

Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*¹

L.V. FERREIRA^{2,*}, H.V. AMORIM², L.C. BASSO²

RESUMO

As linhagens PE-2 e VR-1 de *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas à fermentação das reservas endógenas na temperatura de 40°C. No intervalo de 0 a 24 horas foram recolhidas as amostras para a determinação de etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, bem como os carboidratos de reserva (trealose e glicogênio) e a viabilidade celular. A trealose foi esgotada durante 24 horas. Os teores de glicogênio sofreram muitas oscilações ao longo do tempo, entre a mobilização e a síntese e embora não esgotado, deve ter contribuído significativamente para a formação de álcool na suspensão. Foi observada a relação proporcional entre a mobilização de trealose e a queda da viabilidade celular. No transcorrer da fermentação das reservas de carboidratos houve

aumento nos teores de nitrogênio no fermento até 6 e 8 horas, sendo tal incremento afetado pela linhagem de levedura. No prosseguimento da fermentação ocorreu a autólise celular, que foi percebida pelo aumento brusco de nitrogênio no vinho (de 200 para 1500mg/L) e pela queda da viabilidade celular. O ganho alcançado com a fermentação endógena foi de 40 e 68 litros de álcool por tonelada de levedura seca com incremento de 25 e 27% de proteína no fermento para as linhagens PE-2 e VR-1, respectivamente. Este resultado tem reflexos positivos quando da comercialização da levedura seca como proteína microbiana.

Palavras-chave: fermentação, trealose, glicogênio, etanol, proteína, *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMMARY

FERMENTATION OF ENDOGENOUS TREHALOSE AND GLYCOGEN BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. Two *Saccharomyces cerevisiae* strains (PE-2 and VR-1) were subjected to fermentation of its carbohydrate reserve (Trehalose and glycogen) at 40°C. During a 24 hours interval samples were collected for determination of ethanol, yeast and wine nitrogen, yeast trehalose, glycogen and cell viability. Trehalose was completely exhausted after 24 hours. Glycogen was not completely consumed, but probably

contributes for ethanol formation. As trehalose is consumed yeast cell viability decreases, while yeast nitrogen content increase, reaching a maximum between 6 and 8 hours, depending on the yeast strain. If yeast is maintained under prolonged stressing conditions, cell autolysis occurs and nitrogen is lost to the medium, increasing from 200 to 1500mg/L. Such endogenous fermentation allows a production of 40 to 68L of ethanol per ton of dry yeast, with yeast nitrogen increasing of 25 and 27% for PE-2 and VR-1, respectively.

Keywords: fermentation, trehalose, glycogen, ethanol, protein, *Saccharomyces cerevisiae*.

1 – INTRODUÇÃO

A fermentação endógena é um processo pelo qual a levedura mobiliza os seus carboidratos de reserva (trealose e glicogênio) para a formação de álcool, como fonte alternativa para aquisição de energia para o seu crescimento e desenvolvimento.

Muitos fatores afetam o rendimento da fermentação, os quais foram e continuarão a ser estudados com o objetivo de se otimizar o rendimento do processo.

Muitas dessas pesquisas já orientaram novos procedimentos na condução do processo fermentativo em escala industrial, com subsequente aumento do rendimento da fermentação alcoólica. Mesmo assim uma quantidade significativa de açúcar não é transformada em etanol, sendo em parte utilizada para a multiplicação do fermento na dorna, bem como a formação dos

carboidratos de reserva, produtos secundários como glicerol, succinato, acetato, lactato, acetona, butanodiol, álcoois superiores, etc.

A primeira evidência da fermentação endógena em leveduras foi divulgada em 1961 por BRADY [5]. Constatou-se uma pequena queda nas reservas de carboidratos acompanhada por formação de etanol e CO₂, quando as células eram mantidas em anaerobiose. Em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* as reservas de carboidratos são degradadas e transformadas em álcool por processo fermentativo durante a ausência de nutrientes, sob aerobiose ou anaerobiose em condições de pH baixo (2,50 - 3,50) ou de temperatura alta (35 - 45°C) [7].

Maiores teores alcoólicos do meio parecem acelerar a mobilização das reservas, mas o rendimento em etanol (que pode ser maior ou menor do que permite a estequiometria das reservas mobilizadas), depende muito das condições fisiológicas nas quais a levedura inicia o processo. Entretanto, faz-se necessária a busca de mecanismos que façam com que o glicogênio seja totalmente mobilizado para aumentar o rendimento em álcool produzido [2].

Os carboidratos de reserva da levedura, chegam a representar até 30% da matéria seca do fermento e seus teores sofrem alterações consideráveis durante a fermentação; deste modo torna-se importante buscar a correlação do acúmulo e mobilização de tais reservas com o rendimento fermentativo. Foram avaliadas neste trabalho as variáveis ligadas à fermentação endógena tais como: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, níveis de trealose e glicogênio e a viabilidade celular. Com estes dados será possível criar uma estratégia a uma boa fermentação endógena com o rendimento adequado, com a vantagem de obter o aumento em álcool produzido e ao mesmo tempo ter um fermento rico em

proteína, cujo valor comercial se eleva quando for vendida como a levedura seca no final da safra.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Microrganismos

Foram utilizadas no experimento as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e VR-1. As duas linhagens foram isoladas no processo fermentativo industrial, respectivamente na Usina da Pedra, região Serrana-SP e na Usina Vale do Rosário, Orlandia-SP e caracterizadas pelo método de cariotipagem empregada pela FERMENTEC S/C LTDA no Departamento de Química - Bioquímica - ESALQ - USP - Piracicaba - SP. A coleção é mantida no Setor de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - ESALQ/USP.

2.2 – Fermentação endógena

Material: Erlenmeyer de 1L e banho-maria.

Após a fermentação prévia que tem como objetivo aumentar a concentração das reservas, fermentando-se em condições normais, o fermento já está em condições para proceder a fermentação endógena. A mesma foi feita na suspensão de 30% P/V de fermento (210g de fermento em 700mL do meio) com o teor alcoólico de 3 a 4% V/V e submetido à temperatura de 40°C no banho-maria. Foram determinadas em cada tempo dentro do intervalo de 0 a 24 horas as variáveis etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose, glicogênio e viabilidade celular com duas repetições cada.

2.2.1 - Determinação de etanol

O etanol foi determinado com a destilação prévia de 25mL da amostra no microdestilador Kjeldhal adaptado para álcool. Com o destilado obtido foi feita a leitura do grau alcoólico no densímetro digital Anton-Paar DMA-48 após a introdução do

destilado [1].

2.2.2 - Extração e determinação dos carboidratos de reserva

A trealose foi extraída com ácido tricloroacético - CCl_3COOH 0,5 M (TCA) a frio [9] e determinado pelo método de Antrona [6] e a leitura foi feita no colorímetro a 620nm.

O glicogênio foi extraído com carbonato de sódio (Na_2CO_3 0,25M), também a frio e determinado pelo método enzimático empregando-se glicose oxidase, peroxidase. A leitura foi feita no espectrofotômetro como glicose a 525nm [8].

2.2.3 - Determinação do nitrogênio total no fermento e no vinho

O nitrogênio total foi determinado pelo Método Kjeldhal que consiste na digestão de 100mg de amostra de fermento seco e 1mL da amostra de vinho em um blocodigestor à temperatura de 350°C por 2 a 3 horas; após a digestão fez-se a destilação utilizando o microdestilador Kjeldhal. O destilado deve borbulhar na solução de ácido bórico com a mistura indicadora (vermelho de metila e verde de bromocresol na proporção de 1:10) até a obtenção de um volume equivalente ao dobro do volume inicial no erlenmeyer; depois titulou-se com a solução padronizada de H_2SO_4 0,01N e 0,1N respectivamente para vinho e fermento [10].

2.2.4 - Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada com a utilização de eritrosina para colorir as células de levedura [4]. A contagem foi efetuada ao microscópio ótico através da câmara de Neubauer.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização dos carboidratos de reserva pela levedura para produzir álcool e energia necessária para a sua sobrevivência

constitui um processo denominado fermentação endógena. No decorrer da qual ocorre o aumento do teor alcoólico na suspensão até o final da fermentação, quando a viabilidade celular se torna comprometida. A *Figura 1* mostra a variação do teor alcoólico e a mobilização de trealose com o tempo em duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e VR-1. Na linhagem PE-2 a trealose parece ser a reserva principal na produção de álcool na primeira hora e depois da segunda hora, juntamente com o glicogênio (*Figura 2a*) de 2 a 6 horas de fermentação. Na linhagem VR-1 a trealose não se alterou nas primeiras 6 horas e deve ter sido a responsável pela produção de etanol entre 6 e 24 horas. Quanto ao glicogênio deve ter sido o responsável pela produção de álcool nas duas primeiras horas e entre 4 e 8 horas (*Figura 2b*). A viabilidade celular na PE-2 parece estar relacionada com o abaixamento da trealose de 0 a 1 hora e de 2 a 24 horas (*Figura 1a*), embora o glicogênio teve curva semelhante entre 0 e 6 horas (*Figura 2a*). Quanto à linhagem VR-1, nas primeiras 6 horas, a viabilidade se relacionou bem com a variação do glicogênio (*Figura 2b*) e melhor com trealose entre 6 e 24 horas (*Figura 1b*).

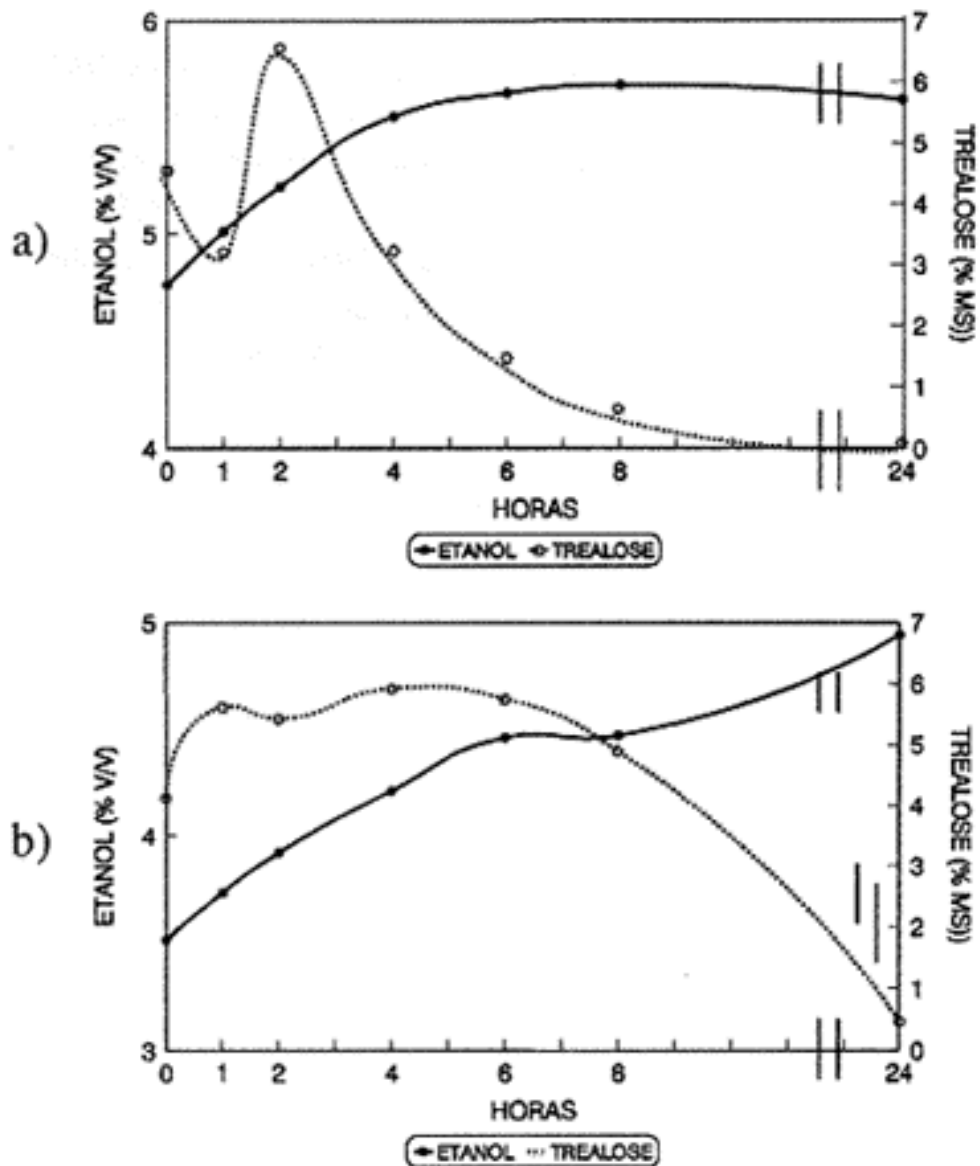


FIGURA 1. Fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* na suspensão de 30% p/v de fermento úmido à temperatura de 40°C. A variação de etanol e trealose no transcorrer da fermentação, (a) linhagem PE-2 e (b) linhagem VR-1.

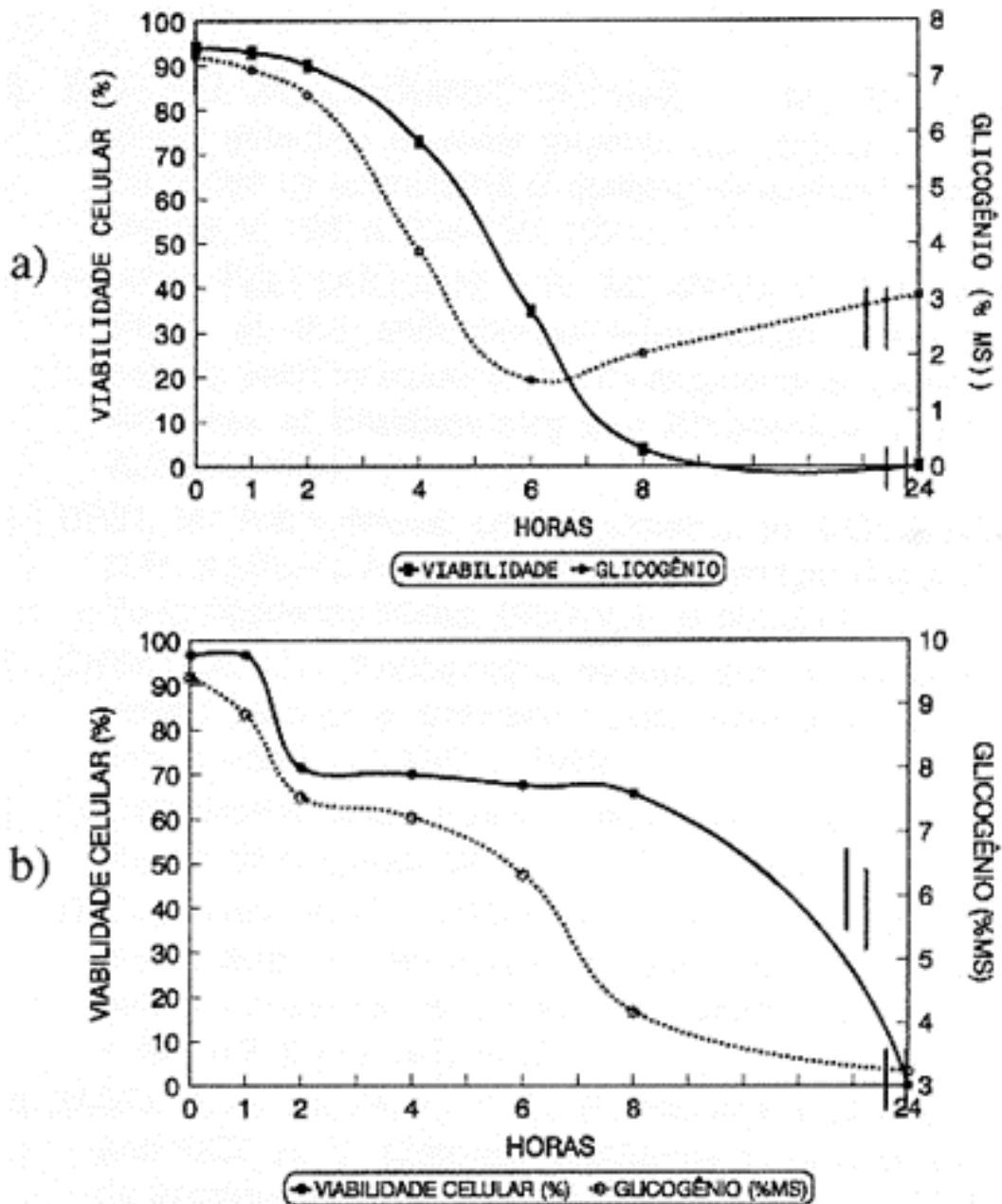


FIGURA 2. Fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* na suspensão de 30% p/v de fermento úmido à temperatura de 40°C. A variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo, (a) linhagem PE-2 e (b) linhagem VR-1.

A linhagem PE-2 produziu em 24 horas de fermentação 40 litros de álcool por tonelada de levedura seca e a linhagem VR-1 produziu 68 litros de álcool por tonelada de levedura seca. O nitrogênio no fermento comportou de maneira inversa a mobilização das reservas e concomitante a formação de etanol,

aumentou a sua concentração no fermento até 6 horas com a linhagem PE-2 (*Figura 3a*) e até 8 horas com a linhagem VR-1 (*Figura 3b*). Com a primeira linhagem o máximo da produção de etanol (*Figura 1a*) coincidiu com maior concentração de nitrogênio no fermento (*Figura 3a*) [3]. A *Figura 3* representa a relação existente entre o nitrogênio no fermento e no vinho durante a fermentação endógena com a linhagem PE-2 e VR-1 respectivamente. No intervalo entre 6 e 8 horas de fermentação, de acordo com as duas linhagens o nitrogênio no vinho permaneceu baixo. Com a continuidade do processo ocorreu a autólise celular pela ruptura da membrana plasmática da levedura que foi percebida pelo aumento acentuado de nitrogênio no vinho e pelo valor baixo de viabilidade celular (*Figura 2*). É importante salientar que deve-se terminar a fermentação dentro do limite da máxima concentração de nitrogênio, assim sendo ter-se-á um fermento rico em proteína pela diminuição significativa das reservas, além do ganho em álcool produzido. Este resultado tem grande importância quando da comercialização da levedura seca para fins de suprimento protéico em ração animal ou até mesmo para enriquecimento de certos alimentos consumidos pelo homem e que carecem de proteína. Neste último caso, o manuseio deve ser adequado para que não haja prejuízo à saúde do consumidor.

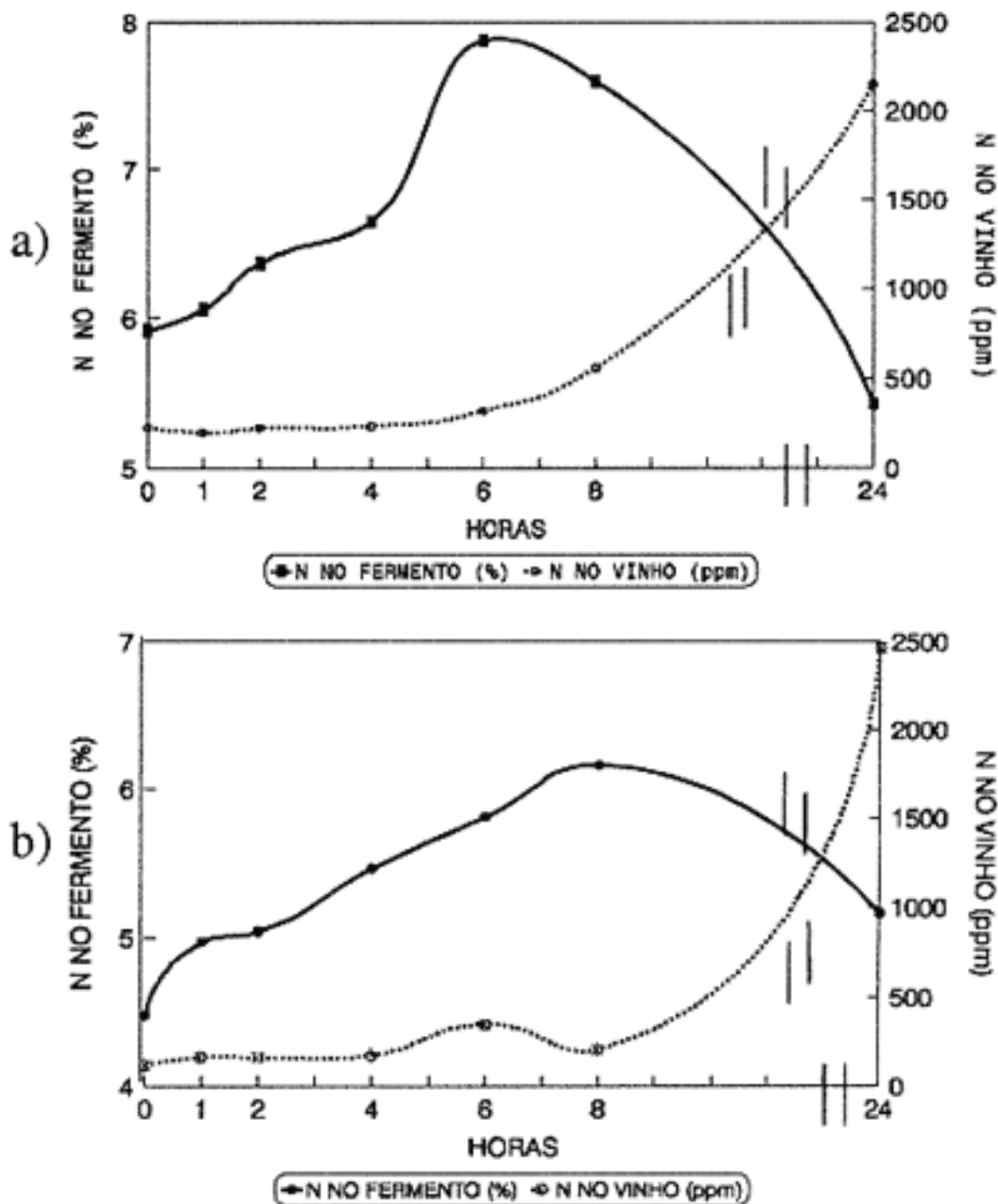


FIGURA 3. Fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* na suspensão de 30% p/v de fermento úmido à temperatura de 40°C. A variação de nitrogênio no fermento e no vinho durante a fermentação, (a) linhagem PE-2 e linhagem VR-1.

O ganho obtido com a fermentação endógena representou 25 e 27% do total da proteína da levedura, respectivamente em linhagem PE-2 e VR-1. Valores considerados representativos observando o aproveitamento referido anteriormente.

4 – CONCLUSÕES

Durante a fermentação endógena das reservas de carboidrato da levedura (trealose e glicogênio) são mobilizadas para produzir álcool até quando for esgotada a trealose ou a viabilidade for comprometida. A cinética de mobilização das mesmas foi diferente entre as duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 e VR-1).

A viabilidade celular variou dependendo do conteúdo de trealose e glicogênio da célula da levedura. Com a presença e mobilização da trealose, a queda da viabilidade foi mais discreta.

Há uma coincidência entre a concentração máxima de álcool na suspensão e de nitrogênio no fermento. O tempo ótimo para terminar a fermentação endógena varia de 6 a 8 horas, de acordo com a linhagem da levedura. Depois desse intervalo acontece a autólise celular com subsequente perda do nitrogênio para o meio.

Com a fermentação endógena nas condições deste ensaio pode ser produzido até 68 litros de álcool por tonelada de levedura seca e com um acréscimo relativo de 30% de proteína no fermento.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. **Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.

[2] AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. Fermentação endógena com a levedura JA-1. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**, n. 14, p. 62-70, 1994.

[3] BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; BERNARDINO, C.D. Fermentação da trealose e do glicogênio endógenos. **Relatório**

anual de pesquisas em fermentação alcoólica, n.13, p. 1-16, 1992.

[4] BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct detection of yeast mutants with reduced viability on plates by erythrosine B staining. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p. 225-230, 1991.

[Medline]

[5] BRADY, T.G.; DUGGAN, P.F.; MCGNAN, C.; TULLY, E. Study of the endogenous fermentation induced in baker's yeast by azide, 2, 4 - dinitrophenol and arsenite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 93, p. 220-230, 1961.

[6] BRIN, M. Tranketalose: clinical aspects. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. Ed. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1966. v. 9, p. 506-514.

[7] CHESTER, V.E. Endogenous metabolism of freshly harvested cells of a Brewer's yeast. **Nature**, London, v. 183, n. 4665, p. 902-903, 1959.

[8] SIGMA. Biochemicals organic compounds for research and diagnostic reagents. St. Louis, 1996. p. 2391.

[9] TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. V. The trehalose content of baker's yeast during an anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, v. 62, n. 2, p.177-183, 1956.

[10] ZAGO, E.A.; SILVA, L. F. L. F.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H. V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: ESALQ - FERMENTEC, 1996. 194 p.

6 – AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela Bolsa de Estudo e a FERMENTEC S/C LTDA, pelo auxílio financeiro ao Projeto; a Usina da Pedra e Santa Elisa, pela cessão de instalações e equipamentos, bem

como calor humano concedido; ao Dep. de Ciência e Tecnologia Agroindustrial ESALQ - USP, pela oportunidade e conhecimentos transmitidos ao longo do curso; ao Dep. Química - Bioquímica ESALQ - USP, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento desse trabalho.

¹ Recebido para publicação em 06/04/98. Aceito para publicação em 01/03/99.

² Departamento de Química, Bioquímica ESALQ-USP.C.P. 09 CEP: 13418-900 Piracicaba - SP.

** A quem a correspondência deve ser enviada.*