



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
AMBIENTAIS**

SÂMELA BEUTINGER CAVALHEIRO

**PRODUÇÃO DE INVERTASE POR CULTIVO SUBMERSO DE
LINHAGEM COMERCIAL DE *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1)**

**DOURADOS
Mato Grosso do Sul - Brasil**

2014

SÂMELA BEUTINGER CAVALHEIRO

**PRODUÇÃO DE INVERTASE POR CULTIVO SUBMERSO DE
LINHAGEM COMERCIAL DE *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito à conclusão do Curso de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade Ciências Biológicas e Ambientais - Universidade Federal da Grande Dourados.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

DOURADOS
Mato Grosso do Sul – Brasil
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C37 6p	<p>Cavalheiro, Sâmelâ Beutinger. Produção de invertase por cultivo submerso de linhagem comercial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1) / Sâmelâ Beutinger Cavalheiro. – Dourados, MS: UFGD, 2014. 21 f. il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite. Monografia (Curso de Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1). 2. Fermentação submersa. 3. Frutofuranosidase. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD – 574.192</p>
-----------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

SÂMELA BEUTINGER CAVALHEIRO

**“PRODUÇÃO DE INVERTASE POR CULTIVO SUBMERSO DE
LINHAGEM COMERCIAL DE *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1)”**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado com requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof^a. Dr^a. Gisele Jane de Jesus
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, 17 de novembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

À minha família, nas orientações e incentivos dados a favor do meu crescimento pessoal e inspiração para alcançar por aquilo que almejo.

Agradeço aos Professores Rodrigo Simões Ribeiro Leite e Marcelo Fossa da Paz, no auxílio nas pesquisas para que fosse possível a conclusão do projeto, e por contribuir para o meu crescimento científico.

À Mestranda Paula Mirella pela atenção, presença e apoio nos experimentos.

À Doutoranda Nayara no acompanhamento do meu desenvolvimento inicial no grupo de pesquisa, assim como auxílio na fase de desenvolvimento do projeto.

À Universidade Federal da Grande Dourados, assim como à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, devido o aprendizado e possível realização do projeto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação da hidrólise da molécula de sacarose.	06
Figura 2: Reação do crescimento respirativo.	09
Figura 3: Reação da fermentação alcoólica.	09
Figura 4: Localização da invertase periplasmática e intracitoplasmática.	10
Figura 5: Produção de invertase em função do tempo de cultivo.	15
Figura 6: Viabilidade celular em função do tempo de cultivo.	16
Figura 7: Biomassa celular (massa úmida) em função do tempo de cultivo.	17
Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos na cinética de crescimento e enzimática.	17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	06 - 07
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	08
2.1 Leveduras e seu Potencial Energético.....	08 - 09
2.2 Invertase e suas Aplicações Biotecnológicas.....	10 - 12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 O Microrganismo e manutenção da linhagem.....	13
3.2 Preparo do inóculo e fermentação submersa.....	13
3.3 Viabilidade celular.....	13
3.4 Massa celular.....	14
3.5 Atividade Enzimática.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15 - 17
5. CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....	19 - 21

RESUMO

O Brasil foi o primeiro a produzir e a exportar o etanol proveniente da cana-de-açúcar. No país, a produção sucroenergética vem crescendo ao longo da década com a fabricação de álcool, um dos fatores-chave para obter produto é a utilização de leveduras que proporcionem maior produção por menor custo. Atualmente, a principal espécie de levedura utilizada pela indústria sucroenergética, é a *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1), que destaca-se na produção de invertase. Dentre seu potencial biológico, ela hidrolisa a ligação glicosídica da sacarose através da invertase e utiliza os monossacarídeos provenientes, para produção de etanol e de energia. A invertase é uma enzima com função hidrolítica que realiza a quebra do substrato sacarose em glicose e frutose. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de invertase intra e extracelular pela levedura *S. cerevisiae* (CAT-1) em cultivo submerso utilizando meio YEPS (extrato de levedura, peptona e sacarose). A linhagem comercial *S. cerevisiae* (CAT-1) foi disponibilizada pela Usina São Fernando Açúcar e Álcool, localizada na cidade de Dourados no estado de Mato Grosso do Sul - MS. A maior produção de invertase extracelular foi de 2,62 U/mL no tempo de 168 h e intracelular de 35,06 U/mL no tempo de 24 h, com viabilidade celular de 6,63% e 93,72%, respectivamente. Foi possível verificar a maior atividade de invertase intracelular, a qual não é liberada para o meio extracelular o que favorece a utilização desta linhagem de leveduras em processos de produção de etanol, contribuindo para redução da contaminação por bactérias lácticas.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1); fermentação submersa; β -frutofuranosidase.

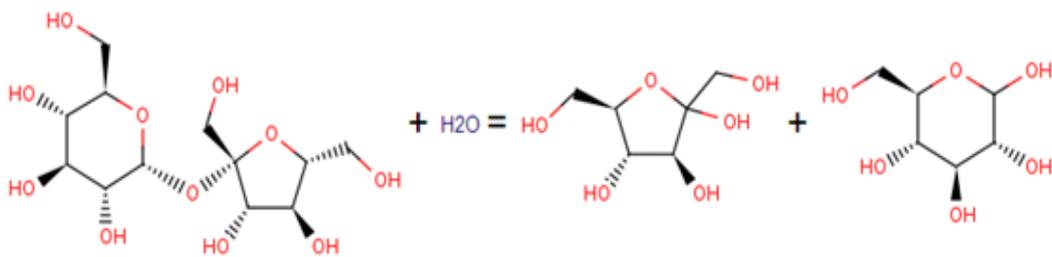
1. INTRODUÇÃO

A invertase (β -frutofuranosidase, E.C.3.2.1.26) é uma enzima produzida principalmente por leveduras, apresenta função hidrolítica sobre a sacarose que obtêm como produto açúcares redutores, glicose e frutose. A enzima é encontrada em elevada quantidade na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A *S. cerevisiae* tem como constituinte celular uma invertase no citoplasma (intracelular) e outra invertase localizada no espaço periplasmático (extracelular).

O substrato específico para a enzima é a sacarose, encontrado em maiores proporções na cana-de-açúcar, cristalizável, mas se transforma em não-cristalizável após sua clivagem em glicose e frutose. Geralmente para se obter invertase, a *S. cerevisiae* (CAT-1) é cultivada em meio de cultura líquido contendo sacarose, e para extração da enzima é necessário o rompimento celular, o que eleva o custo da enzima.

A sacarose é formada por glicose e frutose, para sua metabolização pela levedura, é necessário sua quebra. A hidrólise enzimática realizada pela invertase (Figura 1) tem como principal função quebrar a ligação glicosídica presente na sacarose, sendo que os monossacarídeos liberados podem ser convertidos em ATP e etanol pelas leveduras.

Figura 1: Representação da hidrólise da molécula de sacarose.



Fonte: Brenda Banco de dados [2014]

Nota: Ocorre a liberação de moléculas de glicose e frutose.

O uso de sistemas biológicos vem sendo aprimorado e ampliado nas indústrias, em decorrência da sua menor contaminação ambiental por resíduos químicos, como ocorre na hidrólise ácida, que se atêm ao uso de reagentes químicos para catalisar as reações. Na indústria sucroenergética a produção do etanol ocorre a partir da fermentação da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar. A formação do etanol ocorre através da utilização da hexose glicose ou frutose pelo metabolismo da levedura. Uma das vantagens da produção de

etanol como combustível está na sua obtenção a partir de fontes renováveis, no caso do Brasil a cana-de-açúcar.

No presente trabalho o objetivo foi avaliar a produção de invertase intracelular e extracelular pela linhagem comercial *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1), por fermentação submersa em meio YEPS (extrato de levedura, peptona e sacarose) em função do tempo de cultivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leveduras e seu Potencial Energético

As leveduras são fungos unicelulares que se apresentam na natureza com formatos esféricos, ovais ou cilíndricos e geralmente tem como habitat lugares onde é possível adquirir alimento assimilável do meio. O alimento pode ser encontrado no meio externo geralmente na forma insolúvel. Algumas células possuem a capacidade de produzir enzimas responsáveis pela quebra dos compostos orgânicos, a fim de produzir energia para o seu desenvolvimento (MADIGAM et al., 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

As células leveduriformes apresentam aproximadamente largura de 1 a 5 μm e 5 a 30 μm de comprimento. Estas estão envoltas por uma parede celular quimicamente diferenciada da parede de vegetais, que exerce as mesmas funções de apoio no controle osmótico, proteção física e na formação das células-filhas, garantindo a sobrevivência da levedura. Composta por 80 a 90 % de polissacarídeos dentre eles glucana, manana e quitina, e uma pequena porcentagem de lipídios e proteínas. Os fungos possuem como reserva energética o glicogênio, característica que os assemelham aos animais (CABIB et al., 2001; CECCATO-ANTONINI, 2010; MADIGAM et al., 2010).

A disponibilidade de alimento permite o crescimento da massa celular, assim como a geração de energia (BRAUER et al., 2008; BROACH, 2012). Em algumas cepas de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* a energia provém da quebra de compostos orgânicos que pode ser oxidados tanto por respiração celular, quanto por fermentação alcoólica (CECCATO-ANTONINI, 2010; NELSON; COX, 2011).

A capacidade das leveduras de realizar fermentação alcoólica é amplamente aplicada em processos industriais, além de possuir seu genoma sequenciado, podendo passar por modificações por meio da engenharia genética para apresentar características desejáveis em relação ao processo a ser realizado (GOFFEAU et al., 1996). Segundo o U.S. Food and Drug Administration (FDA, 2013) a *S. cerevisiae* é considerada GRAS (Generally Recognized as Safe) um microrganismo que não apresenta patogenicidade, portanto, atrativo para os estudos e trabalhos visando a obtenção de bebidas e alimentos.

De acordo com Ferreira (1995), o microrganismo *S. cerevisiae* apresenta aerobiose facultativa, o que permite sobreviver tanto na presença quanto na ausência do oxigênio, e descreve as reações de oxidação da glicose também conhecida por crescimento respirativo, assim como a fermentação alcóolica ou fermentação etanólica.

O crescimento respirativo, predominante na presença do oxigênio, ocorre na concentração de glicose inferior a 90-100 mg/L, produzindo energia para a respiração celular. A total quebra da hexose provoca a liberação de CO₂ e H₂O, representada na Figura 2.



A fermentação alcoólica, Figura 3, ocorre quando há alta concentração de glicose ou ausência do oxigênio, com liberação de etanol e CO₂.



A produção de etanol se dá por meio da fermentação alcoólica e metabolização da glicose e frutose pela *S. cerevisiae*. Nesse processo as invertases produzidas pelas leveduras apresentam fundamental importância por converter sacarose em açúcares fermentáveis. A produção mundial de etanol é originada da fermentação de açúcares obtidos de cana-de-açúcar, beterraba e milho. Pode ser produzido em duas principais formas, o álcool anidro, com finalidade de adição à gasolina e o álcool hidratado, usado como biocombustível (VIEIRA; LIMA; BRAGA, 2007).

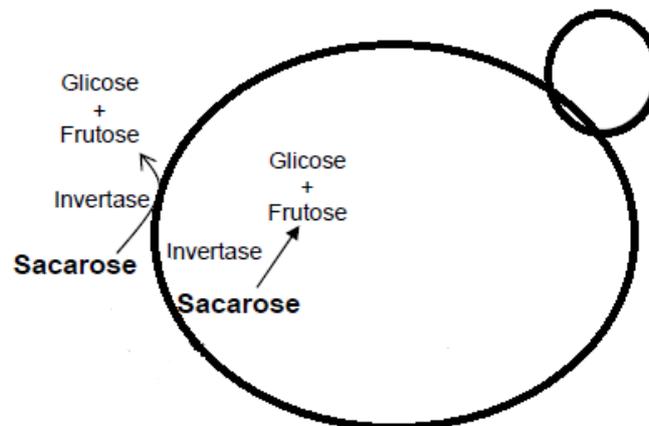
O etanol brasileiro provém da matéria-prima renovável, cana-de-açúcar, devido a possível produção em larga escala e clima favorável. Em comparação com o combustível fóssil, reduz a emissão de monóxido de carbono e substitui o chumbo tetraetila, que antes da adição do etanol, era adicionado à gasolina (NITSCH, 1991). A colocação do Brasil entre os maiores produtores do biocombustível etanol, seguido pela Índia e Austrália se deve, principalmente, ao Programa Nacional do Álcool (Proálcool) criado em 1975 (VIEIRA; LIMA; BRAGA, 2007).

Atualmente no Brasil, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013) estima alta na produção de etanol de 14,94 % na passagem da safra 2012/13 para 2013/14, decorrente do investimento do país no desenvolvimento de tecnologias para a indústria sucroenergética. Para que haja satisfatória produção é levado em conta alguns fatores de produção correspondentes principalmente a qualidade da cana-de-açúcar que deve conter grande quantidade de açúcar, e a linhagem de levedura a ser utilizada. A produção projetada para 2019 de acordo com o Ministério da Agricultura (BRASIL, 2014) é de 58,8 bilhões de litros, mais que o dobro da registrada em 2008.

2.2 Invertase e suas Aplicações Biotecnológicas

A atividade da invertase foi descoberta em 1828, através da fermentação da sacarose na panificação se verificou que a levedura hidrolisava a sacarose em condições fermentáveis. Em 1860 se extraiu de leveduras um precipitado alcoólico, que mais tarde em 1878 foi nomeado de “enzima” por Wilhelm Kuhne. A fonte principal de invertase é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que expressa a invertase periplasmática presente na parede celular e a intracitoplasmática no citoplasma da célula (Figura 4), as quais são essenciais para o seu desempenho e viabilidade celular (BARNETT, 2000; JUNIOR, 2006; VITOLO, 1979).

Figura 4. Localização da invertase periplasmática e intracitoplasmática.



Fonte: Junior (2006), modificada.

Nota: Célula de levedura realizando a hidrólise da sacarose em frutose e glicose através da invertase intracitoplasmática e da periplasmática. Levedura em brotamento.

A invertase é encontrada em maior quantidade nos microrganismos e nas plantas (GUIMARÃES et al., 2007). A invertase extracelular é mais estável estruturalmente e apresentam eficiência na hidrólise da sacarose e absorção dos nutrientes (KOSCHWANEZ; FOSTER; MURRAY, 2013; REDDY et al., 1988). A invertase interna é ativada quando há repressão da expressão da enzima extracelular, que pode ocorrer através da concentração de açúcares ou estresses ambientais (WEBER; ROITSCH, 2000). Para obter as enzimas retidas na célula pode ser realizado o processo de rompimento celular, um dos métodos é através do eficiente rompimento manual com pérolas de vidro com o auxílio de um agitador de tubos (MEDEIROS et al., 2008).

A sacarose é um dissacarídeo formado por glicose e frutose ligados por ligação glicosídica do tipo α, β (1 \rightarrow 2), sendo o principal substrato da enzima invertase, posteriormente à sua hidrólise ocorre a liberação de monossacarídeos possíveis de serem fermentados para produção de álcool, ou até mesmo pode ser aplicado para fins alimentícios como a produção de xarope de glicose e frutose (açúcar invertido) (SAID; PIETRO, 2004).

A formação dos monossacarídeos pela enzima ocorre no Complexo Enzima-Substrato, a conformação da proteína é favorável à ligação do substrato específico, as forças que mantêm a estrutura proteica da enzima também interagem com o substrato na ligação no sítio ativo da enzima. O resultado da biocatálise (Figura 1- pg. 6) é a formação dos monossacarídeos glicose e frutose (BOWSKI et al., 1971; NELSON; COX, 2011).

As invertases apresentam diferentes aplicações industriais, podendo ser utilizadas na elaboração de açúcar invertido (xarope de glicose e frutose), adicionados em alimentos e bebidas devido sua baixa cristalização (SAID; PIETRO, 2004). A sacarose da cana-de-açúcar é facilmente cristalizável, após sua hidrólise enzimática, o potencial de cristalização é expressivamente reduzido. Esta característica é desejável na indústria alimentícia, podendo ser utilizado na produção de confeitos, panificação e na formulação de cremes e geleias (NOVAKI et al., 2010). Os métodos para produção do açúcar invertido podem ser a hidrólise ácida e a enzimática. A ácida devido a grande mudança de pH e temperatura, gera produtos altamente coloridos e resíduos indesejáveis, que devem ser removidos. Na hidrólise enzimática há baixo teor de cinzas, cor e resíduos, apesar de seu maior valor comparado a ácida (RODRIGUES et al., 2000).

Nas indústrias sucroenergéticas, as invertases participam ativamente da produção alcoólica por meio da hidrólise da sacarose, liberando açúcares fermentescíveis, que por sua vez são convertidos a etanol por microrganismos fermentadores (CECCATO-ANTONINI, 2010; SAID; PIETRO, 2004).

De acordo com Silva (2008) a importância econômica da invertase não consiste só na função hidrolítica da enzima, mas também na sua função transferásica, como a produção de frutooligosacarídeos (FOS). Além da atividade hidrolítica, a invertase possui uma atividade transferásica em concentrações acima de 15% de sacarose, podendo ser ideal para a produção de Frutoligosacarídeos, açúcar de baixas calorias, promove uma série de benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol até a sua utilização por diabéticos. O meio de cultivo da levedura para produção de FOS pode ser resíduos de usinas sucroenergética como melaço (50% de açúcar), na usina parte é utilizada para produção de etanol, o excesso se torna

um resíduo, e ao invés de se tornar um efluente com potencial poluente, ele se torna um meio barato para síntese de FOS (SILVA, 2008).

A produção de enzimas microbianas é dada pelo cultivo dos microrganismos em meio sólido ou submerso. Tradicionalmente a produção é realizada por meio da fermentação submersa, devido sua homogeneidade e facilidade no controle dos parâmetros de cultivo. Atualmente, o uso da fermentação em estado sólido foi ampliada, com a aplicação de resíduos agroindustriais, para proporcionar um menor custo da produção em relação ao sistema submerso, no entanto, inúmeros avanços ainda são necessários para conseguir viabilidade operacional neste tipo de cultivo (MANPREET et al., 2005).

As invertases comercializadas são obtidas pela ruptura da célula *S. cerevisiae* o que torna a produção da enzima de alto custo, dessa forma, diferentes trabalhos estudam a produção de invertase buscando baratear o valor final (GOLDBERG, 2008).

Considerando a importância industrial das *S. cerevisiae* e de suas invertases, o presente trabalho avaliou o crescimento celular e a produção de invertases por uma linhagem de *S. cerevisiae* comercial, amplamente utilizada em usinas sucroenergéticas brasileiras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 O Microrganismo e manutenção da linhagem

A linhagem comercial *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) foi cedida pela Usina São Fernando Açúcar e Álcool, localizada na cidade de Dourados no estado de Mato Grosso do Sul - MS. A qual foi utilizada neste trabalho, cultivada em tubos de ensaio com 5 mL de meio inclinado YEPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2% e ágar 2%) incubado a 28°C por 48 horas, posteriormente mantidas a 4°C. Visando manter a viabilidade da linhagem repiques sucessivos a cada 15 dias foram realizados. Os meios de cultura antes de serem inoculados foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 min.

3.2 Preparo do inóculo e fermentação submersa

O inóculo foi realizado em frasco Erlenmayer de 125 mL contendo 20 mL de meio YEPD inclinado, mantido na incubadora a 28°C por 48 horas. Posteriormente ao crescimento microbiano, foi realizado a raspagem da superfície do meio com 30 mL de meio YEPS (extrato de levedura 1%, peptona 2%, sacarose 2% e ágar 2%), onde 2 mL da suspensão foi transferida para cada frasco Erlenmeyer 125 mL contendo 18 mL de YEPS (sem Agar).

A produção de invertase foi realizada por fermentação submersa em 20 mL de meio YEPS. Todos os cultivos foram incubados a 28°C, em agitação orbital de 180 rpm. A cinética de produção enzimática foi realizada em tempos diferentes de cultivo de 0 a 168 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

3.3 Viabilidade celular

A porcentagem de células vivas foi realizada através da coloração com azul de metileno 1% e visualização em microscópio óptico. Os frascos Erlenmeyers foram retirados em seus tempos estabelecidos de cultivo e analisados a partir de 0,5 mL de cultura, 4 mL de solução salina 0,9 % e 0,5 mL de azul de metileno 1%, e observado em 3 campos diferentes na lâmina, em objetiva 40 x do microscópio óptico. Para quantificação foi realizada a contagem das células vivas pelo total de células, para encontrar a porcentagem da viabilidade celular.

3.4 Massa celular

Para determinar a biomassa celular (peso úmido) foi utilizada uma balança analítica. As culturas foram transferidas para tubo de centrifuga de 50 mL, previamente tarado, após a centrifugação (5 min. a 1066 xg), o sobrenadante contendo o extrato enzimático extracelular foi armazenado em falcon de 15 mL no refrigerador a $\pm 4^{\circ}$ C para posterior análise, o corpo de fundo chamado massa celular (enzima intracelular) foi pesado em balança analítica. Após a pesagem a biomassa foi lavada com 5 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e foi novamente centrifugado (5 min. a 1066 xg), descartou o sobrenadante, repetiu 2 x, depois inseriu 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 no corpo de fundo, reservou a $\pm 4^{\circ}$ C para posterior análise.

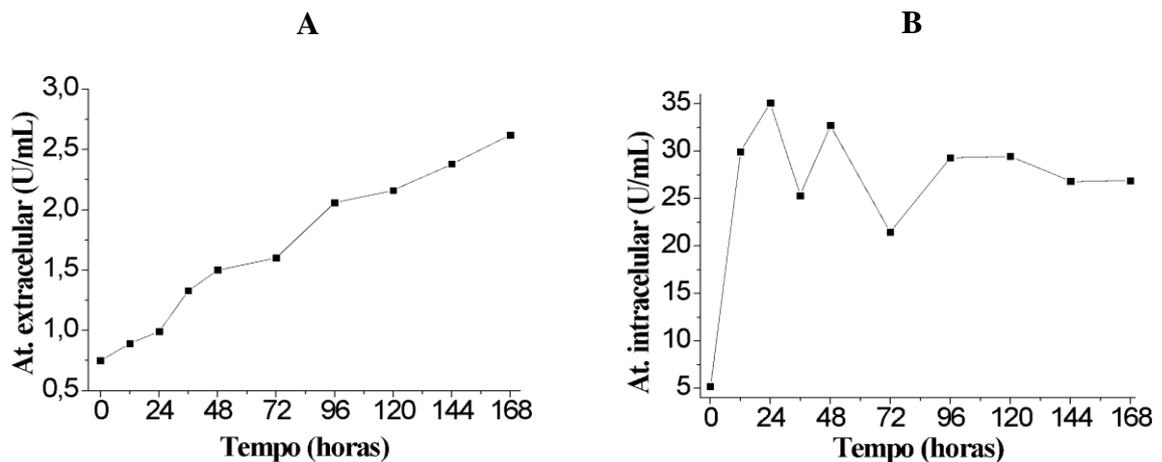
3.5 Atividade Enzimática

Os açúcares redutores foram colorimetricamente quantificados com o método do ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). A atividade de invertase foi determinada com 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0, contendo sacarose 1% como substrato. Após 10 minutos a temperatura de 50°C, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de DNS. A mistura foi deixada em ebulição por 10 minutos e resfriada em banho de gelo, posteriormente foi adicionado 8 mL de água destilada. A quantidade de açúcar redutor liberada foi determinada por espectrofotometria a 540 nm, mediante a curva de calibração de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto de reação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, a produção por fermentação submersa demonstrou maior atividade de invertase intracelular em relação a invertase extracelular, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1). Estudos anteriores relatam a presença de duas invertases em *Saccharomyces cerevisiae*, uma localizada no citoplasma e outra entre a membrana e parede celular (REDDY et al., 1988). O que confirma os resultados obtidos no presente trabalho, onde é possível observar uma reduzida secreção de enzima para o meio extracelular, ficando parte da invertase produzida, aderida à célula da levedura. A figura 5 representa a atividade enzimática realizada pela invertase nos variados tempos de cultivo (0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas), é possível observar a diferença entre a atividade enzimática extracelular e a intracelular.

Figura 5: Produção de invertase em função do tempo de cultivo.



Fonte: Próprio autor.

Nota: Em meio YEPS a 28°C em agitação orbital a 180 rpm.

Legenda: A) Produção de invertase secretada no caldo fermentativo (extracelular). B) Produção de invertase presente na biomassa celular (intracelular).

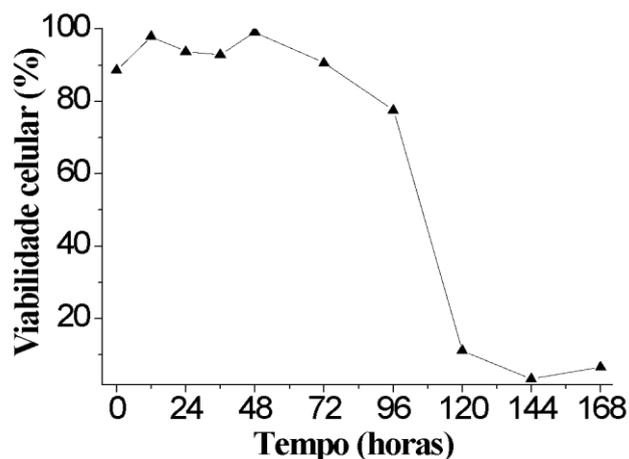
A maior atividade enzimática foi de 35,06 U/mL alcançada no tempo de 24 h na intracelular, apresentando viabilidade e massa celular respectivamente de 93,72 % e 0,5 g. A atividade externa foi de 2,62 U/mL no tempo de 168 h com viabilidade e massa celular correspondentes a 6,63% e 0,63 g. Os valores descritos por Shafiq, Ali e Ikram-ul-Haq (2002, 2003) para a atividade de invertase foi correspondente a 8,35 U/mL e 12,68 U/mL em 48 horas de incubação a 30°C, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CGA-II e GCB-

K5, respectivamente. De acordo com Weber e Roitsch (2000), essa variação pode surgir em decorrência da repressão da expressão da invertase extracelular, que passa a favorecer a ativação da invertase interna. A repressão ocorre devido ao produto formado, glicose e frutose, sinalizando a não necessidade de expressão da enzima. A invertase externa esta sujeita a repressão catabólica por hexoses, o que não acontece com a invertase interna.

A maior porcentagem de células vivas foi alcançada até 96 horas de cultivo, depois houve o declínio da viabilidade (Figura 6). Levando em conta o perfil apresentado, pode ter ocorrido descontrole osmótico, devido o meio externo estar mais concentrado do que o interior da célula, causando a ruptura da célula, ou ainda, a depreciação da qualidade nutricional do meio, acarretando em morte celular.

O aumento da atividade de invertase extracelular em estágios mais tardios de cultivo (Figura 5. A), provavelmente está relacionado com a ruptura celular e o extravasamento do conteúdo celular para o meio de cultivo, e não pela secreção da enzima pela levedura.

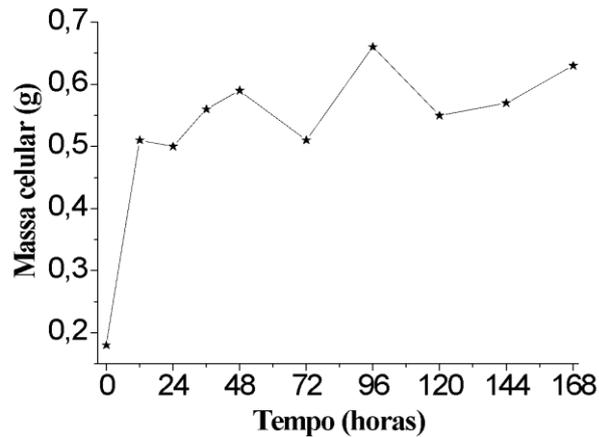
Figura 6: Viabilidade celular em função do tempo de cultivo.



Fonte: Próprio autor.

Nota: Em meio YEPS a 28°C em agitação orbital a 180 rpm.

Apesar da redução da viabilidade celular ocorrer posteriormente a 96 horas de cultivo, não foi possível observar a redução de biomassa nos estágios finais de fermentação (Figura 7). A tendência de estabilização do valor de biomassa pode ser justificado, pelo acúmulo de compostos de reserva pela levedura em condições adversas previamente a morte celular (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Figura 7: Biomassa celular (massa úmida) em função do tempo de cultivo.

Fonte: Próprio autor.

Nota: Em meio YEPS a 28°C em agitação orbital a 180 rpm.

A tabela 1 abaixo representa resumidamente todos os parâmetros obtidos da cinética de crescimento e produção enzimática pelo cultivo da *S. cerevisiae* (CAT-1), discutidos anteriormente no presente trabalho.

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos na cinética de crescimento e enzimática.

Tempo (horas)	Atividade Extracelular (U/mL)	Atividade Intracelular (U/mL)	Viabilidade Celular (%)	Massa Celular (g)
0	0,75	5,02	88,58	0,18
12	0,89	29,94	97,85	0,51
24	0,99	35,06	93,72	0,5
36	1,33	25,3	92,81	0,56
48	1,5	32,72	99,01	0,59
72	1,6	21,46	90,6	0,51
96	2,06	29,27	77,58	0,66
120	2,16	29,43	11,13	0,55
144	2,38	26,8	3,31	0,57
168	2,62	26,88	6,63	0,63

Fonte: Próprio autor.

Nota: Pelo cultivo submerso da linhagem comercial de *S. cerevisiae* (CAT-1) em meio YEPS a 28°C em agitação orbital a 180 rpm.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmam que a linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) apresenta expressiva produção de invertases intracelular e rápido crescimento em meios contendo sacarose, o que faz desta linhagem uma das mais utilizadas para produção de etanol no país. Vale ressaltar que o presente trabalho foi realizado a fim de comparação da linhagem comercial *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) com as linhagens que estão em fase de estudos pelo nosso grupo de pesquisa, isso se deve ao fato desta levedura ser amplamente estudada, podendo ser utilizada como padrão fisiológico adaptado as condições do nosso laboratório, fato que ressalta a importância desta monografia.

REFERÊNCIAS

- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850±1880. **Yeast**: Artigo de revisão, v. 16, n. 8, jun. 2000. p. 755-771.
- BOWSKI, L. et al. Kinetic modeling of the hydrolysis of sucrose by invertase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 13, n. 5, set. 1971. p. 641-656.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura**. Cana-de-açúcar. Brasília, [2014]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 3 mar. 2014.
- BRAUER, M. J. et al. Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 1, jan. 2008. p. 352-367.
- BRENDA: the comprehensive enzyme information system. [Reação da beta-fructofuranosidase]. **Brenda Banco de Dados**. [2014]. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/structure.php?show=reaction&id=94154&type=S&displayType=marvin>>. Acesso em: 25 fev. 2014.
- BROACH, J. R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics: Gene Expression & Metabolism**, v. 192, n. 1, set. 2012. p. 73-105.
- CABIB, E. et al. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, abr. 2001. p. 19679-19682.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias. São Carlos: EdUFSCar, 2010. p. 105. (**Coleção UAB-UFSCar-Tecnologia sulcraolcooleira**)
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Brasil). Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2013/2014. Brasília: **Companhia Nacional de Abastecimento**, [2013]. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2014.
- FERREIRA, E. M. F. C. **Identificação e controlo adaptativo de processos biotecnológicos**. 1995. p. 49. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Porto, Portugal.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, out. 1996. p. 546-567.
- GOLDBERG, S. Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. In. POSCH, A. (Ed.). **2 D PAGE: Simple preparation and fractionation**. v. 1, Totowa, NJ: Humana Press, 2008. Disponível em: <<http://www.docin.com/p-362836308.html>>. Acesso em: 25 jul. 2014.
- GUIMARÃES, L. H. S. et al. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 1, dez. 2007. p. 52-57.

- JUNIOR, O. P. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase**. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- KOSCHWANEZ, J. H.; FOSTER, K. R.; MURRAY, A. W. Improved use of a public good selects for the evolution of undifferentiated multicellularity. **eLife**, abr. 2013.
- MADIGAM, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. n. 12, São Paulo: Artmed, 2010. p. 540-541.
- MANPREET, S. et al. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**: Artigo de revisão, v. 1, n. 2, 2005, p. 1-9.
- MEDEIROS, F. O. et al. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, fev. 2008. 336-339 p.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, mar. 1959. p. 426-428.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. n. 5, Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 195-196.
- NITSCH, M. O programa de biocombustíveis Proálcool no contexto da estratégia energética brasileira. **Revista de Economia Política**, v. 11, n. 2, abr./ jun. 1991.
- NOVAKI, L. et al. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **Engevista**, v. 12, n. 2, dez. 2010. p. 131-140.
- REDDY, V. A. et al. Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. I. n-linked oligosaccharide content of the individual sequons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 15, maio 1988. p. 6978-6985.
- RODRIGUES, M. V. N. et al. Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, abr. 2000.
- SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. n. 1, Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 416.
- SHAFIQ, K; ALI, S.; IKRAM-UL-HAQ. Effect of different mineral nutrients on invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* GCB-K5. **Biotechnology**, v. 1, n. 1, 2002. p. 40-44.
- SHAFIQ, K; ALI, S.; IKRAM-UL-HAQ. Time course study for yeast invertase production by submerged fermentation. **Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 11, 2003. p. 984-988.
- SILVA, C. E. V. **Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melaço de cana-de-açúcar**. 2008. p. 52. Dissertação (Mestre em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. n. 8, Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 336.

U.S FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: Code of Federal Regulations Title 21. **Food and Drug Administration**. Revisado: abr. 2013. Disponível em:
<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.325>>.
Acesso em: 1 abr. 2013.

VIEIRA, M. C. A.; LIMA, J. F. (colab.); BRAGA, N. M. (colab.). Setor sucroalcooleiro brasileiro: evolução e perspectivas. **O Banco Nacional de Desenvolvimento**. 2007.
Disponível em:
<http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta_Expressa/Tipo/Livro/200706_11.html>. Acesso em: 29 nov. 2013.

VITOLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação**. 1979. Dissertação (Mestre em Tecnologia das Fermentações), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

WEBER, H.; ROITSCH, T. Invertases and life beyond sucrose cleavage. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 2, fev. 2000. p. 47-48.