. *Genome Biol.*, v.4, r.233, p.1-5, 2003.

GRIVELL, L.A.; TEIXEIRA DE MATOS, J. M.; BLOM, I. Methods for modulating metabolic pathways of micro-organisms and micro-organisms obtainable by said methods. *World Pat.* WO9826079, 1998.

HERWIG, C., et al. Quantitative analysis of the impact of *HXK2* and *REG1* deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on invertase expression and respiration. *Enzyme Microbial Technol.*, v.31, p.505-515, 2002.

HERWIG, C.; VON STOCKAR, U. Quantitative analysis of the oxidative metabolism in *HXK2*- and *REG1*-deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Technol.*, v.31, p.698-710, 2002.



HIGGINS, V.J., et al. Genetic evidence that high noninduced maltase and maltose permease activities, governed by *MALx3*-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by Baker's yeast in unsugared dough. *Appl. Environment Microbiol.* v.65, p.680-685, 1999.

JIMÉNEZ, J; BENÍTEZ, T. Characterization of wine yeasts for ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.25, p.150-154, 1986.

JOHNSTON, M; KIM, H. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Society*, v.33, p.247-252, 2005.

KLEIN, C.J.L. et al. Investigation of the impact of *MIG1* and *MIG2* on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, v.68, p.197-212, 1999.

KLEIN, C.J.L.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Nitrogen-limited continuous cultivations as a tool to quantify glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Technol.*, v.23, p.91-100, 1998.

LAGUNAS, R. Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cel. Biochem.*, v.27, p.139-146, 1979.

LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.2, p.221-228, 1986.

LASCARIS, R., et al. Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.*, v.4, p.1-10, 2002.

LASCARIS, R., et al. Overexpression of *HAP4* in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of glucose-regulated genes. *Microbiology*, v.150, p.929-934, 2004.

LEMAIRE K., et al. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell*, v.16, p.293-299, 2004.

LEWIS, J.G., et al. The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, v.139, p.835-839, 1993.

MORENO, F., et al. Glucose sensing through the HxK2-dependent signalling pathway. *Biochem. Society*, v.33, 265-268, 2005.

MORIYA, H.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Cell Biol.* v.101, p.1572-1577, 2004.

MWESIGYE, P.K.; BARFORD, J.P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* v.42, p. 209-306, 1996.

ODA, Y.; OUCHI, K. Role of the yeast maltose fermentation genes in CO<sub>2</sub> production rate from sponge dough. *Food Microbiol.* v.7, p. 43-47, 1990.

OTTERSTEDT, K., et al. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Reports*, v.5, p.532-537, 2004.

PFEIFFER, T.; SCHUSTER, S.; BONHOEFFER, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, v.292, p.504-507, 2001.

POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.5, p.159-165, 1989.

RAAMSDONK, L.M., et al. Co-consumption of sugars or ethanol and glucose in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deleted in the *HXK2* gene. *Yeast*, v.18, p.1023-1033, 2001.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J. THEVELEIN, J.M. Glucose-sensing and -signaling mechanisms in yeasts. *FEMS Yeasts Res.*, v.2, p.183-201, 2002.

SCHWAN, R.F., et al. Microbiology and physiology of cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.79, p.89-96, 2001.

SONNLEITNER, B.; KÄPPELI, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.*, v.28, p.927-937, 1986.

STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, v.89, p.212-214, 2000.

STAMBUK, B.U.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active  $\alpha$ -glucoside transport by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, v.1, p.73-78, 2001.

STAMBUK, B.U., et al. Expression of high-affinity trehalose- $H^+$  symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1379, p.118-128, 1998.

VAN DAM, K. et al. Process for the production of yeast biomass comprising functionally deleted *HXK2* genes. *Eur. Pat.* EP1168432, 2002.

VAN HOEK, P., et al. Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, v.68, p.517-523, 2000.

VAN HOEK, P.; VAN DIJKEN, P.; PRONK, J. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Appl. Environmental Microbiol.* v.64, p.4226-4233, 1998.

VAN MARIS, A.J.A., et al. Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of *HAP4* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, v.1, p.139-149, 2001.

VERDUYN, C. et al. A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie Leeuw.*, v.59, p.49-63, 1991.

VERDUYN, C., et al. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.19, p.181-185, 1984.

VERDUYN C., et al. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* v.136, p.395-403, 1990.

VERDUYN, C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie Leeuw.* v.60, p.325-353, 1991.

WHEALS, A.E., et al. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.*, v.17, p.482-487, 1999.

WIN, S.S.; IMPOOLSUP, A.; NOOMHORM, A. Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. *J. Ind. Microbiol.* v.16, p.117-123, 1996.

YIN, Z.K., et al. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. *Mol. Microbiol.*, v.48, p.713-724, 2003.

ZANIN, G.M., et al. Brazilian bioethanol program. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.84-86, p.1147-1161, 2000.

## 5 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Análises microbiológicas realizadas durante o processo de fermentação para a produção de cachaça catarinense apontaram significativa presença de bactérias e leveduras no caldo-de-cana, diferente do que ocorre com o melado, outro substrato utilizado na produção dessa bebida. Além disso, encontramos variações na composição de açúcares do melado. Os fatores mencionados certamente contribuem para a atual falta de padronização encontrada na cachaça produzida no estado. Ao longo do processo fermentativo isolamos e identificamos as cepas de levedura presentes em maior concentração, e da mesma forma que outros trabalhos já haviam demonstrado, a espécie predominante foi *Saccharomyces cerevisiae*. Outros gêneros, como *Kloeckera* e *Candida*, também foram isolados. As características que apontam a linhagem ideal para a produção de aguardente ainda não estão bem definidas, entretanto, alguns estudos já têm estabelecido parâmetros importantes, como a capacidade fermentativa e a produção de compostos secundários. Neste trabalho, duas características foram avaliadas nas linhagens isoladas, atividade invertase e capacidade fermentativa, sendo que não encontramos nenhuma correlação entre os parâmetros. Pretendemos, futuramente, analisar o comportamento dessas cepas em fermentações que reproduzem as condições para a produção de cachaça (alta concentração de sacarose e alta densidade celular).

Assim, o controle da etapa fermentativa, através de análises simples e cuidados no manuseio da cana, favoreceriam a obtenção de um produto menos sujeito a variações. Algumas mudanças na estrutura física da cachaçaria também são aconselhadas, como a substituição das atuais dornas de madeira, que apresentam rachaduras e dificultam a higienização, por outras de aço inoxidável e a colocação de telas nas janelas e azulejos nas paredes, de forma a facilitar a limpeza e prevenir contaminações. Finalmente, se faz necessário investimentos com embalagens, que agregam valor ao produto, atualmente comercializado em garrafas plásticas ou garrafões. Os resultados obtidos neste estudo serão repassados ao produtor, que gentilmente permitiu a coleta das amostras. Ainda, as cepas isoladas deverão ser melhor caracterizadas e repassadas aos produtores de cachaça da região. Desta forma, esperamos contribuir para aumentar o valor de venda da bebida produzida em Santa Catarina.

A metabolização de sacarose por *S. cerevisiae* pode ocorrer tanto pela captação direta desse açúcar como pela captação dos seus produtos de hidrólise para o interior da célula. O

transporte ativo é realizado através de cotransporte sacarose- $H^+$  mediado pela permease *AGT1*, sendo esta, uma via para utilização desse açúcar ainda pouco caracterizada. Neste trabalho, a partir de uma cepa de *S. cerevisiae* sem invertase e de outra incapaz de fermentar glicose e frutose, demonstramos que a sacarose pode ser fermentada de forma eficiente utilizando apenas o transporte ativo. Seria interessante testar a capacidade fermentativa dessas linhagens engenheiradas em caldo-de-cana, pois esse substrato é amplamente utilizado em processos industriais que visam o alto rendimento em etanol, como álcool combustível.

A levedura *S. cerevisiae* é capaz de fermentar açúcares mesmo na presença de oxigênio. Entretanto, em processos que visam a obtenção de biomassa, como a produção de leveduras para panificação, a ocorrência de fermentação é altamente indesejada por reduzir a quantidade de carbono direcionado para a síntese das células. Com base nos conhecimentos adquiridos acerca da metabolização de sacarose por *S. cerevisiae*, desenvolvemos uma linhagem sem invertase e sem o transportador de sacarose de alta afinidade. Essa cepa, denominada LCM001, é capaz de fermentar altas concentrações de sacarose, apesar de possuir um metabolismo predominantemente oxidativo. Além disso, a LCM001 produz 45% mais biomassa que a sua parental em crescimento aeróbico.

Tentativas de inibir a fermentação de glicose em *S. cerevisiae* através de engenharia genética têm sido feitas há décadas, entretanto, a interferência com o metabolismo de outros açúcares sempre foi uma barreira à aplicação industrial dessas linhagens. A cepa apresentada por nós, aparentemente não interfere com a metabolização de outros açúcares, sendo assim, consideramo-la apropriada para a utilização em processos que visam grande rendimento em biomassa, como a produção de leveduras para panificação e proteínas heterólogas. Seria interessante confirmar outros aspectos do metabolismo oxidativo nessa linhagem, como a expressão dos citocromos e outras proteínas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons, bem como, verificar a performance da mesma durante o crescimento por batelada alimentada, onde esperamos que a produtividade seja maior do que aquela normalmente observada para as leveduras de panificação.