

ACÚMULO DE TREALOSE EM LINHAGENS DE *Saccharomyces*
DURANTE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

L.E. Gutierrez*

RESUMO: A pesquisa foi realizada para comparar os efeitos de diversos fatores (temperatura, pH, concentração de sacarose, 2,4-dinitrofenol e fontes de nitrogênio) sobre a produção de trealose em *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 e *Saccharomyces cerevisiae* (M-300-A e de panificação) durante a fermentação alcoólica. Com a levedura IZ-1904 houve menor produção de trealose do que M-300-A e de panificação. A trealose foi formada em maior quantidade ($p < 0,05$) a 34°C. Em pH 4,5 houve maior acúmulo de trealose do que em pH 3,0 para as leveduras M-300-A e de panificação. A adição de 18ppm de 2,4-dinitrofenol acarretou decréscimo ($p < 0,05$) na quantidade de trealose formada pela levedura de panificação e sem efeito para IZ-1904. O aumento da concentração de sacarose ocasionou a maior produção de trealose.

Termos para indexação: trealose, *Saccharomyces*, fermentação alcoólica.

* Departamento de Química da E.S.A. "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - 13.400 - Piracicaba, SP e CEBTEC/FEALQ.

TREHALOSE ACCUMULATION OF STRAINS OF *Saccharomyces* DURING ALCOHOLIC FERMENTATION

ABSTRACT: This study was carried out to compare the effects of several factors (temperature, pH, sucrose concentration, 2,4-dinitrophenol and nitrogen sources) on trehalose production by *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 and *Saccharomyces cerevisiae* (M-300-A and baker's yeast) during alcoholic fermentation. Trehalose production was lower with the yeast LZ-1904 than with M-300-A or baker's yeast. More trehalose was formed at 34°C than at 25°C. For M-300-A and baker's yeast trehalose accumulation was higher at pH 4.5 than at pH 3.0. Addition of 18ppm 2.4-dinitrophenol strongly decreased the amount of trehalose formed by baker's yeast, but was ineffective for IZ-1904. Increase of sucrose concentration led to a higher production of trehalose.

Index terms: Trehalose, *Saccharomyces*, alcoholic fermentation.

INTRODUÇÃO

As leveduras mais utilizadas para a produção de etanol pela via fermentativa no Brasil são *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação), *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A e *Saccharomyces uvarum* IZ-1904, com tudo pouco é conhecido a respeito dos componentes de reserva dessas leveduras.

Trealose é um importante carboidrato de reserva das células vegetativas e esporos de fungos e parece estar associada com períodos de reduzida taxa de crescimento (THEVELEIN, 1984).

É conhecida a importância da trealose para a

manutenção da viabilidade das leveduras (SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961) sendo demonstrado por LILLIE & PRINGLE (1980) que durante prolongado jejum, a sobrevivência da célula da levedura depende do nível de trealose.

Diversos fatores afetam o teor de trealose das leveduras. Condições anaeróbias provocaram redução na quantidade de trealose, sendo que o decréscimo foi mais acentuado quando as leveduras perderam as mitocôndrias (PANEK, 1971). Entretanto, CHESTER & BYRNE (1968) relataram que em meio anaeróbio, quanto maior a concentração de glucose mais glicogênio e trealose foram armazenados, confirmado por PANEK (1975) para trealose. A deficiência de nitrogênio induziu ao acúmulo de trealose em leveduras (KUENZI & FIECHTER, 1972; LILLIE & PRINGLE, 1980) enquanto que TREVELYAN & HARRISON (1956b) relataram que a formação de carboidratos pelas leveduras foi também reduzida por altas concentrações de fosfato. A adição do inibidor 2,4-dinitrofenol provocou redução no teor de trealose (BERKE & ROTHSTEIN, 1957; AMIN *et alii* (1984) enquanto que PANEK (1962) relatou que isoniazida e fluoreto de sódio não afetaram a formação de trealose em condições aeróbias.

O objetivo do presente trabalho foi determinar os teores de trealose nas leveduras mais utilizadas para a produção de etanol em diversas condições de temperatura, concentração de sacarose, pH, fontes de nitrogênio e na presença de inibidor 2,4-dinitrofenol.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

Foram utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A fornecida pelo Departamento de Genética da ESALQ/USP, *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 fornecida pelo Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ/USP e a *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação, Fleischmann). As leveduras foram multiplicadas anaerobiamente

na presença de ácido oleico e ergosterol conforme descrito anteriormente (GUTIERREZ, 1989).

Meio de fermentação

O meio utilizado nos ensaios de fermentação apresentou a seguinte composição por litro sacarose 80 a 160g, K_2HPO_4 1,3g, $MgSO$ 0,9g, $CaCl_2$ 0,16, ácido cítrico 6g, extrato de levedura 2,5 e 5,0g. O pH foi ajustado a 3,0; 4,0 e 4,5 com solução de KOH_45N .

Ensaio de fermentação

80 ml dos meios contidos em frascos cônicos de 125ml foram inoculados com suspensões das leveduras de modo a proporcionar o mesmo número de células inicial (3 a 4×10^7 células/ml) e a quantidade expressa em matéria seca foi de 160mg/100ml para a levedura de panificação, 80mg para IZ-1904 e 120mg para M-300-A. As fermentações foram acompanhadas por pesagens para se determinar o CO_2 produzido e o final da fermentação. Após o final da fermentação, foram feitas determinações da trealose produzida. Foram realizados diversos tratamentos: temperatura ($12 \pm 1^\circ C$, $25 \pm 1^\circ C$ e $34 \pm 1^\circ C$), concentrações de sacarose (8, 11, 14 e 16%) pH (3,0 e 4,5), fontes de nitrogênio, (420ppm de N na forma amoniacal, 420ppm de N na forma de uréia, 0,25% e 0,50% de extrato de levedura) e com 18ppm de 2,4-dinitrofenol.

Trealose

3ml do meio fermentado foram centrifugados durante 5 minutos. O precipitado foi lavado com 8ml de água destilada gelada, centrifugado e tratado com 2ml de ácido tricloroacético 0,5M em banho de gelo durante 1 hora para a extração de trealose. A trealose foi determinada com o reativo de antrona, utilizando glucose como padrão segundo TREVELYAN & HARRISON (1956a e c).

Matéria seca

8ml do meio fermentado foram centrifugados durante 5 minutos, o precipitado lavado com água destilada gelada e transferido para estufa a $100-105^\circ C$ durante 8 horas.

Análise estatística

Foi adotado o delineamento de parcelas subdivididas com 3 repetições segundo GOMES (1970).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os teores de trealose das leveduras estudadas em três temperaturas. A levedura IZ-1904 apresentou menor teor de trealose ($p < 0,05$) do que as demais leveduras sendo que o maior acúmulo foi observado para a levedura M-300-A. Nas três leveduras ocorreu redução ($p < 0,05$) quando a temperatura aumentou de 12 para 25°C e incremento ($p < 0,05$) quando passou de 25 para 34°C. Para as leveduras de panificação e IZ-1904 os maiores teores de trealose ocorreram na temperatura mais elevada (34°C) confirmando observações de GRBA *et alii* (1975). Uma possível explicação para o maior acúmulo a 12 e 34°C poderia ser baseada no crescimento e biossíntese de proteínas. GUTIERREZ (1989) relatou menor produção de material celular a 12 e 34°C quando comparado a 25°C. Segundo PANEK (1962) a trealose é sintetizada quando cessa a síntese de aminoácidos. Também PARADA & ACEVEDO (1983) verificaram redução de RNA das células de leveduras a 35°C. Assim diminuindo o crescimento celular aumenta a síntese de trealose como argumento por THEVELEIN (1984).

O efeito da concentração da sacarose sobre o acúmulo de trealose pode ser observado na Tabela 2. Nas leveduras de panificação e IZ-1904 ocorreram aumento ($p < 0,05$) no acúmulo de trealose com maiores concentrações de sacarose. Na levedura M-300-A ocorreu redução de trealose quando o meio variou de 8 para 11% de sacarose e aumento com 11 para 16% de sacarose. As leveduras M-300-A e de panificação apresentaram os teores mais elevados enquanto que IZ-1904 apresentou os menores teores ($p < 0,05$) em todas as concentrações de sacarose utilizadas.

Segundo PANEK (1971) e GRBA *et alii* (1975) a trealose foi formada em maior quantidade em meio aeróbio, devido a presença de mitocôndrias funcionais. Os valores citados na Tabela 2 foram obtidos em meio anaeróbio e se aproximam dos valores citados por esses autores. Provavelmente as concentrações de sacarose utilizadas no presente trabalho (de 8 a 16%) possibilitaram maior disponibilidade de energia, promovendo o incremento da formação de trealose.

O efeito da concentração de sacarose sobre o acúmulo de trealose poderia também ser explicado pelo aumento da pressão osmótica, pois segundo MACKENZIE *et alii* (1988) o desenvolvimento da resistência a pressão osmótica foi acompanhada pelo acúmulo de trealose.

Na Tabela 3 são apresentados os teores de trealose obtidos em fermentações em pH 3,0 e 4,5. Para as leveduras M-300-A e de panificação ocorreu maior teor ($p < 0,05$) em pH 4,5 do que em pH 3,0 enquanto que fenômeno inverso foi observado para IZ-1904.

Tabela 3. Trealose de três *Saccharomyces* em fermentações com 14% de sacarose, 34°C, 0,5% de extrato de levedura, em dois valores de pH (expresso em g glucose/100g matéria seca)

Leveduras	pH	
	3,0	4,5
M-300-A	6,35	8,88
Panificação	4,78	8,10
IZ-1904	4,33	3,31

d.m.s. 5% (leveduras) = 2,03
c.v. = 14,11%

d.m.s. 5% (DNP) = 0,16
c.v. = 2,61%

Na Tabela 4 são apresentados os teores de trealose sob efeito da adição de 18ppm de 2,4-dinitrofenol (DNP), sendo que o efeito não foi o mesmo para as três

leveduras estudadas. Não houve efeito significativo para a levedura IZ-1904, pequena redução significativa para M-300-A e drástica redução para a levedura de panificação, evidenciando uma maior sensibilidade dessa levedura ao inibidor DNP.

A redução do teor de trealose observada na Tabela 4 confirma trabalhos relatados por BERKE & ROTHSTEIN (1957) e AMIN *et alii* (1984). O inibidor DNP afeta a fosforilação oxidativa realizando o desacoplamento da cadeia respiratória (BRADY *et alii*, 1961). Entretanto, os experimentos do presente trabalho foram conduzidos em condições anaeróbias com elevada concentração de açúcar, condições em que as mitocôndrias estão ausentes (DUNTZE *et alii*, 1969). Assim uma provável explicação para a redução da trealose poderia ser dada pelo efeito estimulante do DNP sobre ATPase conforme verificado por PULLMAN *et alii* (1960) reduzindo assim os níveis de ATP e UTP necessários a biossíntese de trealose.

Tabela 4. Trealose de três *Saccharomyces* em fermentações com 14% de sacarose, 34°C, 0,5% de extrato de levedura, pH 4,0 com adição de 18ppm de DNP (expresso em g glucose/100g de matéria seca)

Leveduras	DNP	
	0	18ppm
M-300-A	8,71	8,06
Panificação	8,18	1,05
IZ-1904	3,67	3,64
d.m.s. 5% (levedura) = 1,35 c.v. 10,11%	d.m.s. 5% (DNP) = 0,12 c.v. = 2,08%	

Aumentando-se a quantidade de extrato de levedura de 0,25 para 0,50% ocorreu redução ($p < 0,05$) no teor

de trealose nas leveduras estudadas (Tabela 5), confirmando observações de KUENZI & FIECHTER (1972) e LILLIE & PRINGLE (1980). Maior acúmulo de trealose foi observado com uréia em comparação ao nitrogênio amoniacal.

Observando-se os resultados obtidos pode-se notar que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A e a de panificação apresentaram teores mais elevados de trealose do que *Saccharomyces uvarum* IZ-1904.

Tabela 5. Trealose de três *Saccharomyces* em fermentações com 14% de sacarose, 34°C, pH 4,0 com quatro fontes de nitrogênio (expresso em g glucose/100g matéria seca).

Leveduras	Fontes de Nitrogênio			
	420ppm N-NH ₄ ⁺	420ppm N uréia	0,25% E.L.	0,5% E.L.
M-300-A	7,24	9,47	10,90	8,84
Panificação	4,51	8,00	10,22	7,73
IZ-1904	2,26	3,48	9,28	4,11

d.m.s. 5%(leveduras) = 0,36

c.v. = 5,51%

d.m.s. 5% (fontes)=0,81

c.v. = 9,22%

E.L.=extrato de levedura

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, G.; STANDAERT, P.; VERACHTERT, H. Effects of metabolic inhibitors on the alcoholic fermentation by several yeasts in batch or in immobilized cell systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlim, 19:91-9, 1984.
- BERKE, H.L. & ROTHSTEIN, A. The metabolism of storage carbohydrates in yeast, studied with glucose-1-C¹⁴

and dinitrophenol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, 72:380-95, 1957.

BRADY, T.G.; DUGGAN, P.F.; MCGANN, 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*, New York, 93:220-30, 1961.

CHESTER, V.E.; BYRNE, M.J. Carbohydrate composition and UDP-glucose concentration in a normal yeast and a mutant deficient in glycogen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, 127:556-62, 1968.

DUNTZE, W.; NEUMANN, D.; GANCEDO, J.; ATZPODIEN, W.; HOLZER, H. Regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, 10(1): 83-9, 1969.

GOMES, F.P. *Curso de Estatística Experimental*, São Paulo, Nobel, 1970. 485p.

GRBA, S.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H. On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. *European Journal of Applied Microbiology*, Berlin, 2:29-37, 1975.

GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo de fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. Piracicaba, 1989. 160p. (Livro-docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

KUENZI, M.T. & FIECHTER, A. Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. *Archives of Microbiology*, Berlin, 84: 254-65, 1972.

LILLIE, S.H. & PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 143:1384-94, 1980.

- MACKENZIE, K.F.; SINGH, K.K.; BROWN, A.D. Water stress plating hypersensitivity of yeasts; protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, London, 134(6):1661-6, 1988.
- PANEK, A.D. Synthesis of trehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, 98:349-65, 1962.
- PANEK, A.D. Energy requirements for trehalose synthesis. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 23(1): 75-9, 1971.
- PANEK, A.D. Metabolismo de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*. Rio de Janeiro, 1975. 115p.(Doutorado-Instituto de Química/Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- PARADA, G. & ACEVEDO, F. On the relation of temperature and RNA content to the specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 25:2785-8, 1983.
- PULLMAN, M.E.; PENEFSKY, H.S.; DATTA, A.; RACKER, G. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 235(11):3322-9, 1960.
- SUOMALAINEN, H. & PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. *Journal of the Institute of Brewing*, London, 67:249-54, 1961.
- THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews*, Washington, 48 (1):42-59, 1984.
- TREVELYAN, W.E. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. *Biochemical Journal*, London, 62:177-83, 1956a.

608 An.ESALQ, Piracicaba, 47(parte 2):597-608, 1990

TREVELYAN, W.E. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. 6. Effects of thiamine on nitrogen assimilation during fermentation and on fermentation kinetics. *Biochemical Journal*, London, 62:183-90, 1956b.

TREVELYAN, W.E. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. 7. Yeast carbohydrate fraction. Separation from nucleic acid, analysis and behaviour during anaerobic fermentation. *Biochemical Journal*, London, 63:23-33, 1956c.

Entregue para publicação em: 27/08/90

Aprovado para publicação em: 20/12/90