

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

OTAVIO GONÇALVES BENITES MARQUES

ESTUDO FISIOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 EM *RESTING CELL* APÓS CULTIVO EM DIFERENTES CONDIÇÕES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

DOURADOS/MS

JUNHO/2021

OTAVIO GONÇALVES BENITES MARQUES

ESTUDO FISIOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 EM *RESTING CELL* APÓS CULTIVO EM DIFERENTES CONDIÇÕES

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO FOSSA DA PAZ

**COORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO GRACIANO
FONSECA**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título em mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Tecnologia Ambiental.

DOURADOS/MS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M357e Marques, Otavio Goncalves Benites
ESTUDO FISIOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 EM RESTING CELL APÓS CULTIVO EM DIFERENTES CONDIÇÕES [recurso eletrônico] / Otavio Goncalves Benites Marques. -- 2021.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: MARCELO FOSSA DA PAZ.
Coorientador: GUSTAVO GRACIANO FONSECA.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Pulsos. 2. Cinéticas. 3. Invertase. 4. Limitação. I. Paz, Marcelo Fossa Da. II. Fonseca, Gustavo Graciano. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

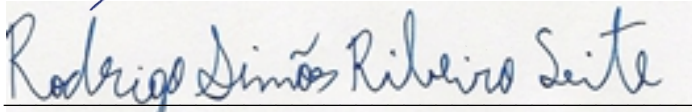
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer **APROVADO**, para a dissertação intitulada: “**Estudo fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em resting cell após cultivo em diferentes condições**”, de autoria de **OTAVIO GONÇALVES BENITES MARQUES**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Alessandro Minilo
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 02 de Junho de 2021.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois mesmo nos momentos de insegurança, dúvidas e dificuldades, a fé me fez continuar.

A minha família, meus pais, Everaldo e Maria Alice, minha fortaleza. Sem o apoio em diferentes aspectos, eu não teria conseguido, amo vocês.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz por aceitar me orientar e confiar no trabalho, sempre se preocupando e se esforçando no que fosse possível para fazer acontecer.

Ao Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pela orientação segura, pelas valiosas dicas, sugestões e “puxões de orelha” necessários, o meu muito obrigado.

Aos meus amigos Alex, Nathanya, Brenda e Lucas, que estiveram presentes comigo desde o início dessa caminhada acadêmica e que seguem até hoje, nos bons e maus momentos, me incentivando e me animando todos os dias. Admiro todos vocês.

Agradeço a Cinthia e Valkirea, integrantes do Grupo de Bioengenharia (BIOENG) e amigas de laboratório que contribuíram muito para realização deste trabalho e que eu levarei para toda a vida.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A UFGD e ao Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela formação.

A todos que indiretamente contribuíram para realização do trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ensaio das concentrações da fonte de nitrogênio para estabelecimento da condição de *Resting cells*. 17
- Figura 2.** Cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em células em repouso com pulsos após 12 h de cultivo. 19

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Produção de metabólitos ($C\text{-mol}^{-1}$) e Carbono recuperado (%) dos pulsos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 em células em repouso. | 20 |
| Tabela 2. Atividade de invertase (U/mL^{-1}) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 após os pulsos em Resting Cells. | 24 |

RESUMO

A utilização de microrganismos para obtenção de produtos e serviços é uma prática milenar usada de forma empírica desde os primórdios da sociedade. Estudos sobre metabolismo celular são de suma importância para uma melhor compreensão bioquímica e para o estabelecimento de condições de cultivo apropriadas para a obtenção de bioprodutos de interesse através de “fábricas celulares”. O objetivo buscado com este trabalho foi avaliar a fisiologia de células em repouso (*resting cells*) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 após pulsos de fontes de carbono e de nitrogênio. Utilizou-se meio de mineral M9 com adaptações e uma limitação de fonte de nitrogênio para estabelecimento do estado de repouso. Estudos cinéticos para obtenção de consumos de substratos e produção de metabólitos secundários foram realizados em microculturas utilizando-se uma leitora de microplacas e posteriormente avaliados em cromatógrafo HPLC. Posterior análise enzimática foi realizada também em microculturas para avaliação da atividade de invertase no meio, frente aos pulsos de sacarose. A utilização de uma menor concentração de fonte de nitrogênio (0,25 mM de NH_4Cl) permitiu o estabelecimento da melhor condição de repouso (curva com 0,5 de densidade óptica) para realização dos pulsos. Após estes, o crescimento foi restabelecido na condição de 0,1% de sacarose com aumento da biomassa chegando a valores de 0,764 de absorbância, entretanto sem aumento da produção de etanol. Uma segunda condição limitante foi observada no tratamento com adição da fonte de nitrogênio sem carbono, onde a ausência dessa segunda fonte pode ter afetado o crescimento celular e até mesmo o mecanismo de glicólise. Além das variações de consumo de substrato e produção de metabólitos, a atividade de invertase também foi medida durante o período de repouso e após os pulsos. Resultados indicaram presença da atividade enzimática ($2,11 \text{ U mL}^{-1}$) no exato momento em que foi adicionado sacarose ao meio, indicando a natureza constitutiva da enzima. Embora o objetivo do trabalho tenha sido alcançado, existe a necessidade de estudos complementares para melhor entendimento com relação ao comportamento metabólico em resposta a essas perturbações.

Palavras-chave: Pulsos; Cinéticas; Invertase; Limitação.

ABSTRACT

The use of microorganisms to obtain products and services is an ancient practice that has been used empirically since the beginning of the society. Studies on cell metabolism are of paramount importance for a better biochemical understanding and for the establishment of appropriate cultivation conditions for obtaining bioproducts of interest through “cell factories”. The aim of this work was to evaluate the physiology of resting cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 after carbon and nitrogen pulses. M9 mineral medium with adaptations and a nitrogen source limitation were utilized to establish the resting cells state. Kinetic studies to substrate consumption and secondary metabolites production were performed in microcultures using a microplate reader and posteriorly were evaluated in HPLC chromatography. The use of a lower concentration of nitrogen source (0,25 mM de NH_4Cl) allowed the establishment of the best resting condition (0.5 optical density curve) to carry out the pulses. After these, growth was restored at the sucrose 0,1% condition with increase of biomass reaching absorbance values of 0.764, however there was no increase in the ethanol production. A second limiting condition was observed in the treatment with the addition of the nitrogen source in the absence of the carbon source, which may have affected cell growth and even the mechanism of glycolysis. In addition to variations in substrate consumption and metabolite production, invertase activity was also measured during the resting period and after the pulses. Results indicated presence of enzymatic activity ($2,11 \text{ U mL}^{-1}$) at the exact moment of the sucrose addition in the medium, explaining the constitutive nature of the enzyme. Although the aim of this work had been reached, there is a necessity of additional studies to better understanding the metabolic behavior in response to these disturbances.

Keywords: Pulses; Kinetics; Invertase; Limitation.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2. OBJETIVOS..... | 12 |
| 2.1. Objetivo geral | 12 |
| 2.2. Objetivos específicos | 12 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 13 |
| 3.1. Manutenção do microrganismo | 13 |
| 3.2. Meios minerais para pré-cultivo e cultivo principal | 13 |
| 3.3. Cultivos e pulsos de fonte de carbono e nitrogênio em células em repouso | 13 |
| 3.4. Consumo da fonte de carbono, produção de metabólitos e balanço de carbono | 14 |
| 3.5. Determinação da atividade de invertase | 15 |
| 3.6. Análise estatística | 15 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 16 |
| 4.1. Concentração da fonte de nitrogênio para estabelecimento da condição de repouso celular..... | 16 |
| 4.2. Pulsos em células em repouso | 18 |
| 4.3. Atividade de invertase em células em repouso..... | 23 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 25 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 26 |
| 7. REFERÊNCIAS | 27 |
| 8. APÊNDICE | 31 |

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos para obtenção de produtos e em processos industriais é uma prática biotecnológica de grande impacto em nossas vidas (Taylor, 2001). Esses organismos são como “fábricas celulares”, com potencial industrial para *e.g.* a produção de ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas recombinantes, moléculas farmacológicas e biocombustíveis, entre outros, o que ao mesmo tempo requer uma maior eficiência de produção e amplo conhecimento sobre seus processos fisiológicos (Peebo e Neubauer, 2018). Para que isso ocorra, alguns parâmetros são indispensáveis, como: alto rendimento, alta produtividade, estabilidade no processo, tolerância à toxicidade causada por metabólitos produzidos, entre outros (Liu et al., 2010).

No entanto, algumas limitações como a escassez de conhecimento sobre os metabólitos microbianos, acúmulo de moléculas tóxicas ao próprio organismo e consequente diminuição da viabilidade celular são barreiras a serem enfrentadas pela falta de uma abrangente compreensão acerca da fisiologia microbiana (Liu et al., 2010; Mosier et al., 2013).

Buscas pelo conhecimento sobre como ocorrem as interações fisiológicas destes microrganismos são necessárias para superar estas dificuldades e melhorar os processos biológicos relacionados. Dentre os métodos existentes para o estudo fisiológico celular, podem ser utilizadas culturas com meios de cultivo em frascos ou biorreatores, no qual são avaliados a taxa de crescimento e o consumo de substratos específicos, entre outros parâmetros (Elias et al., 2008, 2005). Segundo estes autores, de acordo com a capacidade de adaptação de alguns organismos à mudança ambiental, existem modos de cultivos que podem favorecer estudos “ômicos” de acordo com a resposta da exposição dessas culturas à variação do meio de cultivo (limitação de nitrogênio, carbono) conhecido como cultivos em quimiostase ou células em repouso (*resting cells*).

Cultivos com células em repouso são caracterizados pela não multiplicação celular, obtida geralmente pela manutenção das mesmas sob condições de estresse, como por exemplo a limitação da fonte de nitrogênio (Fontes et al., 2008). Esse modo de cultivo pode ser utilizado como biocatalisador eficiente para produção de biossurfactantes e expressão de proteínas em organismos recombinantes (Zehentgruber et al., 2010), uma vez que toda e qualquer expressão metabólica nesse modo de cultivo se deva exclusivamente ao objetivo em questão. A utilização deste método de cultivo é de certo modo interessante e vem sendo implementada frequentemente para estudos metabólicos,

uma vez que devido ao estado de estabilidade das células, qualquer interação seja por meio de produção de metabólitos, variação transcricional ou consumo de substratos, tem como resultado os testes dirigidos em questão (Iwasaki et al., 2010).

Devido à capacidade quase instantânea dos microrganismos de se adaptarem às mudanças ambientais, a utilização de pulsos e a avaliação das interações metabólicas em resposta a essa perturbação pode ser interessante na utilização como modelo para desenvolvimento de métodos para estudo fisiológico (Kresnowati et al., 2008).

Neste estudo, foram realizadas cinéticas de crescimento em *Resting Cells* com pulsos de fonte de carbono e nitrogênio em diferentes condições, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 para avaliação do método de cultivo como modelo para estudo fisiológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral foi estudar a fisiologia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em condição de repouso.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o modo de estudo fisiológico para células em repouso utilizando *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 como organismo modelo;
- Estabelecer a concentração ideal da fonte de nitrogênio em meio de cultivo M9 para a condição de estudo;
- Realizar pulsos de fonte de carbono e nitrogênio a fim de promover uma perturbação ambiental e observar os possíveis efeitos ao microrganismo;
- Determinar o crescimento de células, o consumo de substratos e a produção de metabólitos antes e após os pulsos;
- Quantificar a atividade da enzima invertase antes e após os pulsos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção do microrganismo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 utilizada nos experimentos foi mantida em glicerol 20 % (m/v) a -80 °C (Fonseca et al., 2013). Para o cultivo, 1 mL de alíquota estoque foi crescida em meio líquido YPD (extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹ e ágar 20 g L⁻¹) e para a realização dos experimentos foram realizados repiques em cultivos sólidos com meio YPD e incubados a 30 °C.

3.2. Meios minerais para pré-cultivo e cultivo principal

Para realização dos experimentos com células em repouso (*resting cells*) foi utilizado o meio mineral M9 com adaptações (Emmerling et al., 2002)

Os meios de pré-inóculo e o inóculo principal foram preparados a partir de uma solução de: 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,5 g L⁻¹ NaCl; 5,3 g L⁻¹ Na₂HPO₄; 3 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,011 g L⁻¹ CaCl₂; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄ diluídos em 806 mL de água destilada. O meio de cultivo principal sofreu alteração na composição da solução de sais, ao qual passou-se a utilizar 0,025 g L⁻¹ de NH₄Cl como fonte de nitrogênio enquanto no pré-inóculo, utilizou-se 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄.

Em ambos os meios foram adicionados 10 mL de solução traço (filtrada) preparada nas seguintes concentrações: 16,67 g L⁻¹ FeCl₃ 6H₂O; 0,18 g L⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O; 0,12 g L⁻¹ CuCl₂ 2H₂O; 0,12 g L⁻¹ MnSO₄ H₂O; 0,18 g L⁻¹ CaCl₂ 6H₂O; 22,25 g L⁻¹ Na₂EDTA 2H₂O. Além da solução traço, 4 mL de uma solução de 0,1 g L⁻¹ de cloridrato de tiamina foi adicionada a ambos os meios, além de glicose como fonte de carbono na concentração de 10 g L⁻¹ numa solução contendo 180 mL de água destilada.

3.3. Cultivos e pulsos de fonte de carbono e nitrogênio em células em repouso

Foram realizados pré-inóculos, no qual as leveduras foram transferidas por meio de três alçadas a partir do meio sólido (YPD) para frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio mineral e fonte de carbono (Emmerling et al., 2002). Os pré cultivos foram conduzidos para incubadoras com agitação orbital em 200 rpm a 30 °C por aproximadamente 12 h.

Em todos os ensaios, a alíquota necessária para o começo da cinética foi concentrada centrifugando-se a amostra à 3.260 x g para que a densidade óptica à 600 nm (DO_{600}) inicial fosse 0,2, resultando assim, numa concentração inicial de células maior sem que houvesse a necessidade do aumento da alíquota em volume para o inóculo principal.

O inóculo principal ocorreu em microplacas de 96 poços. Cada poço possuía 100 μ L de meio, 25 μ L de fonte de carbono e inóculo de aproximadamente 40 μ L de células concentradas totalizando 165 μ L no poço.

Após inoculação, as placas foram dispostas sobre agitação linear utilizando uma leitora de microplacas (Biochrom Anthos Zenyth 200 rt) com temperatura constante de 30 °C e leituras da DO_{600} a cada 30 min. (método adaptado de Nielsen et al., 2017).

Alcançada a condição fisiológica desejada (células em repouso) na décima segunda hora de cultivo, foram induzidos os pulsos de sacarose nas concentrações de 0,1 e 1% no volume de 50 μ L e fonte de nitrogênio $(NH_4)_2SO_4$ nas concentrações de 1 e 10 mM no volume de 50 μ L. Amostras foram armazenadas em gelo e metanol em baixa temperatura para parada total do metabolismo (Prasad Maharjan and Ferenci, 2003) nos tempos de 0, 5, 10 e 30 min. após os pulsos.

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e divididos em dois grupos: um grupo para análise de metabólitos e outro para análise enzimática.

3.4. Consumo da fonte de carbono, produção de metabólitos e balanço de carbono

Para determinação do consumo da fonte de carbono e produção de metabólitos, os sobrenadantes retirados foram submetidos a análise em cromatografia líquida de ultra eficiência, utilizando um HPLC Agilent 1290 em uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm). A corrida foi realizada de maneira isocrática, utilizando água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) a 0,005 M como fase móvel e uma vazão de 0,6 mL x min⁻¹. Estes compostos foram detectados utilizando um RID (detector refratômetro diferencial), ligado a um módulo de aquisição de dados.

O balanço de carbono foi resultado da quantificação e soma dos metabólitos e biomassa produzidos em razão do consumo de açúcar do cultivo. Ao final, todos os resultados obtidos foram convertidos em C-mol (carbomol).

3.5. Determinação da atividade de invertase

Os cultivos foram realizados em microplacas com volume total de 200 μ L por poço. Foram separados 4 poços de cada tratamento para avaliação da atividade enzimática. As análises para realização desse ensaio foram realizadas com a suspensão celular, amostras não foram centrifugadas para lise celular devido ao baixo volume das mesmas. A composição da reação foi 0,9 mL de tampão acetato de sódio a 0,1 M com pH 5 e 1% de sacarose, juntamente com 0,1 mL da solução celular (adaptado de Barbosa et al., 2018). Para a reação, a mistura foi incubada em banho-maria a 50 °C por 10 min. Após passado o tempo necessário para reação, a mesma foi interrompida pela adição de 1 mL de DNS (ácido- 3,5-dinitrosalicílico) e 8 mL de água destilada. A solução foi então fervida em banho de ebulição e o açúcar redutor (produto final da reação) foi quantificado por espectrofotometria a 540 nm conforme método de DNS (Miller, 1959). Uma curva padrão foi feita previamente para determinação da atividade.

3.6. Análise estatística

Para a análise estatística descritiva e a análise de variância, utilizou-se o programa Microsoft Office Excel 2016. Foi aplicado o teste de comparação de médias de Tukey à 5% de significância para a comparação dos diferentes tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

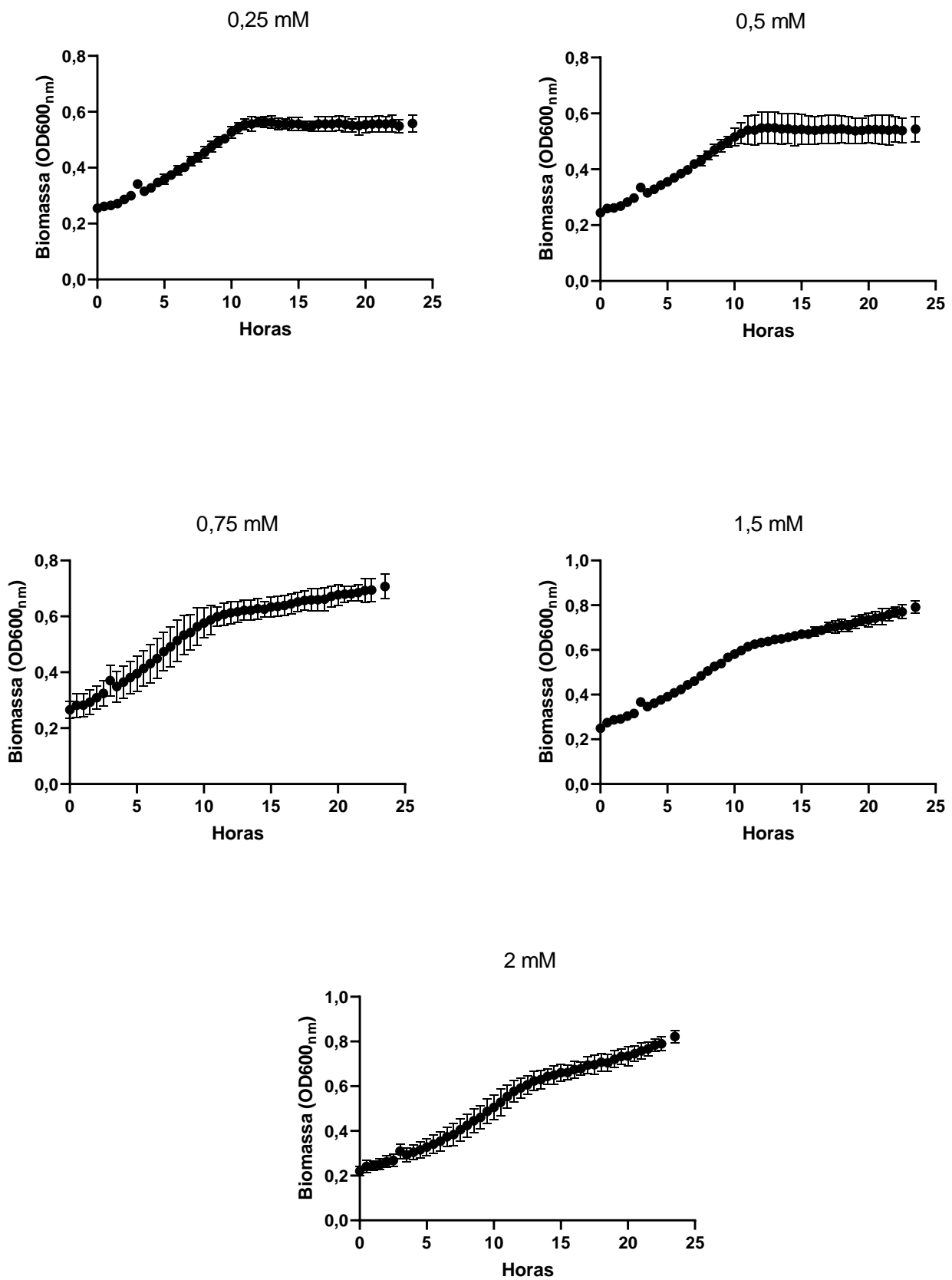
4.1. Concentração da fonte de nitrogênio para estabelecimento da condição de repouso celular

Os resultados obtidos para alcance da condição proposta são apresentados na Figura 1. Ensaios foram realizados em meio de cultivo M9 proposto por Emmerling et al., 2000. Estudos realizados pelo mesmo demonstram que o meio utilizado foi responsável para atingir a condição de células em repouso em bactérias. No entanto, com a utilização de outro modelo biológico, experimentos variando a concentração do nutriente limitante para obtenção do estado fisiológico foram necessários.

A utilização da fonte nas suas menores concentrações (0,25 e 0,5 mM de NH_4Cl) foram ideais para obtenção do estado estável de células em repouso em aproximadamente 12 h de cultivo, alcançando 0,5 de densidade óptica, entretanto devido a maior confiabilidade quando avaliado os desvios padrão entre os dois ensaios, a concentração 0,25 foi escolhida para condução dos posteriores ensaios. De acordo com os resultados apresentados, pôde-se concluir que a entrada do organismo neste estado foi inversamente proporcional à disponibilidade da fonte de nitrogênio, assim como foi observado que em maiores concentrações do NH_4Cl (0,75 mM; 1,5 mM; 2 mM) as células continuaram em constante crescimento. Em concentrações maiores que 0,5 mM do nutriente limitante foi possível observar que o microrganismo não entrou na condição de repouso, continuando lentamente o seu crescimento em relação à menor concentração (Figura 1).

Uma vez que as concentrações dos nutrientes são insuficientes para manter o ciclo celular e o crescimento constante, alguns organismos têm a capacidade de adentrar uma fase estacionária, suportando assim a condição de estresse do ambiente ao qual está inserido (Navarro Llorens et al., 2010). Devido às condições ambientais, à inibidores de crescimento ou à escassez de nutrientes, as células de leveduras saem de sua fase mitótica entrando em um tipo de repouso mal definido, obtendo como características a redução substancial da tradução, perfil específico de transcrição, espessamento da parede celular e consequente melhoria na resistência à pressão osmótica, além de uma maior presença de carboidratos de armazenamento (Klosinska et al., 2011).

Figura 1. Ensaio das concentrações da fonte de nitrogênio NH_4Cl para estabelecimento da condição de Resting cells.



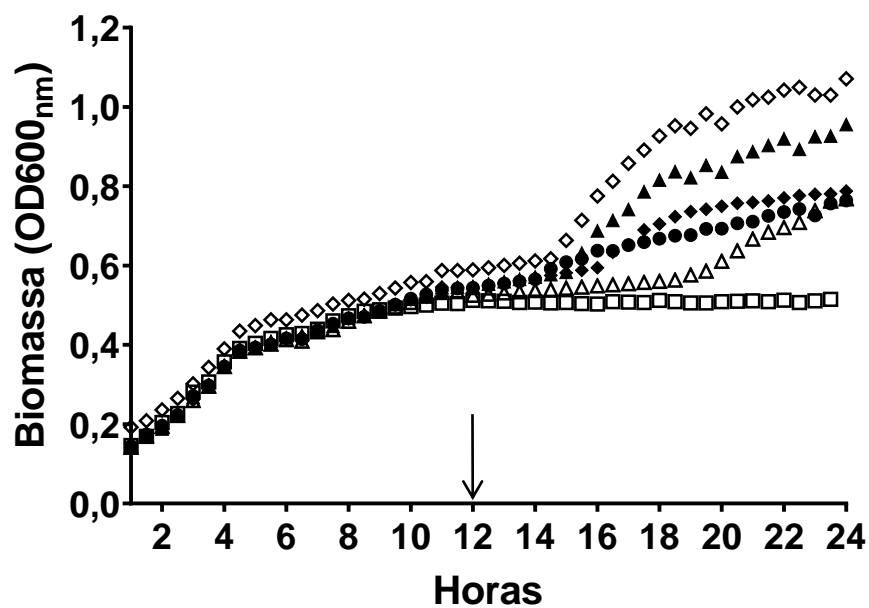
Foi reportado que quando o nutriente se trata de uma fonte nitrogênio utilizada em baixa concentração, as células mantêm sua viabilidade, sendo assim possível estudos sem o comprometimento do cultivo. Além disso, a disponibilidade desse nitrogênio assimilável é o fator responsável pela modulação da morte celular associado com esta limitação nutritiva (Duc et al., 2017).

(Brauer et al., 2008) relatam que quando o nitrogênio é limitante, as células de levedura desaceleram seu crescimento, primeiramente através da diminuição do seu mecanismo de tradução, aumentando assim a duração da sua fase G1 do ciclo celular. Em contraposto, as células quando submetidas a concentrações mínimas ou esgotantes de nitrogênio limitante (0,25 e 0,5 mM) foram capazes de entrar num estado estável, onde não foi observado o aumento de biomassa celular no meio. Isto ocorreu porque quando há o esgotamento do nitrogênio, mesmo com a disponibilidade e excesso dos demais nutrientes, as células param seu crescimento e entram num estado de repouso nitrogênio-específico (Broach, 2012).

4.2. Pulsos em células em repouso

Após determinada a concentração ideal da fonte limitante de nitrogênio para estabelecimento da condição de células em repouso, foram realizados testes visando validar o potencial e o uso do estado para estudos fisiológicos. Foi possível observar que quando em pulso com sacarose a 0,1% como fonte de carbono, *S. cerevisiae* CAT-1 foi capaz de restabelecer sua condição de crescimento normal (Figura 2). Isto indica a saída de seu estágio fisiológico estável devido à presença de fonte de nitrogênio residual no meio. No presente trabalho isto ocorreu devido a hidrólise da sacarose utilizada no pulso, o que explica o aumento da biomassa com absorvância de 0,764, uma vez que o aumento repentino na concentração de glicose no meio leva ao aumento de captação de glicose (Kresnowati et al., 2008).

Figura 2. Cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em células em repouso com pulsos após 12h de cultivo.



Legenda: Quadrado vazio, sem pulso; Círculo preenchido, sacarose 0,1%; Triângulo preenchido, sacarose 1%; Triângulo vazio, 10 mM de Fonte de nitrogênio; Losango preenchido, Sacarose 0,1% + 1 mM de fonte de nitrogênio; Losango vazio, Sacarose 1% + 10 mM de fonte de nitrogênio. A(s) seta(s) indica(m) o momento de pulso(s).

Tabela 1. Produção de metabólitos (C-mol⁻¹) e Carbono recuperado (%) dos pulsos em *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em células em repouso.

| PULSOS | Açúcares totais* (C-mol ⁻¹) | Biomassa formada** (C-mol ⁻¹) | Ácido Acético (C-mol ⁻¹) | Glicerol (C-mol ⁻¹) | Etanol (C-mol ⁻¹) | Balanco de Carbono (%) |
|---|---|---|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Sacarose 0,1% (T0 min.) | 0,15 ^C | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| T5 min. | 0,50 ^C | 0,004 ^B | 0 | 0 | 0,05 ^B | 92,9 |
| T10 min. | 0,45 ^C | 0,009 ^C | 0,02 ^E | 0 | 0,15 ^C | 97,3 |
| T30 min. | 0,34 ^C | 0,014 ^C | 0,04 ^E | 0,01 ^E | 0,34 ^C | 97,3 |
| Sacarose 1% (T0 min.) | 0,18 ^B | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| T5 min. | 3,90 ^B | 0,001 ^C | 0,17 ^A | 0,03 ^A | 0,13 ^A | 93,3 |
| T10 min. | 3,61 ^B | 0,021 ^A | 0,09 ^B | 0,06 ^A | 0,50 ^A | 90,9 |
| T30 min. | 2,79 ^B | 0,029 ^A | 0,05 ^C | 0,26 ^A | 1,23 ^A | 91,2 |
| 10 mM (NH₄)₂SO₄ (T0 min.) | 0,20 ^A | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| T5 min. | 0,09 ^E | 0,001 ^C | 0,06 ^C | 0,03 ^A | 0,01 ^C | 101,1 |
| T10 min. | 0,04 ^E | 0,003 ^D | 0,05 ^D | 0,07 ^A | 0,02 ^E | 95,4 |
| T30 min. | 0,02 ^D | 0,005 ^D | 0,04 ^D | 0,10 ^D | 0,02 ^E | 99,7 |
| 0,1% Sac + 1 mM (NH₄)₂SO₄ (T0 min.) | 0,20 ^A | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| T5 min. | 0,42 ^D | 0,004 ^B | 0,05 ^D | 0,11 ^A | 0,01 ^C | 101,0 |
| T10 min. | 0,37 ^D | 0,009 ^C | 0,06 ^C | 0,12 ^A | 0,02 ^D | 96,5 |
| T30 min. | 0,32 ^C | 0,014 ^C | 0,09 ^B | 0,12 ^C | 0,04 ^D | 97,9 |
| 1% Sac + 10 mM (NH₄)₂SO₄ (T0 min.) | 0,20 ^A | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| T5 min. | 4,03 ^A | 0,009 ^A | 0,08 ^B | 0,08 ^A | 0,06 ^B | 97,3 |
| T10 min. | 3,71 ^A | 0,014 ^B | 0,13 ^A | 0,12 ^A | 0,27 ^B | 92,4 |
| T30 min. | 3,41 ^A | 0,019 ^B | 0,27 ^A | 0,19 ^B | 0,40 ^B | 98,4 |

* Letras maiúsculas iguais indicam que, não há diferença estatística entre os tempos equivalentes dos pulsos.

No pulso de 1% de sacarose como fonte de carbono também houve perda da condição de estado estável das células em repouso, onde a biomassa do cultivo alcançou valores de absorvância de 0,9 no seu tempo máximo de crescimento. Além de ter ocorrido um aumento na produção de biomassa e consequente presença de açúcares residuais no pulso de 1% de sacarose, quando comparado ao de 0,1%, houve aumento expressivo na produção de etanol, pois ambos os pulsos revelaram valores de 1,23 e 0,34 C-mol⁻¹ de etanol, respectivamente (Tabela 1). Pode-se concluir, posto que na condição de 1% de fonte de carbono favoreceu um acúmulo maior de células, que possivelmente a limitação de nitrogênio do cultivo inicial necessária para obtenção do estado fisiológico, não tenha tido efeito direto na produção de etanol. Apesar desta diferença na produção de etanol, de acordo com trabalhos prévios, esse fenômeno não deve ser associado com a condição de nutriente limitante sendo esse aumento, possivelmente, devido a presença de uma maior concentração de fonte de carbono no meio (Fonseca et al., 2013). Foi demonstrado que, em linhagens diferentes da *S. cerevisiae*, mesmo na presença de maiores concentrações da fonte de carbono, apesar da formação de etanol não ser afetada pela limitação de outros nutrientes presentes no meio, há um impacto direto no rendimento de biomassa (Fonseca et al., 2013, 2007), como demonstrado nos valores de 0,029 e 0,014 C-mol⁻¹ para os tratamentos de 0,1 e 1% de sacarose, respectivamente.

Em relação à biomassa foi possível observar que em ambas as concentrações, a partir das 15 h de cultivo, houve maior crescimento nos tratamentos que continham nitrogênio. Em sacarose a 0,1% contendo 1 mM de fonte de nitrogênio associado foi possível observar uma pequena atenuação em relação ao mesmo tratamento com sacarose, porém com a ausência da fonte de nitrogênio (Figura 2). (Bell and Henschke, 2005) apontam a limitação do nitrogênio como um dos principais motivos para lentidão e/ou parada da fermentação, devido a amônia ser a fonte de nitrogênio preferida da levedura e, quando em quantidade adequada, reprime a expressão de vias catabólicas que usam outros compostos nitrogenados (Boeckstaens et al., 2007) sendo assim, aumentando os níveis de nitrogênio no meio, é possível alcançar maiores taxas de crescimento de biomassa (Gutiérrez et al., 2012) como observado nos resultados acima apresentados. Não houve influência direta entre as concentrações da fonte de nitrogênio no estabelecimento da condição de células em repouso e os rendimentos fermentativos. Isso é explicado por Airoidi et al., 2016, que afirmaram que a limitação da fase exponencial é indiferente à fonte de nitrogênio utilizada pois o controle genético apresenta o mesmo padrão.

Comparando as condições nas quais foram pulsados 0,1% da fonte de carbono, embora os valores não apresentem diferença estatística, foi observado uma absorção mais rápida dos açúcares nos três tempos posteriores ao pulso (5, 10 e 30 min.) com fonte de nitrogênio presente, sendo então os valores de 0,50; 0,45 e 0,34 C-mol⁻¹ para a condição sem o pulso de sulfato de amônia e 0,42; 0,37 e 0,32 C-mol⁻¹ para o tratamento com o nitrogênio presente. A explicação para esse fenômeno foi feita por Yue et al., 2012, que sugeriram que a fonte de nitrogênio presente na fase de crescimento exponencial e fase estacionária pode potencializar o sistema de glicólise e também a síntese enzimática justamente devido a presença de nitrogênio abundante, além de evitar a formação de subprodutos e aumentar o rendimento de etanol para leveduras como *S. cerevisiae*.

Tal como nos outros resultados obtidos, o perfil de crescimento pulsado com 10 mM de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio sem fonte de carbono aliado apresentou-se interessante. Assim como nos outros cultivos, a partir das 12 h houve entrada na fase de células em repouso. No entanto, mesmo sem fonte de carbono adicional, foi possível observar uma segunda fase de crescimento aproximadamente após 17 h de cultivo no perfil em questão. Em meios suplementados com sulfato de amônia, na ausência da glicose a levedura pode, de forma lenta, consumir outros metabólitos como o etanol, apresentado baixo acúmulo de biomassa (Cruz et al., 2002).

No tratamento pulsado com alta concentração de fonte de nitrogênio e sem sacarose aliada foi observada uma diminuição na produção dos metabólitos como demonstrado na tabela 1. A partir destes resultados obtidos, presumiu-se que a própria ausência da fonte de carbono tenha causado uma segunda condição limitante na célula, além de um aumento no armazenamento de carboidratos por parte do microrganismo, o que é característico da limitação nutritiva (Zaman et al., 2008). Também ocorreu a diminuição da taxa de crescimento e possível mudança metabólica da glicólise para um possível consumo aeróbico do etanol, já que leveduras possuem capacidade de oxidar uma variedade de produtos de fermentação, como glicerol, etanol e lactato (Zaman et al., 2008).

Neste mesmo tratamento, foi observado uma baixa produção de etanol comparado aos outros tratamentos, possivelmente devido à baixa disponibilidade de açúcares, uma vez que o teste foi conduzido sem adição de mais fonte de carbono. Estudos mostram que meios de cultivo utilizando (NH₄)₂SO₄ possuem um efeito negativo na produção de

etanol, indicando que a natureza da fonte de nitrogênio escolhida afeta diretamente a capacidade fermentativa da levedura (Pereira et al., 2010)

4.3. Atividade de invertase em células em repouso

Além dos ensaios avaliando que a produção de metabólitos e crescimento do organismo sobre limitação de nitrogênio, outro passo importante para este trabalho foi a avaliação do método de células em repouso para estudo fisiológico de *S. cerevisiae* CAT-1. Assim, foram avaliadas atividades enzimáticas pós pulso com sacarose e fonte de nitrogênio em todos os tratamentos. De acordo com os dados obtidos foi possível observar atividade de invertase antes do pulso de sacarose. Como apresentado na Tabela 2, no tempo 0 min., exato momento em que foi adicionada sacarose no meio, já é possível observar atividade de 2,11 U mL⁻¹ de invertase. Estudos prévios descrevem a invertase produzida pela *S. cerevisiae* CAT-1 como uma enzima de natureza constitutiva (Nascimento et al., 2020), ou seja, produzida independente da presença de um específico substrato no meio de cultivo.

Embora tenha sido possível confirmar a presença da enzima previamente à adição do substrato, não houveram variações na atividade com relação à concentração do substrato e também da presença da fonte de nitrogênio nos tempos de coleta estudados, isso também se explica pelo fato da mesma ser constitutiva (Barbosa et al., 2018; Nascimento et al., 2020). Talvez seja necessário um tempo maior para uma mudança a nível transcricional e a fim de se visualizar um impacto relevante na atividade de invertase, sendo imprescindível uma otimização da cinética do protocolo em si para obtenção de maiores volumes de amostra utilizados para prolongação do estudo.

Tabela 2. Atividade de invertase (U/mL^{-1}) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 após os pulsos em Resting Cells.

| Pulsos | Sacarose 0,1% | Sacarose 1 % | 10 mM (NH₄)₂SO₄ | 0,1% Sac + 1 mM (NH₄)₂SO₄ | 1% Sac + 10 mM (NH₄)₂SO₄ |
|----------------------|----------------------|---------------------|---|---|--|
| Tempos (min.) | | | | | |
| 0 | 2,11 ^a | 2,11 ^c | 2,11 ^d | 2,11 ^a | 2,11 ^a |
| 5 | 2,09 ^a | 2,08 ^b | 2,25 ^a | 2,11 ^a | 2,1 ^a |
| 10 | 2,21 ^a | 2,06 ^b | 2,18 ^b | 2,09 ^b | 1,98 ^b |
| 30 | 1,91 ^a | 2,16 ^a | 2,14 ^c | 1,97 ^c | 2,1 ^a |

*Letras minúsculas iguais indicam que, não diferença estatística entre os valores dos tempos de cada pulso individualmente. Letras maiúsculas iguais indicam que, não há diferença estatística entre os tempos equivalentes dos pulsos.

5. CONCLUSÃO

Conforme resultados apresentados, a limitação de nitrogênio na sua menor concentração foi suficiente para a obtenção do estado fisiológico de células em repouso, possibilitando então a utilização de pulsos para avaliação da resposta fisiológica da levedura a perturbações.

A adição de mais fonte de carbono provocou o restabelecimento da multiplicação celular e conseqüente o crescimento, independente da disponibilidade da fonte de nitrogênio ou da adição da mesma. O pulso com fonte de carbono não resultou em produção relevante de etanol.

Na condição em que foi pulsado 10 mM de fonte de nitrogênio a presença de sulfato de amônia e ausência da fonte de carbono resulta em menor crescimento e uma limitação nutritiva comparado aos demais

Além das variações fisiológicas, através dos pulsos foi possível observar a natureza da enzima invertase da *S. cerevisiae* CAT-1, sendo ela constitutiva, produzida antes mesmo da introdução de sacarose no meio de cultivo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora tenha-se alcançado o objetivo do trabalho que seria a utilização dos pulsos em células em repouso para estudos fisiológicos em *S. cerevisiae* CAT-1, acredita-se que são necessários estudos complementares para uma melhor elucidação do comportamento metabólico da mesma em resposta a perturbações. Devido à rápida adaptação da levedura à mudança ambiental, uma análise transcricional seria de grande valia para determinação dos padrões gênicos expressos durante esse processo, fornecendo um melhor entendimento sobre como o microrganismo reage frente a condição de cultivo e aos testes realizados.

7. REFERÊNCIAS

Airoldi, E.M., Miller, D., Athanasiadou, R., Brandt, N., Abdul-Rahman, F., Neymotin, B., Hashimoto, T., Bahmani, T., Gresham, D., 2016. Steady-state and dynamic gene expression programs in *Saccharomyces cerevisiae* in response to variation in environmental nitrogen. *Mol. Biol. Cell* 27, 1383–1396. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-05-1013>

Barbosa, P.M.G., de Moraes, T.P., de Andrade Silva, C.A., da Silva Santos, F.R., Garcia, N.F.L., Fonseca, G.G., Leite, R.S.R., da Paz, M.F., 2018. Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* for the production of fructooligosaccharides. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 48, 506–513. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1466155>

Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>

Boeckstaens, M., André, B., Marini, A.M., 2007. The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. *Mol. Microbiol.* 64, 534–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05681.x>

Brauer, M.J., Huttenhower, C., Airoldi, E.M., Rosenstein, R., Matese, J.C., Gresham, D., Boer, V.M., Troyanskaya, O.G., Botstein, D., 2008. Coordination of Growth Rate, Cell Cycle, Stress Response, and Metabolic Activity in Yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 352–367. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0779>

Broach, J.R., 2012. Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics* 192, 73–105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>

Cruz, S.H., Cilli, E.M., Ernandes, J.R., 2002. Structural Complexity of the Nitrogen Source and Influence on Yeast Growth and Fermentation. *J. Inst. Brew.* 108, 54–61. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00124.x>

Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Tesnière, C., Blondin, B., 2017. A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLOS ONE* 12, e0184838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184838>

Elias, D.A., Monroe, M.E., Marshall, M.J., Romine, M.F., Belieav, A.S., Fredrickson, J.K., Anderson, G.A., Smith, R.D., Lipton, M.S., 2005. Global detection and characterization of hypothetical proteins in *Shewanella oneidensis* MR-1 using LC-MS based proteomics. *PROTEOMICS* 5, 3120–3130. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401140>

Elias, D.A., Tollaksen, S.L., Kennedy, D.W., Mottaz, H.M., Giometti, C.S., McLean, J.S., Hill, E.A., Pinchuk, G.E., Lipton, M.S., Fredrickson, J.K., Gorby, Y.A., 2008. The influence of cultivation methods on *Shewanella oneidensis* physiology and proteome expression. *Arch. Microbiol.* 189, 313–324. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0321-y>

Emmerling, M., Bailey, J.E., Sauer, U., 2000. Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 623–627. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000305\)67:5<623::AID-BIT13>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000305)67:5<623::AID-BIT13>3.0.CO;2-W)

Emmerling, M., Dauner, M., Ponti, A., Fiaux, J., Hochuli, M., Szyperski, T., Wüthrich, K., Bailey, J.E., Sauer, U., 2002. Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 152–164. <https://doi.org/10.1128/JB.184.1.152-164.2002>

Fonseca, G.G., de Carvalho, N.M.B., Gombert, A.K., 2013. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and

energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5055–5067.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4748-6>

Fonseca, G.G., Gombert, A.K., Heinzle, E., Wittmann, C., 2007. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Res.* 7, 422–435. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00192.x>

Fontes, G.C., Amaral, P.F.F., Coelho, M.A.Z., 2008. Produção de biossurfactante por levedura. *Quím. Nova* 31, 2091–2099. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800033>

Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F.N., Guillamon, J.M., 2012. Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiol.* 31, 25–32.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.012>

Iwasaki, Y., Gunji, H., Kino, K., Hattori, T., Ishii, Y., Kirimura, K., 2010. Novel metabolic pathway for salicylate biodegradation via phenol in yeast *Trichosporon moniliiforme*. *Biodegradation* 21, 557–564. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9323-6>

Klosinska, M.M., Crutchfield, C.A., Bradley, P.H., Rabinowitz, J.D., Broach, J.R., 2011. Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes Dev.* 25, 336–349.
<https://doi.org/10.1101/gad.2011311>

Kresnowati, M.T.A.P., Suarez-Mendez, C.M., van Winden, W.A., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., 2008. Quantitative physiological study of the fast dynamics in the intracellular pH of *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose and ethanol pulses. *Metab. Eng.* 10, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.10.001>

Liu, L., Agren, R., Bordel, S., Nielsen, J., 2010. Use of genome-scale metabolic models for understanding microbial physiology. *FEBS Lett.*, Gothenburg Special Issue: *Molecules of Life* 584, 2556–2564. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.052>

Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Mosier, A.C., Justice, N.B., Bowen, B.P., Baran, R., Thomas, B.C., Northen, T.R., Banfield, J.F., 2013. Metabolites Associated with Adaptation of Microorganisms to an Acidophilic, Metal-Rich Environment Identified by Stable-Isotope-Enabled Metabolomics. *mBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00484-12>

Nascimento, V.M., Antonioli, G.T.U., Leite, R.S.R., Fonseca, G.G., 2020. Effects of the carbon source on the physiology and invertase activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* FT858. *3 Biotech* 10, 348. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02335-w>

Navarro Llorens, J.M., Tormo, A., Martínez-García, E., 2010. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 476–495. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x>

Nielsen, J.C., Senne de Oliveira Lino, F., Rasmussen, T.G., Thykær, J., Workman, C.T., Basso, T.O., 2017. Industrial antifoam agents impair ethanol fermentation and induce stress responses in yeast cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 8237–8248. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8548-2>

Pereira, F.B., Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L., 2010. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresource Technology* 101, 7856–7863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.082>

Prasad Maharjan, R., Ferenci, T., 2003. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 313, 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00536-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00536-5)

Taylor, J., 2001. *Microorganisms and Biotechnology*. Nelson Thornes.

Yue, G., Yu, J., Zhang, X., Tan, T., 2012. The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. *Biomass Bioenergy, Biorefinery* 39, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.041>

Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., Broach, J.R., 2008. How *Saccharomyces* Responds to Nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42, 27–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130206>

Zehentgruber, D., Drăgan, C.-A., Bureik, M., Lütz, S., 2010. Challenges of steroid biotransformation with human cytochrome P450 monooxygenase CYP21 using resting cells of recombinant *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biotechnol.* 146, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.019>

8. APÊNDICE

Foi utilizada uma versão desktop da ferramenta **ZOTERO** para contribuição da elaboração deste trabalho. É uma ferramenta gratuita, que permite armazenar, organizar, citar e partilhar referências bibliográficas e que funciona com processadores de texto como o *MS Word*, *Open Office* e *LateX*.

A partir desta ferramenta, as citações e referências contidas neste trabalho foram formatadas seguindo padrões do periódico científico *Journal of Biotechnology*.