

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA

Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

## **VIAS OXIDATIVAS DO METABOLISMO DO ETANOL PELA LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO**

(OXIDATIVE PATHWAYS OF ETHANOL METABOLISM  
IN BAKER'S YEAST)

MARIA EDESINA AGUIAR\*

METRY BACILA  
Prof. Catedrático

### **INTRODUÇÃO**

Desde longo tempo conhece-se a capacidade de levedura de panificação de oxidar álcool etílico. Pouco se sabe, entretanto, dos mecanismos bioquímicos que envolvem tal processo, a não ser pelas observações de Bizeau e Galzy (1) de que a velocidade de respiração do etanol pela *Saccharomyces cerevisiae* é maior do que com o ácido acético. Esse fenômeno foi detidamente analisado por Aguiar e Bacila (2) já que determinações respirométricas levadas a efeito permitiam concluir que o consumo de oxigênio ocorrido na presença do etanol pela levedura de panificação poderia ser explicado não apenas em base ao catabolismo de acetato gerado a partir de etanol. Por outro lado, estudos sobre assimilação de etanol por levedura foram levados a efeito por Vernerova e Vys (3), sem contudo esclarecerem detalhes bioquímicos sobre o assunto.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Levedura de panificação da marca Fleishman (gentileza da Standard Brands, Jundiaí, São Paulo) foi usada para as experiências aqui relatadas. Suspensões a 20% de levedura em tampão fosfato 0,1 M, pH 5,6 eram aeradas por 24 horas à temperatura ambiente, lavadas duas vezes por centrifugação e ressuspensas no mesmo tampão.

A medida respirométrica foi procedida pela técnica convencio-

---

\* Professor Assistente do Departamento de Bioquímica e Biofísica da Faculdade de Medicina de Jundiaí, Estado de São Paulo.

nal de Warburg à temperatura de 37° C com 100 agitações por minuto (aparelho de B. Braun Melsungen, tipo: 12060).

A padronização das suspensões de células foi levada a efeito turbidimetricamente, utilizando-se espectrofotômetro EEL, com comprimento de onda de 460 nm.

A concentração em proteínas foi determinada pelo método do microKjeldahl.

Os reativos usados foram os seguintes: etanol absoluto (Eci-bra), fosfato dissódico (Reagent), fosfato monopotássico (Carlo Erba), iodoacetamida (Pierce Chemical), ácido p-hidroximercuriben-zóico (Sigma), ácido malônico (Sigma), azida de sódio (BDH reagent), veronal sódico (QEEL).

## RESULTADOS

### 1 — Efeito da concentração de álcool etílico sobre a velocidade de respiração

Levedura foi incubada com diferentes concentrações de etanol e a velocidade de respiração medida em base ao consumo de oxigênio. Verifica-se que há certa proporcionalidade na velocidade de oxidação do etanol de acordo com a concentração do álcool, sem que ao final, contudo, o consumo de oxigênio atingisse o valor teórico esperado. (Tabela I).

TABELA I

Efeito da concentração de Etanol sobre a velocidade de respiração.

ETANOL (M)	QO <sub>2</sub>			Rendimento do processo em 100 min.		
	20 (min)	60 (min)	100 (min)	Consumo teórico ( $\mu$ l O <sub>2</sub> )	Consumo Real ( $\mu$ l O <sub>2</sub> )	Rendimento do Processo (%)
Endógeno	1,4	6,75	9,35	—	—	—
4,1.10 <sup>-4</sup>	8,1	13,2	15,7	77,3	77,0	98,0
2,05.10 <sup>-4</sup>	15,4	19,8	23,4	154,6	115,0	74,5
1,3.10 <sup>-3</sup>	44,2	70,8	76,0	335,4	240,0	72,0
2,7.10 <sup>-3</sup>	50,5	127,0	134,0	514,8	342,0	66,0

Sistema: — Cada frasco contém: 0,2 ml de KOH 20% (poço central), 2,3 ml de suspensão de célula A = 1,0 ( $\lambda$  = 460 nm), tampão fosfato 0,1 M pH 5,6 até volume final de 30 ml; foi verificado ainda que, em pH de

tampão que variava de 4,6 a 8,0, entre pH 5,6 a 7,0 as velocidades iniciais eram comparáveis. A concentração de etanol variava de  $4,1 \cdot 10^{-4}$  M até  $2,70 \cdot 10^{-3}$  M. Os valores numéricos mostrados são calculados já considerando os valores do endógeno subtraídos em cada caso. O QO<sub>2</sub> foi calculado como sendo consumo de O<sub>2</sub> por mg de proteína total existente no sistema.

## 2 — Efeito do número de células de levedura sôbre a velocidade de oxidação do etanol

Usando etanol na concentração de  $1,3 \cdot 10^{-3}$  M e variando o número total de células, entre o valor turbidimétrico de absorbância equivalente a 0,4 até 1,0 medido a 460 nm, obteve-se os resultados da tabela II.

TABELA II

Efeito do número de células de levedura sôbre a velocidade de oxidação do etanol.

Suspensão de Células (Absorbância)	QO <sub>2</sub>			Rendimento em 100 minutos		
	20 (min)	60 (min)	100 (min)	Consumo teórico ( $\mu$ l O <sub>2</sub> )	Consumo Real ( $\mu$ l O <sub>2</sub> )	Rendimento (%)
0,4	45,5	130,0	138,0	335	197	55
0,6	37,8	118,0	118,5	335	205	57
0,8	45,0	82,0	85,0	335	221	59
1,0	44,2	70,8	76,0	335	240	63

Sistema: — Cada sistema contém 0,2 ml de KOH 20% (poço central), etanol  $1,3 \cdot 10^{-3}$  M em cada frasco, 2,6 ml de cada suspensão de levedura e tampão fosfato 0,1 M, pH 5,6 até completar 3,0 ml. Para cada valor indicado foi descontado o do correspondente endógeno. QO<sub>2</sub> foi calculado como sendo consumo de oxigênio por mg de proteína total existente no sistema.

Verifica-se que apesar do aumento da concentração do número de células, o rendimento do processo em termos percentual de oxigênio consumido, em relação ao teórico esperado, não aumenta de forma proporcional ao número de células em cada sistema; por outro lado é nítida a diferença de QO<sub>2</sub> entre os diferentes sistemas, já que é ele inversamente proporcional ao número de células presentes.

## 3 — Efeito de inibidores sôbre a velocidade de oxidação do etanol

Ácido malônico, ácido p-hidroximercuribenzóico, iodoacetamida, azida de sódio e veronal sódico foram utilizados com a finalidade

de se proceder a uma análise inibitória do fenômeno da oxidação do etanol por levedura de panificação (Tabela III).

TABELA III

Análise inibitória da utilização respiratória do etanol pela levedura de panificação.

Inibidor	Consumo de O ( $\mu$ l)	Inibição (%)
Iodoacetamida $10^{-3}$	346	—
Sem inibidor	129	68
ácido p-hidroximercuri-benzóico $10^{-3}$ M	298	17
ácido malônico $10^{-2}$ M	332	4,5
Azida de sódio $10^{-4}$ M	34,6	97,2
Veronal sódico $10^{-3}$ M	87,0	87,2

Sistema: — Cada frasco contém 0,2 ml de KOH 20% (poço central), 2,3 ml de suspensão de levedura (a 1,0), etanol ( $2,7 \cdot 10^{-3}$  M) em cada frasco com exceção do endógeno, inibidores nas concentrações finais indicadas, tampão fosfato 0,1 M, pH 5,6 para completar volume até 3,0 ml.

Verifica-se que a capacidade inibitória é bastante acentuada com aqueles inibidores específicos da cadeia respiratória (azida de sódio e veronal sódico) além da iodoacetamida cuja capacidade inibitória é bastante acentuada. Ácido P-hidroximercuribenzóico não é inibidor de porte, ocorrendo o mesmo com o ácido malônico.

#### 4 — Consumo de oxigênio pela levedura de panificação na presença e na ausência de hidróxido de potássio tendo o etanol como substrato

Considerando a possibilidade de que o consumo de oxigênio da levedura durante a oxidação do etanol possa ser o resultado da participação de mais de uma via metabólica, foi estudado o fenômeno em respirômetro de Warburg na presença e na ausência de hidróxido de potássio como absorvente de gás carbônico produzido durante o processo respiratório (Tabela IV).

TABELA IV

Consumo de oxigênio pela levedura de panificação durante a respiração de etanol na presença e ausência de KOH.

Sistema	QO <sub>2</sub>					
	10	20	40	60	80	100
	Minutos					
sem KOH	15,0	25,6	33,0	33,0	34,0	34,0
com KOH	20,0	39,0	73,0	79,0	83,0	84,0

Sistema: — Cada sistema contém: etanol ( $1,3 \cdot 10^{-3}$  M), 2,3 ml de suspensão de levedura, 0,2 ml de KOH 20% (no poço central) e tampão fosfato 0,1 M pH 5,6 até se completar 3,0 ml. Para cada valor indicado foi descontado o do correspondente endógeno. QO<sub>2</sub> foi calculado como sendo consumo de oxigênio por mg de proteína total existente no sistema.

### DISCUSSÃO

A velocidade de consumo de oxigênio pela levedura de panificação, medido em termos de QO<sub>2</sub>, é proporcional à concentração de etanol, entretanto, o rendimento do processo em termos do percentual de oxigênio consumido atinge o teórico calculado somente para etanol na concentração de  $4,1 \cdot 10^{-4}$  M, sendo sempre menor para as demais concentrações do substrato. Esse fato foi comprovado para etanol na concentração de  $1,3 \cdot 10^{-3}$  M, quando se procurou estudar a linearidade do consumo de oxigênio em relação ao número crescente de células utilizadas para tal finalidade.

Entretanto, no caso presente foi verificado que, apesar do rendimento percentual em termos de consumo de oxigênio subir de 55 para 63 por cento por suspensões de células de valor turbidimétrico de 0,4 para 1,0 de absorvância, a não ser para QO<sub>2</sub> determinado aos 20 minutos de incubação em todos os demais tempos, o consumo de oxigênio por mg de proteína decresceu na proporção em que se aumentou a concentração de células por ml de suspensão.

O consumo de oxigênio por levedura de panificação quando etanol é utilizado como substrato é impedido de forma muito acentuada por inibidores da cadeia respiratória tais como veronal sódico e azida de sódio. Dos bloqueadores sulfidrílicos experimentados, iodoacetamida inibe o fenômeno muito mais acentuadamente do que o p-hidroximercuribenzoato; o malonato, por sua vez, inibe muito menos o fenômeno. A ação dos inibidores respiratórios indica, de modo claro, que o transporte de hidrogênio entre piridino-nucleotídeo e flavoproteína é especificamente atingido, já que em

concentrações de  $10^{-3}$  M, veronal inibe em 87,2 por cento o consumo de oxigênio. Por outro lado, a alquilação produzida pela iodoacetamida atua de modo mais nítido no processo inibitório do que a formação de mercaptídeo levado a efeito pelo p-hidroximercuribenzoato.

Quando o consumo de oxigênio é medido em sistema que não contém hidróxido de potássio como absorvente de gás carbônico, ocorre consumo de oxigênio da ordem de 40 por cento em relação ao consumo de oxigênio que se verifica em sistema contendo hidróxido de potássio.

Esse fato indica claramente que parte do oxigênio consumido pela levedura ao oxidar etanol não se relaciona com a biossíntese da água que tem lugar em consequência das desidrogenações efetuadas ao longo da atividade operativa do Ciclo de Krebs-Johnson.

Tendo em conta que o etanol é preliminarmente oxidado pela atividade catalítica da desidrogenase alcoólica, para então produzir acetil-S-Co A, pode-se admitir que parte do oxigênio consumido decorre da formação de água que tem curso como consequência da oxidação de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  extramitocondrial formado pela ação da desidrogenase alcólica e o restante como consequência natural do catabolismo do acetil-S-Co A. Aliás, sabe-se que mitocôndria de levedura possui a propriedade de oxidar diretamente  $\text{NADH} + \text{H}^+$  extramitocondrialmente (4), fato que não é observado em mitocôndria de origem animal.

### SUMMARY

Ethanol oxidation by baker's yeast has been studied by respirometric determinations. It was shown that within certain limits of ethanol concentrations ( $4 \cdot 10^{-4}$  M to  $2,7 \cdot 10^{-3}$  M), the rate of oxygen uptake, by a suspension of yeast cells ( $A = 1.0$  at 460 nm) is proportional to the ethanol concentration. Only for  $4.1 \cdot 10^{-4}$  M ethanol, oxygen uptake reached the calculated theoretical rate. When suspensions of cells ranging from 0,4 to 1,0 of absorbance were incubated with  $1.3 \cdot 10^{-3}$  M ethanol, the  $\text{QO}_2$  values calculated as oxygen uptake per mg protein were about the same at 20 min. of incubation but steadily decreased as the number of cells increased when the incubation time was longer.

Respiratory inhibitors as veronal and sodium azide strongly inhibit oxygen uptake. Alkylating compounds as iodoacetamide act as much better inhibitors than the mercaptide forming agent p-hydroxymercuribenzoate. Malonate ( $10^{-2}$  M) inhibits oxygen uptake only in 4.5. 40 per cent of the total oxygen uptake measured in systems containing KOH as  $\text{CO}_2$  absorvent were found to be consumed in

the absence of KOH, a fact that can be explained in terms of the direct oxidation by the yeast mitochondria of the  $\text{NADH} + \text{H}^+$  originated from the oxidation of ethanol by alcohol dehydrogenase; 60 per cent of the oxygen uptake can be accounted by the catabolic fate of acetyl-S-Co A originated from the ethanol oxidation.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIZEAU, C. & GALZY, P. — Observations sur le fonctionnement de la chaîne d'oxydation d'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. *C. r. S. ianc. Soc. Biol.*, Paris.
2. AGUIAR, M. E. & BACILA, M. — Vias de oxidação do etanol pela levedura de panificação. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 22.<sup>a</sup>, 1970, Ciência e Cultura (Resumo), p. 400.
3. VERNEROVA, J. & VYS, S. — Ethanol assimilations by yeast. *Sk. Chem. Technol.*, Praze, Potravín Technol, 12: 55-56, 1966.
4. HIGUGHI, T., OCAMPOS, D. & BACILA, M. — The interrelationship between the NADH oxidation system and the respiratory system of baker's yeast mitochondria. *Anais Acad. Brasil. Ciênc.*, Rio de Janeiro, 42 (1) 1970.