Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa

Flavia Salvato

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2010

Flavia Salvato
Licenciada em Química

Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Salvato, Flavia

Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa / Flavia Salvato. - Piracicaba, 2010.

93 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Fermentação alcoólica 2. Indústria sucro-alcooleira 3. Leveduras 4. Metabolismo
5. Organismos geneticamente modificados 6. Sacarose I. Título

CDD 663.13
S182f

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Darlene e José Miguel

Obrigada pela dedicação, pelo companheirismo, pela caminhada, pela luta, pela lida.

Obrigada pela vida, pelos ensinamentos, pelos sermões, e principalmente pelos exemplos.

Eles são valiosíssimos!

Obrigada pelos agradós e principalmente pelos desagradós.

Assim, eu pude ver que na vida nem tudo é como a gente quer

Aprendi a ter limites, a ser mais "gente".

Obrigada pelas preocupações, sei que muitas vezes fui (e ainda sou) causa de inapetência e insônia.

Aprendi com vocês a ter coragem, a não desanimar, a saborear a vitória.

Obrigada por tudo que vocês planejaram e fizeram, por tudo que planejaram e não fizeram e pelo o que fizeram sem planejar.

À minha querida irmã Fernanda,

*Obrigada pela ajuda, doando-me confiança,
na certeza de estar indo por caminhos seguros.*

Nem mais, nem menos, amo você!

A todos vocês dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para alcançar meus objetivos e sonhos e me amparar e me confortar nos momentos difíceis.

Ao prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pela oportunidade, confiança, orientação e incentivo para a execução deste trabalho.

Ao companheiro de laboratório Thiago Olita Basso pelas valiosas sugestões, pela paciência e pela imensa dedicação neste trabalho. Obrigada por estar sempre pronto para ajudar.

Ao CNPQ pelo oferecimento de uma bolsa para a elaboração deste trabalho.

À UNESP e ESALQ pela formação profissional proporcionada.

Ao professor Dr. Boris Stambuk por ceder a levedura geneticamente modificada utilizada neste trabalho.

Ao técnico e grande amigo Luiz Lucatti (Cometa) e à amiga Fernanda Sgarbosa Gomes sempre muito prestativos. Obrigada pelos dias e noites de trabalho, acompanhados sempre de muitas risadas e brincadeiras que me ajudaram muito durante esta caminhada. A pós graduação já valeu por ter as suas companhias.

À equipe do Laboratório, Nara Bortolazzo Gustinelli, Renata Christofolletti, Natália Alexandrino e Thalita Basso, que me ajudaram na execução deste trabalho.

Aos amigos Jéssika e Marcelo Bortolazzo pelas horas descontraídas e dias de diversão.

À minhas amigas do coração Mônica Aparecida dos Santos e Elisa Lucatti que sempre torceram pelo meu sucesso. Obrigada pela ajuda, pelos conselhos nos momentos difíceis e pelos momentos de alegria. Sempre estarei torcendo por vocês!

Ao meu namorado Raphael Bortolazzo, pela paciência e por fazer eu acreditar em mim para conseguir transformar meus sonhos e metas em realidade. Obrigada pelos conselhos e por me amparar nas horas de cansaço. Amo você!

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho!

"NÃO SE DEVE IR ATRÁS DE OBJETIVOS FÁCEIS, É PRECISO BUSCAR O QUE SÓ PODE SER ALCANÇADO POR MEIO DOS MAIORES ESFORÇOS."

ALBERT EINSTEIN

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Invertase.....	25
2.2 Bioquímica da Fermentação alcoólica.....	28
2.3 Transportes através da membrana plasmática	32
2.4 Microrganismos utilizados em processos industriais.....	34
2.5 Genes envolvidos na fermentação de açúcares.....	37
2.6 Metabólitos indicativos de estresse da Levedura	37
2.6.1 Glicerol	37
2.6.2 Trealose	39
2.6.3 Etanol	41
3 OBJETIVO.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	47
4.2 Manutenção e cultivo das Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
4.3 Preparo do Mosto de Multiplicação	49
4.4 Preparo dos mostos de Fermentação	49
4.5 Ensaio de Fermentação	50
4.7 Ensaio da metabolização de açúcares.....	51
4.8 Determinação do teor de biomassa nos vinhos.....	51
4.9 Determinação da viabilidade celular.....	52
4.10 Determinação de açúcares e glicerol	52

4.11 Determinação de etanol mediante HPLC.....	52
4.12 Determinação de etanol e cálculo da eficiência fermentativa	52
4.13 Determinação do pH e trealose	53
4.14 Análise Estatística.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Estudo comparativo dos parâmetros fermentativos: CAT -1 e HCJ 003.....	55
5.2 Estudo da cinética de metabolização de açúcares: CAT -1, HCJ 003 e BG -1.....	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS.....	85

RESUMO

Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de metabolização de açúcares por linhagens de *S. cerevisiae* amplamente utilizadas no setor sucroalcooleiro (CAT-1 e BG-1) e uma linhagem geneticamente modificada (HCJ 003) com o propósito de sobreexpressar invertase intracelular e ainda contém transportadores de sacarose de alta afinidade. Para tal estudo foi realizado 1 ensaio de fermentação simulando as condições industriais de produção de etanol com ciclos de células e mosto misto constituído de melaço e caldo de cana (50% de cada fonte) a 19% de ART. O ensaio de fermentação foi constituído por 4 ciclos sendo os 3 primeiros ciclos destinados a avaliação das cepas CAT -1 e HCJ 003 a qual é diplóide e sobre-expressa somente a invertase intracelular quanto aos diversos parâmetros do processo de fermentação. O 4º ciclo fermentativo foi destinado ao estudo do perfil de metabolização dos açúcares, onde analisou-se os teores de sacarose, glicose e frutose, bem como a formação de glicerol e o teor de trealose na biomassa das linhagens CAT -1, HCJ 003 e BG-1 (ambas com atividades de invertase distintas). No estudo comparativo dos parâmetros fermentativos a cepa HCJ 003 produziu de forma consistente, menos biomassa e mais etanol do que a cepa CAT-1. O rendimento fermentativo em etanol foi maior para a cepa HCJ 003. O fato de transportar a sacarose para o interior da célula faz com que seja gerado apenas 3 moles de ATP (em vez de 4 ATP). Portanto, para repor o ATP que deixa de ser gerado, há um maior direcionamento do metabolismo para as vias fermentativas e conseqüentemente mais etanol é produzido aumentando-se o rendimento da fermentação. No estudo do perfil de metabolização dos açúcares para as cepas CAT -1, HCJ 003 e BG-1 mostrou que a cepa BG -1 hidrolisou mais rapidamente a sacarose devido à alta atividade de invertase e também apresentou quantidades superiores de glicerol em resposta ao aumento da pressão osmótica do meio de fermentação. Já a CAT -1 apresentou maiores níveis de trealose o que pode ser um indicativo da sua maior dominância durante o processo industrial brasileiro. Assim este trabalho resultou no perfil de metabolização de cepas com diferente atividade de invertase e mostrou que a cepa HCJ 003 embora seja uma derivada de uma linhagem laboratorial manteve-se adaptada às condições do processo obtendo-se rendimento superior à CAT-1.

Palavras chave: Fermentação alcoólica; *Saccharomyces cerevisiae*; Invertase extra e intracelular; Metabolização de açúcares; Modificação genética

ABSTRACT

Fermentation of industrial must by strains of *saccharomyces cerevisiae* with sucrose transporter and overexpression of internal invertase: a comparative study with strains with high and low activity of external invertase

The aim of this work was to evaluate the metabolic profile of sugars using *Saccharomyces cerevisiae* strains widely used in industry of sugars and ethanol (CAT-1 e BG-1) and a genetically modified strain in purpose to over-express intracellular invertase and also contains sucrose transporters with high affinity. For this study, 1 test were performed simulating industrial fermentation for ethanol production using cell recycle and mixed must with molasses and sugar cane (50% of each compound) for 19% TRS. The fermentation experiment were composed of 4 recycles and in first 3 cycles were intended for the evaluation of the strains CAT-1 and HCJ 003 which is diploid and overexpress just the intracellular invertase on the various parameters of the fermentation process. The 4th recycle was designed to study the profile of metabolism of sugars, where were analysed the levels of sucrose, glucose and fructose, as well as the formation of glycerol and trehalose content in biomass of the strains CAT -1, HCJ 003 and BG -1 (all of them with different invertase activity). In the evaluation of the strains on the various parameters of the fermentation process, the strain HCJ 003 produced consistently less biomass and more ethanol than CAT-1. The yield of ethanol fermentation was higher for the strain HCJ 003. The fact that this strain transport sucrose into the cells makes it generated only 3 moles of ATP (instead 4 ATP). So to restore the ATP that is not generated, there is an increase targeting of the metabolism to fermentative pathways and therefore more ethanol is produced increasing the efficiency of fermentation. In the profile of metabolism of sugars to the strains CAT -1 HCJ 003 and BG-1 showed that the strain BG -1 hydrolyzed more rapidly the sucrose due to high invertase activity and also showed higher amounts of glycerol in response to increased osmotic pressure of the fermentation medium. Already CAT -1 showed higher levels of trehalose, which may be indicative of its most dominant during the Brazilian industry. So this work resulted in the profile of metabolism of different strains with invertase activity and showed that strain 003 Hcj although a derivative of a laboratory strain remained adapted to the conditions of the process resulting in higher yield to CAT-1.

Keywords: Alcoholic fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; Extra and intracellular invertase; Metabolism of sugars; Genetic modification

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo de leveduras sobre condições aeróbias e anaeróbias	29
Figura 2 - Representação das vias de utilização de açúcares por <i>S. cerevisiae</i>	32
Figura 3 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Schizosaccharomyces pombe</i> expostas a concentrações de 10%, 20% e 30% (v/v) de etanol por 1h.....	42
Figura 4 - Metabolismo da sacarose em uma cepa utilizada industrialmente (A) e em outra geneticamente modificada (B) (sem hidrólise da sacarose extracelularmente)	48
Figura 5 - Multiplicação das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
Figura 6 - Foto de um experimento teste.....	51
Figura 7 - Biomassa expressa em gramas, das cepas CAT-1 e HCJ 003 durante os 3 ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância	57
Figura 8 - Quantidade de glicerol expresso em porcentagem das duas diferentes cepas (CAT -1 e HCJ 003) durante os 3 ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.....	57
Figura 9 - Viabilidade celular expressa em porcentagem (%) - gramas de biomassa úmida/100mL - das cepas CAT -1 e HCJ 003 durante os 3 ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância..	58
Figura 10 - Brotamento expresso em porcentagem (%) - gramas de biomassa úmida/100mL - das cepas CAT -1 e HCJ 003 durante os 3 ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.	59

- Figura 11 - Teor de trealose expresso em gramas/100 gramas de biomassa seca presente nas cepas CAT -1 e HCJ003 anterior à fermentação e ao final de cada ciclo fermentativo. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.....61
- Figura 12 - Rendimento expresso em porcentagem (v/v) das cepas HCJ 003 e CAT-1 ao longo dos três ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância62
- Figura 13 - Teor de glicose expresso em porcentagem (%) – gramas/100mL de vinho - das duas linhagens (CAT -1 e HCJ 003) ao longo dos quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.....62
- Figura 14 - Teor de frutose expresso em porcentagem (%) – gramas/100mL de vinho - das linhagens CAT -1 e HCJ 003 ao longo dos quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância .63
- Figura 15 - Teor de sacarose expresso em porcentagem (%) – gramas/100mL de vinho - das linhagens CAT -1 e HCJ 003 ao longo dos quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância .63
- Figura 16 - Teor de etanol expresso em porcentagem (% , v/v) das linhagens CAT -1 e HCJ 003 ao longo dos quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância64
- Figura 17 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura CAT -1 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de oito horas.....65

- Figura 18 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura HCJ 003 durante o 4° ciclo fermentativo com duração de oito horas65
- Figura 19 – Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura BG -1 durante o 4° ciclo fermentativo com duração de oito horas66
- Figura 20 – Teor de trealose expresso em gramas/100 gramas de biomassa seca presente nas cepas CAT -1, HCJ 003 e BG -1 durante o 4° ciclo fermentativo70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas propriedades da invertase.....	28
Tabela 2 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no decorrer dos 3 ciclos fermentativos	87
Tabela 3 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre a viabilidade da levedura (%) e taxa de brotamento (%) nos 3 ciclos e os teores de trealose (%) no decorrer dos 4 ciclos fermentativos	88
Tabela 4 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre os teores de açúcares residuais expressos em ART (%), e sacarose no decorrer dos 4 ciclos fermentativos	89
Tabela 5 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre os teores de açúcares residuais expressos em glicose (%) e frutose (%) no decorrer dos 4 ciclos fermentativos	89
Tabela 6 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre a quantidade de glicerol e teor de etanol expresso em porcentagem (%) no decorrer dos 4 ciclos fermentativos.....	90
Tabela 7 - Estudo comparativo do perfil de metabolização dos açúcares entre as cepas CAT-1, HCJ 003 e BG -1 expressos em sacarose (%) e ART (%) no decorrer do 4ºciclo fermentativo	91
Tabela 8 - Estudo comparativo do perfil de metabolização dos açúcares entre as cepas CAT-1, HCJ 003 e BG -1 expressos em glicose (%) e frutose (%) no decorrer do 4º ciclo fermentativo	92
Tabela 9 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1, HCJ 003 e BG -1 sobre os teores de glicerol (%) e trealose (%) no decorrer do 4º ciclo fermentativo	93

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos maiores desafios mundiais é a busca de alternativas ao petróleo, combustível fóssil, com reserva em declínio, altamente poluente e com preços voláteis. A busca por alternativas para os combustíveis derivados de petróleo têm aumentado a fim de reduzir a dependência mundial dos recursos não renováveis. A segurança energética e as mudanças climáticas requerem uma substituição em larga escala dos combustíveis a base de petróleo (FARRELL, et al., 2006).

Recentemente, o combustível renovável mais comum é o etanol derivado da cana-de-açúcar (sacarose) e milho (amido) (GRAY et al., 2006). Uma das grandes vantagens dos biocombustíveis é que eles podem ser produzidos em qualquer lugar do mundo a partir da matéria-prima local e utilizando tecnologias simples. O Brasil, por exemplo, produz etanol a partir da cana-de-açúcar e biodiesel a partir da soja e da mamona; a Malásia e a Indonésia produzem etanol a partir do óleo de palma; o Canadá utiliza o milho e o arroz e os Estados Unidos utiliza as sementes e forragens de milho (HERRERA, 2006).

O bioetanol tem recebido considerável atenção no Brasil, principalmente depois da primeira crise do óleo de 1973, levando o país a criar um programa nacional para substituir parte da gasolina pelo etanol (AMORIM; LEÃO, 2005).

Até a década de 70, o etanol no Brasil era apenas um simples subproduto da indústria canavieira. A produção comercial de álcool combustível no Brasil foi impulsionada na década de 70 com o lançamento do Plano Nacional do álcool (PROÁLCOOL) que visava estimular a produção de álcool pelos empresários do setor proporcionando-os empréstimos a juros baixos e alto preço de venda do produto. O Proálcool, extinto na década de 90, permitiu que o Brasil pavimentasse um dos mais importantes projetos do planeta para a produção de biocombustíveis, principalmente de etanol e biodiesel (MUTTON et al., 2006).

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de etanol no mundo e sua produção tem aumentado firmemente durante as últimas três décadas. Porém, recentemente, o Brasil foi ultrapassado pelos EUA (VALDES, 2007), atingindo 21 bilhões de litros por ano durante a safra 2007/2008 (OLIVEIRA et al., 2007) enquanto que os EUA (onde a maioria do etanol é oriundo do milho) produziu cerca de 24 bilhões

de litros de etanol (RENEWABLE FUEL ASSOCIATIONS – RFA 2008) com um balanço energético estimado de 1,3 (unidades de energia oriundas da produção de etanol por unidade de energia utilizada para sua produção). Por outro lado, o Brasil produz etanol a partir da cana-de-açúcar com um balanço energético estimado de 8,0 (LEITE, 2005).

Segundo os dados fornecidos pela Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB do último relatório da safra de 2008, houve um aumento expressivo da produção de etanol na região centro-sul da ordem de 17,02%, passando a produção total da região de 20,79 bilhões de litros para 24,33 bilhões. Este aumento representa um volume adicional desse produto da ordem de 3,54 bilhões de litros. O álcool etílico, por suas notáveis qualidades como combustível automotor, ocupa espaços crescentes como um produto de fonte limpa e renovável, capaz de substituir seu congênere de origem fóssil, a gasolina. Como consequência desta tendência, a destinação da cana-de-açúcar para a fabricação de álcool está se tornando crescentemente majoritária nas unidades de produção. Na safra passada, a participação da cana destinada para a produção de álcool estava em 54,03% (45,97% para o açúcar) e, nesta safra, esta proporção está estimada em 56,9% (43,1% para o açúcar).

Os biocombustíveis, como uma fonte de energia sustentável, irão diminuir o impacto do aumento do preço do petróleo, preocupações ambientais como poluição do ar e gases do efeito estufa, e proporcionará oportunidades para as comunidades rurais (FAO, 2005; HAZELL; PACHAURI, 2006). Apesar das considerações econômicas serem supremas para o suporte global dos biocombustíveis, outros fatores como segurança energética, emissão de gases do efeito estufa, mudança climática estão ajudando a direcionar a revolução bioenergética (MOREIRA, 2006).

Além disso, os biocombustíveis como o etanol, podem ser carbonos neutros, ou seja, o carbono absorvido da atmosfera pelas plantações de cana-de-açúcar, compensa as moléculas de carbono emitidas durante a queima do combustível renovável não contribuem para o acúmulo de carbono na atmosfera.

No Brasil, o álcool combustível é produzido através da fermentação industrial do caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas selecionadas do processo de fermentação. A sacarose é de longe o mais importante,

barato e abundante açúcar. A sacarose contida no melaço é a maior matéria-prima para a produção de fermento de panificação, para a produção de bebidas destiladas e etanol combustível.

O passo limitante do processo de fermentação é a resposta fisiológica da levedura *S. cerevisiae* frente à concentração de açúcares presentes no meio. Enquanto que as enzimas da via glicolítica, assim como vários outros genes, foram conservados durante a evolução de *S. cerevisiae*, os mecanismos que controlam a metabolização das diferentes fontes de carbono e a produção de energia, se adaptam às necessidades de cada linhagem no setor industrial na qual estas estão inseridas. Com isto, estudos realizados para caracterizar a via de utilização destes açúcares são de grande importância do ponto de vista biotecnológico e econômico, permitindo desenvolver estratégias de forma a incrementar o desempenho das linhagens de levedura, tanto por modificações na condução do processo industrial, quanto desenvolvendo leveduras que possuam as características desejadas para cada setor industrial (FEREA et al., 1999; IHMELS et al., 2005; KELLYS et al., 2004; LANDRY et al., 2006; PFEIFFER et al., 2001; QUEROL et al., 2003).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Invertase

Na história da enzimologia, a invertase pode ser considerada a primeira das enzimas carboidrases a ser estudada. Sua atividade foi detectada, pela primeira vez, em 1828, quando se observou que a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso, sendo claramente confirmada, em 1833, pela constatação de que a levedura hidrolisava a sacarose em condições não fermentativas. Finalmente, em 1860, a enzima foi separada do extrato aquoso de levedura, por precipitação com etanol (BARROS, 1990).

A enzima sacarase ou invertase (β -fructofuranosídeo-frutohidrolase, EC. 3.2.1.26) é uma enzima que hidrolisa a sacarose (açúcar não redutor) em glucose e frutose (dois açúcares redutores) em quantidades iguais. A mistura desses monossacarídeos recebe o nome de açúcar invertido, por apresentar a propriedade de desviar o plano de luz polarizada no sentido anti-horário (levógiro), em contraposição à solução aquosa de sacarose de partida para a ação da invertase, que desvia a luz plano polarizada no sentido horário (dextrógiro).

A enzima invertase pode ser encontrada em leveduras, fungos, bactérias, insetos, mamíferos e vegetais, porém a principal fonte desta enzima são as leveduras.

As células de *S. cerevisiae* possuem dois tipos de invertase: uma forma extracelular (ou periplasmática) e outra intracelular. A forma externa é uma glicoproteína com cerca de 50% de carboidratos, ao passo que a interna é destituída dos mesmos. Apresentam atividade catalítica similares, mas sua composição de aminoácidos é diferente, a invertase externa contém cisteína enquanto a interna não (CABRAL, 1982; ISIK et al., 2003). Algumas propriedades da invertase interna e externa estão apresentadas na Tabela 1 (GÁSCON, 1981).

Tabela 1 - Algumas propriedades da invertase (Gáscon, 1981)

Propriedade	Invertase Externa	Invertase interna
Massa molecular (Kg)	270000	135000
% carboidrato	50	3
Atividade específica U/mg de proteína	2700	2900
pH estabilidade	3,0 - 7,5	6,0 - 9,0
pH ótimo - atividade	3,5 - 5,5	3,5 - 5,5

U = micromol de sacarose hidrolisado por minuto.

A invertase externa é localizada na parede celular e associada à manana, sendo esta consequência da expressão de um RNAs com um transcrito maior, o qual é reprimido em altas concentrações de sacarose ou pelos seus produtos de hidrólise. Já a invertase interna é localizada no citoplasma e não associada à manana, consequência da expressão de um RNAs com um transcrito menor. Ambas as enzimas são derivadas de um ou mais genes SUC (SUC1 a SUC5 e SUC7) (NAUMOV et al., 1996). Enquanto o primeiro RNA mensageiro é reprimido por altas concentrações de sacarose ou por seus produtos de hidrólise (glicose e frutose), a invertase intracelular é expressa constitutivamente (CARLSON; BOTSTEIN, 1982). Foi também estabelecido que a eficiente expressão de invertase requer baixos níveis de glicose e frutose no meio (HERWING et al., 2003).

Ambas as enzimas possuem pH ótimo ácido (pH 4,6-5,0) e mesma temperatura ótima (35-50°C) e embora a sequência protéica seja idêntica, o peso molecular da forma intracelular é de 135 KDa e superior a 270 KDa (podendo chegar a complexos com mais de 800 KDa) para a invertase extracelular. Esta diferença de massa se deve à glicosilações adicionais à forma extracelular durante a síntese e tráfego pela via secretória das células, modificações que conferem proteção contra a ação de proteases (não interferindo na ação invertásica) (ALVARADO et al., 1990; ARRUDA; VITOLO, 1999; REDDY et al., 1988).

Embora seja esperado que uma alta atividade de invertase garanta a eficiente fermentação da sacarose, alguns trabalhos têm demonstrado uma correlação inversa entre os níveis dessa enzima e o desempenho fermentativo das células. Echegaray et al (2000), demonstrou que aumentando-se os níveis de açúcar nos ensaios fermentativos, há uma diminuição dos níveis de invertase nas células porém um alto

rendimento de etanol. Além disso, de acordo com Takeshige e Ouchi (1995), a concentração de etanol no meio de fermentação e/ou alguns componentes presentes no melaço (NaCl, por exemplo) podem estar envolvidos na redução da atividade da invertase.

A atividade invertásica de células de leveduras é oscilante. Vitolo et al., (1987) estudaram a atividade de invertase de células de *S. cerevisiae*, em melaço de cana e concluíram que, durante o cultivo contínuo de leveduras, a parede celular e o espaço periplasmático são submetidos a mudanças morfológicas contínuas, as quais afetam a interação entre a invertase e moléculas de sacarose, conduzindo à oscilação da atividade invertásica.

Greig e Travisano (2004) demonstraram que a eficiência de leveduras que não possuem genes SUC em meios contendo sacarose pode ser superior àquela de leveduras que produzem essa enzima, especialmente em altas densidades celulares, comumente encontradas em processos fermentativos. Além disso, a correlação inversa entre a atividade invertásica e a capacidade fermentativa das células é aumentada em meios ou massas que contenham altas concentrações de sacarose. Isso parece ser uma consequência do repentino choque osmótico sofrido pelas células quando altas concentrações de sacarose são rapidamente convertidas em concentrações ainda mais altas de glicose e frutose (MYERS; LAWLOR; ATTFIELD, 1997; TAKESHIGE; OUCHI, 1995). Takeshige e Ouchi (1995) mostraram, com adição de invertase comercial, que existe uma atividade de invertase mínima para que ocorra a eficiente fermentação de meios a base de melaço com 30% de sacarose, caso contrário, pode haver um aumento da pressão osmótica do meio e, conseqüentemente queda na produção de etanol. Basso e Amorim (1998) estudaram o comportamento de diferentes linhagens de leveduras (PE-2, VR-1, BG-1, AS-1 e CR-1) quanto ao desempenho fermentativo e a hidrólise de sacarose em mosto com 17,8% de ART concluindo que todas as leveduras apresentaram um excelente desempenho fermentativo, porém as linhagens BG-1, CR-1 e AS-1 hidrolisaram a sacarose em 2 horas, enquanto a PE-2 e VR-1 em 6 horas. Assim, as linhagens com maior velocidade de hidrólise de sacarose apresentaram uma maior produção de glicerol devido ao maior estresse osmótico do meio fermentativo.

2.2 Bioquímica da Fermentação alcoólica

A levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto deste. Se o homem pretende beneficiar-se desta habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições ideais para que as mesmas trabalhem a seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol. A célula de levedura possui compartimentos para a adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração) se dá na mitocôndria (AMORIM, 2005).

A utilização do açúcar ocorre por duas formas; na respiração (aerobiose) e na fermentação (anaerobiose). A diferença entre respiração e fermentação não consiste somente na produção de álcool e gás carbônico no caso da primeira e de água e gás carbônico na segunda. Na fermentação, cada molécula de glicose produz 2 de ATP, e na respiração, fabrica 38 moléculas de ATP (AMORIM, 2005).

Existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de levedura. O primeiro denominado glicólise tem a função de quebrar a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Dois principais modos de utilização de piruvato na produção de energia podem ser distinguidos. São eles: respiração e fermentação (Figura 1). Na ausência de oxigênio (fermentação) há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. Porém na presença de oxigênio (respiração) há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o ciclo de krébs, onde este será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água.

Figura 1 - Metabolismo de leveduras sobre condições aeróbias e anaeróbias

Quando as leveduras são crescidas na presença de oxigênio, com baixa concentração de açúcar, ou quando a captação de açúcar pelas células é lenta, o complexo da enzima piruvato desidrogenase direciona o fluxo glicolítico à respiração, já em anaerobiose ou em altas concentrações de açúcar a fermentação é favorecida, pois o carbono excedente não direcionado para a respiração é metabolizado pela enzima piruvato descarboxilase, favorecendo a fermentação (BADOTTI, 2005; FEREA et al., 1999; POSTMA et al., 1989).

Quando a quantidade de carbono na via glicolítica é baixa, o fluxo glicolítico é direcionado para a respiração devido à alta atividade catalítica do complexo da enzima Piruvato Desidrogenase. Por outro lado, a alta concentração de açúcar no meio, resulta em carbono excedente na glicólise que é metabolizado pela enzima Piruvato Descarboxilase, favorecendo a fermentação.

Em termos energéticos, a respiração é muito mais favorável para a levedura que a fermentação. Quando as células de leveduras crescem aerobiamente na presença de glicose, as moléculas de NADH₂ produzidas durante a glicose podem doar seus elétrons para o sistema de transporte de elétrons que tem o oxigênio comoceptor final de elétrons. Isso resulta não somente na regeneração do NAD, mas também na

geração de uma força protomotiva, a qual pode conduzir a síntese de moléculas adicionais de ATP (PELCZAR, 1996).

Em condições industriais, a levedura utiliza anaerobiamente seu substrato por meio da glicólise. Tal processo bioquímico envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato está confinado no citoplasma celular, sendo portanto, nessa região que se processa a fermentação alcoólica. Tais enzimas sofrem a ação de diversos fatores (nutrientes minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura, etc.) alguns que estimulam, outros que reprimem a ação enzimática, afetando assim o desempenho do processo. O objetivo primordial da levedura ao metabolizar o açúcar, é gerar uma forma de energia química (ATP) que será empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos e biossínteses necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação, perpetuando desta forma a espécie. O etanol e CO₂ resultantes se constituem em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose. Durante a fermentação, na seqüência de reações de produção de ATP, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários à produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos) bem como para a formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência, o que pode vir a reduzir a produção de etanol. São eles, o glicerol, os ácidos orgânicos, principalmente o succínico e o acético, que conjuntamente com a biomassa são quantitativamente os principais subprodutos metabolicamente relacionados ao equilíbrio redox celular em anaerobiose. A fermentação alcoólica é um processo não oxidativo, sem a participação do oxigênio molecular e portanto, para se manter o equilíbrio de redox celular, todo o NADH formado (em reações de oxidação) deve ser consumido (em reações de redução) estas acopladas à produção de etanol e glicerol (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

A utilização dos açúcares pelas leveduras envolve inicialmente o seu transporte para o interior da célula (LAGUNAS, 1993). É comumente aceito que a primeira etapa de utilização da sacarose por *Saccharomyces cerevisiae* é a completa hidrólise deste, pela enzima extracelular invertase em glicose e frutose os quais são posteriormente

transportados para o interior da célula e metabolizados (BARNETT, 1981). Porém evidências contraditórias são reportadas na literatura. Friss e Ottolenghi (1959) mostraram que protoplastas deficientes em atividade de invertase extracelular, fermentaram sacarose. Também foi relatado que uma cepa sacarose não fermentativa foi capaz de acumular intracelularmente ^{14}C marcado em dissacarídeos (AVIGAD, 1960). Portanto a sacarose, dissacarídeo não redutor, que é formada por D-glicose e D-frutose unidas através de seus carbonos anoméricos, mediante ligação glicosídica, pode ser hidrolisada, extracelularmente, pela invertase externa ou ser transportada diretamente para o citoplasma e, posteriormente, hidrolisada pela invertase intracelular (Figura 2).

Figura 2 - Representação das vias de utilização de açúcares por *S. cerevisiae*

2.3 Transportes através da membrana plasmática

O transporte através da membrana plasmática é essencial para a manutenção da vida, comunicação entre as células e adaptação às mudanças do meio ambiente. Os sistemas de transporte permitem a entrada de nutrientes para o interior da célula, possibilitando a metabolização de fontes exógenas de carbono, fósforo e nitrogênio. Eles são também responsáveis pela excreção de produtos das vias metabólicas e de substâncias nocivas, e regulam o fluxo de íons que podem ser mantidos em concentrações intracelulares muito diferenciadas daquelas do ambiente externo (PAO et al., 1998; SAIER, 2000a). Os solutos podem atravessar a membrana plasmática por difusão simples ou pelo transporte mediado por proteínas através de canais ou

carreadores. Moléculas como CO₂, O₂ e etanol, podem atravessar a membrana por difusão simples, sendo que as concentrações intracelulares desses substratos nunca ultrapassam as do meio externo. Canais e carreadores podem mediar o soluto sem gasto de energia metabólica e a favor de um gradiente de concentração. Neste processo, denominado de difusão facilitada, os carreadores se distinguem dos canais por sofrerem mudanças conformacionais em consequência da interação com o substrato, de tal forma que o sítio de ligação do substrato é exposto para um ou outro lado da membrana plasmática, permitindo a passagem da molécula. Na difusão facilitada mediada por um canal, o soluto passa de um lado ao outro da membrana via um canal ou poro que permanece inerte durante todo o processo (SAIER, 2000a, 2000b).

Quando gasto de energia é acoplado à translocação do soluto, o transporte é denominado ativo. Transportadores ativos primários bombeiam H⁺ ou outros íons para fora da célula, convertendo a energia química em um gradiente eletroquímico através da membrana (ex: H⁺-ATPase). Este gradiente eletroquímico pode, então, ser usado pelos transportadores ativos secundários para o transporte de outras moléculas (LAGUNAS, 1993; SAIER, 2000a, 2000b).

Algumas leveduras possuem transportadores de sacarose. A análise da captação direta da sacarose por *Saccharomyces cerevisiae* revelou a presença de um co-transporte de sacarose H⁺ (MWESIGYE; BARDFORD, 1996; SANTOS et al., 1982) que de acordo com STAMBUK e colaboradores (1999) é mediado pela permease Agt1 (Figura 2). Desta forma, as linhagens não necessitam hidrolisar a sacarose extracelularmente para metabolizá-la, ou seja, a sacarose é levada para o interior da célula através de um co-transporte com prótons H⁺ (Figura 2) onde são hidrolisadas pela invertase intracelular, liberando moléculas de glicose e frutose que serão posteriormente metabolizadas pela via glicolítica (BARDFORD et al., 1992).

Portanto, duas vias de utilização de sacarose são conhecidas na levedura *S. cerevisiae* (vide Figura 2): pela ação da invertase extracelular a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose, sendo seus produtos de hidrólise transportados para o interior da célula através da difusão facilitada via transportadores de hexoses e fermentados, ou alternativamente por transporte ativo onde a sacarose pode ser captada diretamente

através do co-transporte com H^+ e hidrolisada internamente pela invertase intracelular ou maltase (BADOTTI et al., 2006; BATISTA et al., 2004; BARDFORD et al., 1992; MWESIGYE; BARDFORD, 1996; ORLOWSKI; BARDFOR, 1991; STAMBUK et al., 2000; STAMBUK; DE ARAUJO, 2001).

É esperado que as células que utilizam a sacarose exclusivamente via transporte ativo, sem a hidrólise extracelular, produzirá mais etanol já que em vez de serem gerados 4 moles de ATP (gasto energético quando há hidrólise extracelular) via fermentação são gerados 3 moles de ATP a fim de compensar o consumo de ATP envolvido na extrusão do co-transporte com H^+ .

2.4 Microrganismos utilizados em processos industriais

O desempenho fermentativo é bastante afetado pelo tipo de levedura que o desenvolve. As leveduras são os microrganismos mais amplamente utilizados nos processos fermentativos e para a produção de biomassa. Apesar de esforços visando a utilização de outros microganismos para a obtenção de etanol, a utilização de *Sacharomyces cerevisiae* continua sendo a mais adequada, pois por se tratar de processos não estéreis, necessita-se de um microrganismo “robusto”, capaz de suportar condições drásticas.

É uma prática muito freqüente nas destilarias se iniciar o processo fermentativo com uma determinada levedura, seja pela tradição de seu uso, como *Saccharomyces cerevisiae*, pela facilidade de obtenção em grandes quantidades, como as leveduras de panificação Fleischamnn ou Itaiquara, ou pelo fato da mesma ter sido obtida através de melhoramento genético para se melhor adequar às necessidades do processo industrial (AMORIM et al., 1996).

No período final de uma safra, ao se isolar a levedura do processo, pode-se verificar que esta é diferente daquela introduzida no início. Essas leveduras são chamadas de selvagens ou contaminantes. A fermentação alcoólica pode ser afetada ou não pela contaminação das dornas por leveduras contaminantes. As leveduras selvagens são microrganismos que habitam naturalmente a cana-de-açúcar e, portanto são adaptadas ao substrato de alimentação da dorna. Entre elas estão leveduras que embora sejam habitantes naturais do caldo não tem características que as façam

sobreviver ao ambiente rústico da dorna. Estas são eliminadas naturalmente do processo. Porém se ela tiver uma boa capacidade fermentativa, sendo assim benéfica ao processo, ela será considerada a mais adequada para o próximo processo para a próxima safra. Neste caso, analisam-se as suas peculiaridades que permitam seu domínio sobre outras populações (RODRIGUES; ANDRIETA, 1995).

Em uma usina, pode acontecer uma diminuição no rendimento do produto durante o processo, sem se saber o motivo. A detecção de leveduras ao longo do processo e a sua caracterização fermentativa será importante neste caso, pois fornecerá subsídios para verificar se a diminuição do rendimento é devido à contaminação ou à falhas de operação, ou má qualidade da matéria-prima (RODRIGUES; ANDRIETA, 1995).

Atualmente com o aumento da produção de álcool combustível, vêm-se aumentando a busca por leveduras nativas com alto potencial fermentativo. A técnica mais utilizada para a identificação dessas leveduras é a cariotipagem, a qual identifica as linhagens de leveduras à partir do tamanho do DNA das cepas. Dessa forma foram selecionadas várias cepas amplamente utilizadas pelas usinas de açúcar e álcool como a PE-2 e CAT-1, que apresentam grande produtividade, bom rendimento, baixa produção de glicerol, pouca produção de espuma e ausência de floculação. Embora esta técnica tenha reconhecido valor como instrumento de estudo e forneça gênero e espécie das leveduras, não fornece informações sobre a performance fermentativa da levedura. Para melhor avaliar e caracterizar as linhagens, é importante o estudo dos parâmetros fermentativos que permite determinar de forma comparativa, se uma cepa testada é similar a outras e ainda ser capaz de fornecer informações sobre seu comportamento fermentativo.

Além da seleção de cepas nativas do processo de fermentação, também podem ser engenheiradas cepas em laboratório com genótipos e características desejáveis para aumentar a produtividade e diminuir custos.

Considerando que a sacarose pode ser eficientemente fermentada através do transporte ativo do açúcar (BADOTTI et al., 2006; BATISTA et al., 2004), é interessante desenvolver leveduras incapazes de hidrolisar a sacarose extracelularmente, mas que continuem fermentando este açúcar eficientemente. Assim poderia haver um aumento na

produção de etanol já que seria diminuída a contaminação por outros microrganismos que não possuem invertase e utilizam os monossacarídeos oriundos da hidrólise realizada pelas leveduras do processo.

2.5 Genes envolvidos na fermentação de açúcares

A fermentação de dissacarídeos e oligossacarídeos é controlada por uma família repetida de genes, como a família de genes SUC (sucrose), MAL (maltose), MEL (melibiose), e MGL (alfa metilglicosidase). Cada família é composta por locis múltiplos, desassociados e funcionalmente equivalentes que controlam a fermentação; por exemplo, a família SUC é composta por seis desassociados genes, cada um é um gene estrutural para a invertase. Uma característica não usual dessa família de genes é que cepas *Saccharomyces* muito semelhantes carregam diferentes membros ativos de cada família, e algumas cepas não possuem genes funcionais. Como resultado, as *Saccharomyces* diferem em sua habilidade de fermentar açúcares (CARLSON, 2009).

Estudos moleculares da variabilidade em genótipos SUC e MAL indicam que a fermentação de genes estão localizados em diferentes cromossomos em diferentes genomas. Por exemplo, uma cepa pode conter um gene SUC no locus SUC I, enquanto outra cepa pode conter nenhuma seqüência de genes SUC naquele locus (CARLSON; BOTSTEIN, 1983). Análises da família SUC indicam que a maioria dos genes SUC residem próximos do cromossomo telomérico e que a dispersão dos genes SUC para diferentes cromossomos ocorrem pelo rearranjo dos telômeros (CARLSON, 1985). A total organização da família de genes MAL parece ser similar à família SUC, embora cada MAL locus ser um complexo locus incluindo vários genes envolvidos na utilização da maltose. Essas dispersas famílias de genes podem oferecer ao microrganismo versatilidade na adaptação em diferentes meio ambientes.

2.6 Metabólitos indicativos de estresse da Levedura

Durante e no final da fermentação as células são expostas a altas concentrações de etanol. Ao final da fermentação as células de leveduras sedimentam, e o mosto é então removido para processamento até a obtenção do produto final. As leveduras

sedimentadas são então re-inoculadas num mosto fresco para iniciar novo ciclo de fermentação. Portanto, durante o processo de produção de etanol as leveduras são submetidas a diversos estresses, incluindo lavagens com ácido para evitar contaminações por bactérias e/ou outros microrganismos (SMART; WHISKER, 1996; HEGGART et al., 1999; CUNNINGHAM; STEWART, 2000; YAMAGISHI et al., 2001; JENKINS et al., 2003; POWELL et al., 2003; CAMPELO; BELO, 2004; KOBI et al., 2004). Conseqüentemente, o estado fisiológico e a performance fermentativa das leveduras não permanecem constantes durante os vários ciclos de fermentação, e depois de 6 a 8 ciclos as leveduras perdem a sua capacidade fermentativa máxima (YAMAGISHI et al., 2001; HEGGART et al., 1999; KOBI et al., 2004). As leveduras são então descartadas, e a fermentação é iniciada com um inóculo de leveduras novas. Esta característica do processo faz com que seja de fundamental importância a determinação da qualidade das leveduras em uso antes de iniciar um novo ciclo fermentativo.

Alguns metabólitos produzidos por *S. cerevisiae* tais como o glicerol e a trealose servem como indicadores de estresse da levedura. Os níveis destes compostos podem ser um indicador da tolerância a situações de estresse provocado por fatores adversos.

2.6.1 Glicerol

O glicerol é o único poliol produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (JENNINGS et al., 1984) e sua síntese relaciona-se inversamente com a eficiência fermentativa. É o mais efetivo osmorregulador presente em *S. cerevisiae* e ocorre aumento de sua síntese em situações de estresse osmótico, pois sua formação é aumentada em meios com baixa atividade de água (ou analogamente, alta pressão osmótica) determinada pela presença de solutos, tais como sais e açúcares (HAJNY et al., 1960; PANCHAL; STEWART, 1980; MAIORELLA et al., 1984; LARSON; GUSTAFSSON, 1987; TOKUOKA, 1993) quando também ocorre aumento de síntese de trealose (WALKER 1998); esta por sua vez é o mais eficiente sacarídeo na estabilização da membrana plasmática quando a levedura é submetida a um estresse osmótico reduzindo assim possíveis danos em sua estrutura (MANSURE et al., 1997).

Segundo Albertyn et al., (1994) mutantes deficientes em enzimas utilizadas na biossíntese de glicerol são incapazes de sobreviver em condições hiperosmóticas o que indica que altos níveis de glicerol confere capacidade de resistência ao estresse osmótico nas leveduras.

A produção de glicerol durante a fermentação alcoólica sofre influência das linhagens presentes no processo, pH, temperatura e concentração de sacarose no mosto, e de modo geral, quanto maiores os valores destes parâmetros, maior a produção de glicerol (GUTIERREZ, 1991). Erasmus et al., (2003), atribuem a síntese de glicerol, trealose e glicogênio como válvula de segurança, que disponibiliza rapidamente carboidrato à levedura.

O glicerol, também inibe ou limita a fermentação alcoólica. Segundo o trabalho de Converti et al., (1995), quando se tem acúmulo de glicerol no caldo fermentado, ocorre um decréscimo lento e linear da produtividade específica máxima de etanol, relacionado ao acréscimo de glicerol, seguido por uma queda rápida da produtividade a partir de um limiar de concentração.

Além de ser um metabólito osmorregulador, segundo Brumm e Hebeda (1988), a produção de glicerol estaria também nada com a regeneração do NADH. Uma das condições em que se tem excesso de $\text{NADH} + \text{H}^+$ na célula, é quando ocorre o crescimento. Para haver crescimento é necessária a síntese de proteínas, onde parte dos aminoácidos provém do piruvato. Assim, para se restabelecer o equilíbrio de redox durante a fermentação, quando há crescimento, o único caminho é a formação de glicerol para manter o processo de glicólise (NORDSTRÖM, 1966).

Sob condições anaeróbias, o glicerol é formado para reoxidar o NADH formado em reações de anabolismo e na síntese de ácidos orgânicos. Sob condições aeróbias, o glicerol pode também ser formado, mas normalmente em teores mais baixos; exceção ocorre em baixo potencial osmótico, quando o glicerol age como regulador osmótico e quantidades substanciais podem ser formadas (COSTENOBLE et al., 2000).

A produção de glicerol sob condições fermentativas pode ser eliminada pela presença de baixas concentrações de oxigênio (condições microaeróbias). Estudos de modelagem matemática indicam que neste caso a oxidação do excesso de NADH ocorre via cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. A redução da formação de

glicerol neste sistema teria grande impacto na produção de etanol combustível, minimizando a formação de subprodutos. Dependendo das condições de fermentação, cerca de 4 a 10% da fonte de carbono pode ser convertidos para glicerol (COSTENOBLE et al., 2000).

2.6.2 Trealose

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de acumular dois carboidratos, o glicogênio e a trealose. Além de um carboidrato de reserva, a trealose exerce a função de proteção das células quando em condições de estresse.

Em 1974, as pesquisas indicavam que a trealose serviria como um depósito de glicose para fornecer energia e/ou para síntese de componentes celulares. Hoje é claro que a trealose é muito mais que um simples componente de armazenamento (ELBEIN, 1974). Este composto pode proteger as proteínas e membranas da inativação ou desnaturação causada por uma variedade de condições estressantes (ELBEIN et al., 2003).

A trealose é um dissacarídeo não reduzido no qual duas unidades de glicose são unidas por uma ligação $\alpha, \alpha - 1,1$ glicosídica. Há três possíveis anômeros de trealose que são, $\alpha, \beta - 1,1$, $\beta, \beta - 1,1$ e $\alpha, \alpha - 1,1$ porém somente o $\alpha, \alpha -$ trealose tem sido isolada em organismos vivos. Este açúcar está presente em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos, insetos, invertebrados e plantas, onde serve como fonte de energia e carbono (ELBEIN et al., 2003).

Diversos trabalhos indicam que a maioria dos microrganismos que conseguem sobreviver em condições estressantes apresentam elevadas concentrações de trealose indicando que este açúcar protege a célula de diversos estresses como o congelamento, concentrações tóxicas de etanol, o choque térmico e desidratação (TREVELYN et al., 1984). De acordo com HOLLINGER et al., 1987, a elevação da temperatura do meio de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* de 27 para 40 °C promove um aumento no acúmulo de trealose e com isso a levedura adquire termotolerância.

Este açúcar está presente em altas concentrações em leveduras de panificação (ELANDER; MYRBACK, 1949) e cervejarias (STEWART et al., 1950); nestes

organismos, os níveis de trealose depende da idade das células, assim como do estágio de crescimento e seu estado nutricional.

A trealose possui a capacidade de proteger a célula de levedura durante processos de desidratação-hidratação. Tal habilidade é atribuída ao fato de que a trealose interage com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana celular (CROWE et al., 1984). Neste fenômeno ocorre a substituição de moléculas de água pela trealose, assim em condições de estresse, são evitadas as separações laterais de componentes de membrana, mantendo-se a integridade e fluidez da mesma e, com isso a viabilidade celular (PANEK et al., 1993). Portanto, há uma forte relação entre o acúmulo de trealose intracelular e a viabilidade celular em condições de estresse.

Segundo Madin e Crowe, (1975) a habilidade das leveduras em sobreviver na ausência de água tem mostrado uma forte relação com a síntese de trealose. A fase log de crescimento de culturas de leveduras tem uma baixa concentração de trealose e são mais suscetíveis à desidratação, mas quando estes microrganismos entram na fase estacionária, os níveis de trealose aumentam e paralelamente sua habilidade para sobreviver em condições de desidratação. Essa habilidade em sobreviver na presença de trealose é independente da fase de crescimento das células, pois a fase log de células sujeitas pelo choque térmico rapidamente sintetiza trealose e adquire a habilidade de sobreviver com desidratação (GADD et al., 1987).

Este carboidrato é importante para a manutenção da viabilidade celular da levedura, porém é utilizada como carboidrato de reserva durante períodos de não proliferação, quando a sobrevivência da célula depende dos níveis de trealose e glicogênio (TREVELYN et al., 1984).

Para alguns autores, o acúmulo de trealose ocorre durante a fase estacionária de desenvolvimento. Durante o crescimento logarítmico de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio de glicose, o conteúdo intracelular de trealose é muito baixo. Sob condições de depleção de glicose do meio, as células de leveduras entram numa breve fase de crescimento retardado referido como diauxia (PANEK; MATTOON, 1977), neste período há uma pausa na divisão celular, é um período de adaptação onde muitas enzimas precisam ser ativadas ou sintetizadas e o acúmulo de trealose ocorre antes,

pois o etanol passará a ser oxidado. Estes autores observaram a síntese de trealose durante o crescimento aeróbio de leveduras com limitação de nitrogênio. Quando as células foram colocadas em meio de cultivo fresco, contendo glicose como fonte de carbono, a reserva de trealose permaneceu baixa durante o crescimento logarítmico.

2.6.3 Etanol

Dentre os diversos fatores de causam estresse na levedura, o maior estresse é causado pelo etanol durante o processo de fermentação (CANETTA et al., 2006). No entanto a toxicidade do etanol em leveduras tem um mecanismo muito complexo, de modo que o principal alvo desse estresse ocorre na membrana celular (D'AMORE et al., 1990). Os efeitos da toxicidade do etanol na fisiologia da levedura são diversos. Esses efeitos incluem inibição do crescimento, redução da viabilidade, redução da respiração (PASCUAL, et al., 1988), redução da fermentação (FERNANDES et al., 1997), inativação enzimática, modificação lipídica da membrana plasmática, perda de força protomotiva através da membrana plasmática (PETROV; OKORKOV et al., 1990; MIZOGUCHI; HARA, 1997) e aumento da permeabilidade da membrana (MARZA et al., 2002). Esses efeitos são menos pronunciados quando há alta síntese de trealose.

Segundo Canetta et al., (2006), expondo as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e *Sc. Pombe* em concentrações de etanol de 10%, 20% e 30% (v/v) por 1 hora, a viabilidade celular sofre um grande declínio em *Sc. pombe* (91%, 80% e 9% respectivamente) comprovando que o etanol é mais tóxico nesta espécie que em *S. cerevisiae*. Além da diminuição da viabilidade celular, o estresse do etanol gera um aumento na permeabilidade nas membranas celulares levando à ruptura da estrutura das células e sua forma torna-se irregular (Figura 3).

Figura 3 - *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* expostas a concentrações de 10%, 20% e 30% (v/v) de etanol por 1h

Segundo D'amore e Stewart (1987) o etanol produzido na fermentação pode reduzir a multiplicação e a viabilidade da levedura. O mecanismo de inibição é complexo e muitos mecanismos são propostos, sendo que incluem a desnaturação e inibição de enzimas, e danos na membrana plasmática alterando a sua permeabilidade. Os autores ressaltam que os fosfolípidos presentes na membrana plasmática

desempenham um importante papel no mecanismo de tolerância ao etanol. Acréscimos de ácidos graxos insaturados, além disso, fatores como o acúmulo de etanol intracelular, temperatura e pressão osmótica influem sobre a tolerância ao etanol.

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o perfil de metabolização de açúcares por diferentes leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com diferente atividade de invertase. Para isso, este trabalho abrangeu os seguintes objetivos específicos:

- Estudo comparativo entre os diversos parâmetros fermentativos das cepas CAT-1 e HCJ 003
- Estudo da cinética de metabolização de açúcares, a formação de glicol e o acúmulo de trealose das cepas CAT-1, HCJ 003 e BG-1

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens de *S. cerevisiae*

Para a condução dos ensaios foram utilizadas três linhagens dentre essas, duas são amplamente utilizadas no setor sucroalcooleiro e foram escolhidas devido à grande capacidade de permanência no processo e à resistência às condições de estresse. As duas cepas escolhidas foram: CAT-1, isolada da usina VO – Catanduva localizada no município de Catanduva; BG-1, isolada da usina Barra Grande. Todas essas usinas estão localizadas no estado de São Paulo. As três linhagens foram fornecidas pela Coleção de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ- USP. Já a cepa HCJ – 003 também utilizada neste trabalho, foi fornecida pelo prof. Dr. Boris U. Stambuk, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. Tal cepa é diplóide derivada da linhagem laboratorial CEN.PK2-1C e foi engenheirada com o propósito de sobreexpressar a invertase intracelular além de conter transportadores de sacarose de alta afinidade. Diferentemente das *Saccharomyces cerevisiae* industrialmente utilizadas que podem hidrolisar a sacarose tanto pela invertase extracelular como pela intracelular, esta cepa obrigatoriamente necessita transportar todo o açúcar para dentro da célula através dos transportadores de sacarose e então clivem este açúcar em glicose e frutose em seu citoplasma (Figura 4).

Figura 4 - Metabolismo da sacarose em uma cepa utilizada industrialmente (A) e em outra geneticamente modificada (B) (sem hidrólise da sacarose extracelularmente)

4.2 Manutenção e cultivo das Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As culturas de *Saccharomyces cerevisiae* foram mantidas em meio de cultura YEPD sólido (extrato de levedura – 1%, peptona – 1%, dextrose – 2%, água destilada, ágar – 1,5%) com óleo mineral, sob temperatura ambiente. Na reativação foi retirada uma alça da cultura de manutenção e transferida para tubo de ensaio contendo 5,0 mL de caldo YEPD, sendo o tubo incubado a 32°C por 24h. Posteriormente, 0,1 mL deste tubo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de YEPD e incubado nas mesmas condições. Em seguida foi transferido o conteúdo deste tubo (5 mL) para erlenmeyer contendo 50 mL de meio YEPD e incubado sob as mesmas condições descritas anteriormente (Figura 5).

Na segunda etapa de multiplicação, foi transferida toda a suspensão celular proveniente da primeira etapa para um erlenmeyer, contendo 100 mL de mosto de multiplicação e incubado à temperatura ambiente. Decorridas 24 horas de incubação, foi adicionado um volume de mosto igual ao volume de suspensão de células dobrando o volume, ou seja, foi adicionado 150 mL seguido de incubação a temperatura ambiente. O procedimento de duplicar o volume com mosto foi realizado até a obtenção de biomassa desejada. Após o término da multiplicação, os frascos foram acondicionados em câmara fria a 4°C durante tempo suficiente para ocorrer a

decantação de todas as células em suspensão (Figura 5). Em seguida, foram centrifugadas a 800 g durante 20 minutos (centrífuga Internacional Refrigerated Centrifuge, modelo PR-2) e as biomassas obtidas foram utilizadas nos ensaios fermentativos.

Figura 5 - Multiplicação das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

4.3 Preparo do Mosto de Multiplicação

Os mostos de multiplicação foram preparados com melaço industrial diluído com água até atingir 10% de ART. Após a diluição, o mosto de multiplicação foi transferido para erlenmeyers e autoclavados (121°C durante 20 minutos). Após autoclavagem foram armazenados em temperatura ambiente.

4.4 Preparo dos mostos de Fermentação

Os mostos utilizados para os experimentos de fermentação foram preparados através da mistura de caldo de cana e melaço diluídos. A proporção utilizada foi de 50% de melaço e 50% de caldo de cana ambos diluídos com água destilada para obtenção de uma concentração final média de 19% de ART. Os mostos de fermentação foram centrifugados e autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Após autoclavagem, os mostos foram resfriados à temperatura ambiente, filtrados em algodão hidrófilo, e

acondicionados em frascos plásticos contendo 800 mL de mosto. Posteriormente, foram congelados a -18°C até o momento do uso.

4.5 Ensaio de Fermentação

Os ensaios de fermentação foram realizados em 4 ciclos fermentativos com reciclos de células sendo o último ciclo utilizado para o estudo cinético de metabolização de açúcares. A biomassa das linhagens obtidas na etapa de multiplicação foram ajustadas para um peso de 8 g de biomassa úmida e, posteriormente foram adicionados 17 mL de água Milli-Q e 3 mL de vinho obtido da centrifugação da suspensão celular da etapa de crescimento e para os ciclos posteriores foram utilizados os vinhos obtidos da fermentação do ciclo anterior. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo dos demais tratamentos, perfazendo um total de 6 erlenmeyers (2 tratamentos com 3 repetições) para cada ensaio de fermentação.

Todos os ensaios de fermentação foram realizados em erlenmeyers com capacidade máxima de 250 mL. Após o preparo do pé-de-cuba (C), os frascos foram acondicionados em shaker a 100 rpm e 30°C . Através de uma bomba peristáltica (A) para simular a alimentação realizada na indústria, foi adicionado mosto de fermentação (B) aos frascos de fermentação. O volume total de mosto de alimentação adicionado foi de 60 mL. As alimentações com a bomba peristáltica ocorreram durante 5 horas para simular o procedimento realizado na indústria. Todo o CO_2 produzido e o etanol residual gerado nos frascos de fermentação (C) foram coletados em tubos de ensaio com 20 mL de água destilada acondicionadas em caixa de isopor (D) contendo gelo em seu interior (Figura 6).

Figura 6 - Foto de um experimento teste

4.7 Ensaio da metabolização de açúcares

Durante o quarto ciclo fermentativo foi realizado a cinética de metabolização de açúcares. Foi retirado 2mL de cada frasco de fermentação a cada 2 horas. Todas as amostras foram centrifugadas e 0,5 mL foi utilizado para dosar etanol em cromatógrafo de troca iônica enquanto que os sobrenadantes restantes foram imediatamente, submetidos a “banho fervente” com a finalidade de inativar a invertase. Após fervura, estas amostras foram analisadas por HPLC para dosar sacarose, glicose, frutose e glicerol. Os precipitados resultantes da centrifugação foram utilizados para extrair trealose.

4.8 Determinação do teor de biomassa nos vinhos

Os volumes dos frascos de fermentação foram divididos igualmente em tubos de centrífugas com capacidade máxima de 120 mL previamente tarados e centrifugados a 800 g durante 15 minutos após o término de cada ciclo fermentativo. Após a centrifugação, os tubos foram pesados e assim obteve-se o teor de biomassa e os valores foram expressos em g.L^{-1} .

4.9 Determinação da viabilidade celular

Após o término de cada ciclo fermentativo foi retirada alíquota de 0,2 mL de vinho bruto para a determinação da viabilidade celular que é a proporção de células viáveis e é expressa em porcentagem (%). As viabilidades foram determinadas por microscopia óptica mediante coloração diferencial de células pela solução de eritrosina em tampão fosfato e posterior contagem de células viáveis que permanecem incolores, e não viáveis, as quais adquirem coloração rósea na presença do corante. Além das células viáveis e não viáveis, foram contados os brotos viáveis presentes em câmara de Neubauer.

4.10 Determinação de açúcares e glicerol

A quantificação glicose, frutose, sacarose e glicerol foi realizada através de cromatografia de troca iônica utilizando o cromatógrafo iônico DIONEX, modelo DX300 (Sunnyvale, CA, USA) equipado com coluna Carbowack PA1 e utilizando como fase móvel o NaOH (100 mmol.L⁻¹) sob fluxo de 0,9 mL.min⁻¹.

4.11 Determinação de etanol mediante HPLC

A quantificação de etanol foi estimado mediante cromatografia líquida (HPLC) empregando-se para tanto coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H BioRad (Hercules, CA, USA) a 65°C, utilizando H₂SO₄ 5mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e detector de índice de refração CG 410 (instrumentos Científicos C.G Ltda, São Paulo, Brasil), conforme descrito por Alves (1994).

4.12 Determinação de etanol e cálculo da eficiência fermentativa

Os teores de etanol foram determinados mediante destilação por arraste de vapor em um microdestilador Kjeldhal. As amostras destiladas foram transferidas para densímetro digital marca ANTON PAAR modelo DMA 48 para a obtenção das concentrações de etanol. O rendimento alcoólico (eficiência fermentativa) é a fração do açúcar metabolizado que se converteu em etanol e foi calculado, considerando-se que 100g de glicose (ou ART) resultariam em 51,11g de etanol (para eficiência de 100% de conversão).

4.13 Determinação do pH e trealose

O valor de pH foi determinado no final de cada ciclo fermentativo. Os conteúdos de trealose na levedura foram estimados mediante extração com ácido tricloroacético 0,2 M em banho de gelo durante 20 minutos (60 mg de massa úmida de levedura para cada 2 mL de extrator), seguido de quantificação no sobrenadante (3.000 rpm por 10 minutos) mediante cromatografia iônica (HPAEC, Dionex DX 300) nas mesmas condições operacionais empregadas para a dosagem de açúcares (Basso et al., 2008).

4.14 Análise Estatística

As comparações das médias foram feitas pelo teste de comparações de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Para a execução das análises foi utilizado o pacote estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 1990).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo comparativo dos parâmetros fermentativos: CAT -1 e HCJ 003

Nesta parte do projeto duas leveduras diplóides com formas distintas de metabolização da sacarose foram avaliadas. A linhagem *S. cerevisiae* CAT-1, que expressa as duas formas da enzima invertase (extra- e intracelular; Carlston et al., (1982) foi comparada à linhagem HCJ 003, a qual sobre-expressa apenas a forma intracelular desta enzima (DARIO et al., 2008). Esta linhagem possui algumas modificações genéticas, que fazem com que a mesma seja incapaz de hidrolisar a sacarose extracelularmente. Desta forma, quando cultivada em meio contendo esta fonte de carbono, a linhagem é obrigada a transportar a sacarose para o ambiente intracelular e então clivar este açúcar em glicose e frutose no citoplasma. Isto tem como consequência um gasto energético, que pode ser resumido da seguinte forma. Ao transportar uma molécula de sacarose para o ambiente intracelular, ocorre o simporte de um próton, o que faz com que as células, para manterem o pH intracelular constante, tenham que bombear este próton para o ambiente extracelular. Isto ocorre via H^+ -ATPases de membrana, que gastam uma molécula de ATP por próton extrudado. Como balanço final, para cada mol de sacarose consumido pelas células em anaerobiose (ou durante metabolismo fermentativo), em vez de serem gerados 4 moles de ATP via fermentação (o que ocorreria no caso de hidrólise extracelular da sacarose e transporte de glicose e frutose por difusão facilitada), são gerados apenas 3 moles de ATP (já que um mol é gasto para extrudar o próton co-transportado). Nesta situação, o que se espera é que as células, quando em anaerobiose, procurem repor estes 25% de ATP (ou ao menos parte disto) que deixam de ser gerados, através de um direcionamento maior do metabolismo para as vias fermentativas, ou seja, para a formação de etanol. Portanto, o que se imagina é que a linhagem HCJ 003 produza mais etanol por mol de sacarose consumido em anaerobiose do que uma linhagem selvagem.

Este ensaio fermentativo foi constituído de 4 ciclos sendo os 3 primeiros ciclos destinados a avaliação das duas diferentes cepas quanto aos diversos parâmetros do

processo de fermentação. Os parâmetros avaliados foram: rendimento em etanol (% do volume obtido em relação ao máximo teórico), biomassa final, viabilidade, taxa de brotamento, produção de glicerol, produção de etanol e teores de trealose na biomassa. O 4º ciclo fermentativo foi destinado ao estudo do perfil de metabolização dos açúcares, onde analisou-se os teores de sacarose, glicose e frutose, bem como a formação de glicerol e o teor de trealose na biomassa.

No decorrer de todos os ciclos fermentativos, a levedura HCJ 003 (que expressa apenas a invertase intracelular) produziu menos biomassa que a CAT- 1 (Figura 7, Tabela 2) ao final de cada ciclo fermentativo. Observou-se também uma menor produção de glicerol para esta cepa (Figura 8, Tabela 6), provavelmente decorrente da menor biomassa previamente observada. Embora não haja diferença estatística no segundo e terceiro ciclos, fica evidente os menores teores de glicerol durante os ciclos estudados. Badotti (2005), afirmou que devido ao requerimento energético para a captação direta de dissacarídeos, até 25% da energia produzida pela fermentação pode ser utilizada para este transporte (conforme explicado anteriormente). Este acontecimento deve-se à existência do co-transporte de íons H^+ acoplado a entrada de sacarose para o interior das células, a qual é mediada principalmente pela permease Agt1p, embora saiba-se que outros transportadores Malx1p sejam capazes de transportar este dissacarídeo, porém com menor afinidade (STAMBUK et al., 2002). O conseqüente desvio de ATP para a extrusão destes íons tem como conseqüência, menor disponibilidade de ATP para a produção de biomassa e conseqüentemente menos glicerol é produzido. Deve-se ressaltar que a produção de glicerol não está somente acoplada a produção de biomassa mas também às condições de osmolaridade do meio (HOHMANN 1997, apud ALVES, 2000). Elevados níveis de osmolaridade podem ser responsáveis pelo estresse osmótico ao qual as células estão submetidas (principalmente em substratos industriais, como no caso destes experimentos). Portanto, a produção de glicerol também pode ser um indicativo de estresse causado pela pressão osmótica do meio assim como a produção e consumo de trealose e glicogênio.

Figura 7 - Biomassa expressa em gramas, das duas diferentes cepas durante os 3 ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Figura 8 - Quantidade de glicerol expresso em porcentagem das duas diferentes cepas durante os 3 ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Na fermentação alcoólica é necessário o crescimento da levedura apenas para sustentar a alta viabilidade celular durante o reciclo de células. Segundo Amorim 2005,

o excesso de fermento nas dornas das usinas (acima de 15%) pode esgotar os nutrientes mais rapidamente causando a exaustão dos elementos essenciais à levedura, decréscimo da viabilidade, aumento do consumo de ácido (durante o tratamento ácido) e redução do rendimento da fermentação. Além disso, operando nessas condições, acabava-se circulando uma quantidade maior de células mortas nas centrífugas, que liberam vitaminas, aminoácidos e minerais que servem como fonte de alimento para as bactérias, agravando os problemas causados pela contaminação.

Através dos dados obtidos nesse trabalho, é possível verificar que as cepas CAT-1 e HCJ 003 apresentaram viabilidades constantes e elevadas (acima de 90%) ao longo dos ciclos fermentativos (Figura 9, Tabela 3), sendo estatisticamente equivalentes entre si. De certa maneira, esta observação foi muito interessante, pois a cepa HCJ 003 é uma derivada diplóide da linhagem laboratorial CEN.PK2-1C, normalmente mais susceptível aos meios industriais com altos teores de açúcares (> 200 g/l). Observou-se ainda que a taxa de brotamento foi superior em todos os ciclos para a HCJ 003 mostrando que esta cepa manteve-se adaptada às condições do processo (Figura 10, Tabela 3).

Figura 9 - Viabilidade celular expressa em porcentagem (%) - gramas de biomassa úmida/100mL - das duas diferentes cepas durante os 3 ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Figura 10 - Brotamento expresso em porcentagem (%) - gramas de biomassa úmida/100mL - das duas diferentes cepas durante os 3 ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Em relação aos teores de trealose na biomassa (% de trealose em relação à massa seca de células), observou-se o aumento gradativo deste carboidrato de reserva na cepa CAT -1 ao longo dos ciclos fermentativos. Por outro lado, no caso da cepa HCJ 003, os teores de trealose diminuíram após o primeiro ciclo fermentativo (Figura 11, Tabela 3), sendo que ao final do quarto ciclo representou cerca de metade do valor presente na linhagem CAT-1.

A trealose possui a capacidade de proteger a célula de levedura durante processos que possam provocar estresse à levedura. Diversos trabalhos indicam que a maioria dos microrganismos que conseguem sobreviver em condições estressantes apresentam elevadas concentrações de trealose indicando que este açúcar protege a célula de diversos estresses (TREVELYN et al., 1984). Alcarde e Basso (1997) estudaram o acúmulo da trealose endógena pelas leveduras em anaerobiose, e verificaram que leveduras com maior acúmulo deste carboidrato, tiveram aumento significativo na manutenção da viabilidade após liofilização.

A trealose só se acumula e atinge concentração elevada dentro da célula quando a glicose do meio estiver quase esgotada. Lilli e Pringle (1980) citam que, para que um composto seja considerado de reserva, ele deve ser acumulado quando as fontes

externas de nutrientes são abundantes para ser utilizado em períodos desfavoráveis. A trealose apresenta um comportamento diferente, ou seja, é acumulada durante a fase lag da diauxia, quando o meio está quase exaurido em glicose.

Embora tenha ocorrido uma queda no teor de trealose para a levedura HCJ 003 após o primeiro ciclo fermentativo, houve manutenção das células e alta taxa de brotamento (Figura 10, Tabela 3) durante todo o processo fermentativo. A queda do teor de trealose pode ser resultante da fermentação endógena da trealose já que não foi observada nenhuma queda na viabilidade (Figura 9, Tabela 3) desta cepa. O acúmulo de trealose pode ocorrer devido a um estímulo de um agente estressante dependente do tempo de exposição (ALCARDE ; BASSO, 1997), porém quando mantidas em condições estressantes, apresentam queda em sua concentração. Portanto, a levedura HCJ 003 pode ter apresentado uma concentração decrescente de trealose ao longo dos ciclos devido à maior pressão osmótica do meio ou a sua maior sensibilidade ao estresse osmótico. No entanto, ainda não é sabido a razão para a diminuição dos níveis de trealose nesta linhagem. Apesar da cepa HCJ 003 apresentar apenas a invertase intracelular, sabe-se que os produtos da hidrólise da sacarose (glicose e frutose) podem ser liberados no meio pela ação dos transportadores de hexose (Hxtp).

Figura 11 - Teor de trealose expresso em gramas/100 gramas de biomassa seca presente nas duas cepas anterior à fermentação e ao final de cada ciclo fermentativo. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Os dados apresentados nas figuras 7 e 16 mostram que a cepa HCJ 003 produziu, de forma consistente, menos biomassa e mais etanol do que a cepa CAT-1 (Tabela 2 e 6). A biomassa e o etanol são gerados em rotas metabólicas distintas portanto se mais açúcar é desviado para a produção de etanol, menos biomassa será formada. O rendimento fermentativo (Figura 12, Tabela 2) foi superior para a cepa HCJ 003 que apresentou um rendimento médio de 87,31% sendo 2 a 4% maior que para a cepa CAT-1 (84,02%). Através deste resultado fica evidente que o transporte da sacarose para o citoplasma celular através de co-transportadores de íons H^+ é eficiente, ou seja, aumenta o rendimento em etanol. O fato de gerar menos moles de ATP (3 moles ao invés de 4) faz com que ocorra um direcionamento maior do metabolismo fermentativo e conseqüentemente há uma menor disponibilidade de ATP para a produção de biomassa o que justifica a cepa HCJ 003 produzir mais etanol e menos biomassa. Tal resultado também revela que apesar da levedura HCJ 003 ser uma cepa laboratorial mostrou-se adaptada às condições da fermentação.

Podemos observar também que os teores residuais de glicose (Figura 13, Tabela 5), frutose (Figura 14, Tabela 5) e sacarose (Figura 15, Tabela 4) ao final de cada ciclo

fermentativo foram relativamente baixos (menores do que 0,03 %), e praticamente iguais entre as duas cepas.

Figura 12 - Rendimento expresso em porcentagem (v/v) das cepas HCJ 003 e CAT-1 ao longo dos três ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Figura 13 - Teor de glicose expresso em porcentagem (%) – gramas/100mL de vinho - das duas linhagens ao longo dos quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Figura 14 - Teor de frutose expresso em porcentagem (%) – gramas/100mL de vinho - das duas linhagens ao longo dos quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Figura 15 - Teor de sacarose expresso em porcentagem (%) – gramas/100mL de vinho -das duas linhagens ao longo dos quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

Figura 16 - Teor de etanol expresso em porcentagem (% v/v) das duas linhagens ao longo dos quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

5.2 Estudo da cinética de metabolização de açúcares: CAT -1, HCJ 003 e BG-1

O quarto ciclo fermentativo, destinado somente a análise da cinética de metabolização de açúcares em condições semelhantes às de fermentação alcoólica industrial, mostrou que as leveduras CAT -1, HCJ 003 e BG-1 apresentaram uma cinética de metabolização e consumo de sacarose, glicose e frutose distintos.

Na metabolização de açúcares pela levedura CAT -1 (Figura 17), notou-se que houve um maior acúmulo de sacarose (Tabela 7) no meio fermentativo até 4 horas de fermentação (1,5%) e um baixo acúmulo dos seus produtos de hidrólise (glicose e frutose, < 0,2%) (Tabela 8), provavelmente indicando que a velocidade de hidrólise de sacarose na cepa CAT-1 seja compatível à velocidade de captação de glicose e frutose, conforme demonstrado anteriormente por Parazzi-Júnior (2006). Parazzi (2006) estudou a atividade de invertase extracelular de diferentes cepas do setor sucroalcooleiro e observou que a levedura CAT – 1 apresentou uma atividade de invertase de $2,50 \text{ g. ART. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{biomassa}$ enquanto que as linhagens PE – 2 e BG – 1 apresentaram uma atividade de 3,89 e $7,47 \text{ g. ART. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{biomassa}$. Assim, a levedura

CAT -1 apresenta uma atividade de invertase relativamente baixa o que justifica o grande acúmulo de sacarose no meio fermentativo, e a presença relativamente baixa de glicose e frutose.

Figura 17 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura CAT -1 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de oito horas

Figura 18 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura HCJ 003 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de oito horas

Figura 19 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura BG - 1 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de oito horas

A linhagem de levedura HCJ 003 é diplóide e não apresenta invertase externa, porém a sua invertase intracelular é sobreexpressada pelo promotor forte *pADH1*. O fato de transportar a sacarose para o interior das células faz com que o rendimento em etanol aumente, e também contribua para a redução nos níveis de glicose e frutose extracelulares, uma vez que a hidrólise de sacarose ocorre no ambiente intracelular. Sabe-se que a hidrólise extracelular da sacarose pode permitir o crescimento de outros microrganismos, incluindo leveduras contaminantes com ausência de invertase (GREIG, TRAVISANO 2004). A produção extracelular de frutose também impõe muitos problemas para o processo industrial devido à lenta utilização da frutose pelas células de *S. cerevisiae* (BETHELS et al, 2004), o que pode resultar em açúcar residual no final da fermentação com conseqüente queda na produtividade (BADOTTI et al, 2008).

No entanto, no caso da cepa HCJ 003, o perfil de metabolização dos açúcares presentes no meio fermentativo foram inesperados (Figura 18). A princípio, esperávamos apenas a presença de sacarose no meio, uma vez que a mesma seja transportada e hidrolisada intracelularmente. No entanto foi observado um acúmulo de

frutose (1,5 %) e glicose (0,6%) no meio, juntamente com sacarose (0,4%), atingido por volta de 4 horas de fermentação. Em vistas destes resultados podemos ter duas situações distintas: 1) A sacarose pode ter sido transportada para o interior das células, e houve extravazamento de glicose e frutose por meio dos transportadores Hxtp, específicos para tais hexoses. Neste caso, acredita-se que a sobre-expressão da invertase intracelular possivelmente tenha feito com que a velocidade de formação dos monossacarídeos durante a hidrólise tenha sido mais rápida do que a velocidade de dissimilação destes para as vias catabólicas/anabólicas; 2) Parte da sacarose pode ter sido hidrolisada no ambiente extracelular devido à presença de invertase extracelular (seja pela presença da invertase intracelular no ambiente extracelular/periplasmático e/ou atividade de outra hidrolase extracelular). No entanto, não podemos descartar o fato de que o meio utilizado neste estudo já contém uma determinada quantidade de glicose (1,47%) e frutose (1,30%), e que isto possa explicar a presença destes açúcares durante o ciclo fermentativo. Para esclarecimento destas dúvidas experimentos extras devem ser conduzidos.

Quanto à cinética de metabolização de açúcares pela cepa BG-1 (Figura 19), é possível notar que esta cepa hidrolisou mais rapidamente a sacarose quando comparada às demais cepas pois apresentou uma menor concentração de sacarose durante o 4º ciclo fermentativo pela manutenção (ausência de picos) na concentração deste dissacarídeo (Tabela 7). Tal comportamento é coerente com o trabalho de Parazzi (2006) pois a cepa BG – 1 tem a maior atividade de invertase e por isso apresenta baixa concentração de sacarose no meio. Já a cepa CAT-1 mostrou-se mais lenta apresentando uma concentração máxima de sacarose de 0,927 g/L após 4 horas de fermentação.

Laluce et al (1991) e Carvalho (2001) estudaram a atividade de invertase de diferentes linhagens de leveduras, mostrando que esta atividade é dependente da linhagem de levedura. Além da linhagem de levedura, a atividade de invertase também sofre influência da concentração do teor alcoólico no meio (ECHEGARAY et al, 1990), da cultura empregada e das características do meio (PATKOU; SEO 1992; FONTANA et al, 1992).

Já no que diz respeito à metabolização dos monossacarídeos, a BG -1 parece ser mais rápida já que as concentrações de glicose e frutose são menores (Tabela 8). Portanto, a levedura BG – 1 além de ter uma alta atividade de invertase também mostrou-se com alta taxa de metabolização de açúcares.

O glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica. Sua principal característica é seu papel como osmorregulador, importante mecanismo que ocorre nas células como reação a fatores ambientais como, por exemplo, o aumento da pressão osmótica. Assim, em resposta a estas alterações e como forma de manutenção da estabilidade celular, esta responde através de mecanismos de osmorregulação, como no caso a produção de glicerol, o que acarreta na diminuição da permeabilidade da membrana e restabelecimento da atividade celular (NEVOIGT; STAHL 1997). A formação excessiva deste composto não é desejável já que para a sua produção a levedura utiliza açúcar do meio de fermentação que poderia ser convertido em etanol. Comparando-se a quantidade de glicerol formado durante a cinética de metabolização de açúcares (Figuras 17, 18 e 19, Tabela 9), a cepa HCJ 003 produziu menos glicerol durante todo o 4° ciclo fermentativo o que pode estar correlacionado a sua menor formação de biomassa. Já a cepa BG-1 foi a maior produtora de glicerol entre as cepas estudadas e quando comparada com a CAT -1, é possível notar que esta cepa também produziu mais glicerol até 4 horas de fermentação. Um dos fatores que pode ter contribuído para esta produção de glicerol é a alta atividade de invertase apresentada por esta linhagem e, conseqüentemente pode ter sido afetado pelo aumento da pressão osmótica, devido ao aumento de monossacarídeos no meio de fermentação até 4 horas de fermentação.

Quanto ao teor de trealose durante o 4° ciclo fermentativo (Figura 20, Tabela 9), notou-se que a levedura CAT -1 manteve teores superiores deste açúcar de reserva quando comparado com a BG – 1 e HCJ 003 (Figura 29). Maiores teores de trealose podem estar relacionados a maior tolerâncias das células frente a distintos estresses. Estes por sua vez são em parte responsáveis pela seleção das leveduras dominantes durante o processo industrial. Os maiores teores de trealose na cepa CAT -1, quando comparada à BG -1 e HCJ 003, pode ser um indicativo da sua maior dominância frente a cepa BG-1 durante o processo industrial brasileiro (BASSO et al., 2008).

Por fim, ambas as linhagens, CAT-1 e HCJ 003 mostraram o mesmo comportamento quanto aos teores de trealose durante o último ciclo fermentativo (Figura 19) diferindo da cepa BG -1 apenas nas primeiras 2 horas de fermentação porém a linhagem CAT -1 manteve teores superiores deste açúcar de reserva quando comparado com as outras linhagens. Maiores teores de trealose podem estar relacionados a maior tolerâncias das células frente a distintos estresses. Estes por sua vez são em parte responsáveis pela seleção das leveduras dominantes durante o processo industrial. Os maiores teores de trealose na cepa CAT -1, quando comparada às demais linhagem, pode ser um indicativo da sua maior dominância frente a cepa BG-1 durante o processo industrial brasileiro (BASSO et al., 2008).

Como citado anteriormente, a trealose exerce uma função de proteção contra condições de estresse e seu acúmulo ocorre com estímulo de um agente estressante dependente do tempo de exposição. Lillie e Pringle (1980) observaram em células de leveduras quando cultivadas em meios desprovidos especificamente de nitrogênio, enxofre ou fósforo, que o glicogênio e a trealose acumularam-se em todos os tratamentos mas em diferentes extensões, obtendo-se os maiores valores destes carboidratos acumulados no tratamento com o meio sem nitrogênio. Portanto, em geral, o acúmulo de trealose é uma resposta às várias limitações e condições de um processo fermentativo. Durante a fermentação alcoólica, os teores de trealose das cepas CAT -1 e HCJ 003 sofreram uma leve diminuição na primeira hora de fermentação sendo recompostos no transcorrer do processo fermentativo. No entanto, conforme discutido acima, os teores finais de trealose foram menores na cepa HCJ 003 e BG -1 do que na cepa CAT-1.

Figura 20 - Teor de trealose expresso em gramas/100 gramas de biomassa seca presente nas cepas CAT -1, HCJ 003 e BG -1 durante o 4º ciclo fermentativo

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A cepa HCJ 003 embora seja uma derivada de uma linhagem diplóide laboratorial manteve-se adaptada às condições do processo mostrando viabilidades elevadas e obtendo-se rendimentos superiores à CAT -1.
- A linhagem CAT-1 manteve teores elevados de trealose quando comparada às demais cepas. Os maiores teores de trealose pode ser um indicativo da sua maior dominância frente às demais cepas durante o processo industrial brasileiro.
- A cepa BG-1 foi a maior produtora de glicerol entre as cepas estudadas e quando comparada com a CAT -1, é possível notar que esta cepa também produziu mais glicerol até 4 horas de fermentação. Um dos fatores que pode ter contribuído para esta produção de glicerol é a alta atividade de invertase apresentada por esta linhagem e, conseqüentemente pode ter sido afetado pelo aumento da pressão osmótica, devido ao aumento de monossacarídeos no meio de fermentação até 4 horas de fermentação.

REFERÊNCIAS

- ALBERTYN, J.; HOHMAN, S.; THEVELIN, J.M.; PRIOR B.A. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high osmolarity glycerol response pathway. **Molecular Cell Biology**, New York, v. 14, p. 4135–4144, 1994.
- ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.54, n.3, p. 189-194, 1997.
- ALVARADO, E.; BALLOU, L.; HERNANDEZ, L.M.; BALLOU, C.E. Localization of alpha 1-3-linked mannoses in the N-linked oligosaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants. **Biochemistry**, Bekerley, v.29, p.2471-2482, 1990.
- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251p. Piracicaba. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1994.
- ANDRIETA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Métodos de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.15, n.6, p.32-35, 1997.
- AMORIM, H.V.; LEÃO, R.M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**, Piracicaba: Fermentec, 2005. 448p.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. **Processo de produção de álcool : controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996.
- ARRUDA, L.; VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.81, p.23-33, 1999.
- AVIEAD, G. Accumulation of trehalose and sucrose in relation to the metabolism of α -glucosides in yeasts of defined genotype. **Biochimica et Biophysica Acta**. Jerusalém, v.40, p.124-134, 1960.

BADOTTI, F. **Modificando o metabolismo de sacarose em *Saccharomyces cerevisiae*. In: Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2005. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

BADOTTI, F.; BATISTA, A.S.; STAMBUK, B.U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, p.119-127, 2006.

BADOTTI, F.; DÁRIO, M.G.; ALVES JR, S.L.; CORDIOLI, M.L.A.; MILETTI, L.C.; ARAUJO, P.S.; STAMBUK, B.U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*, **Microbial Cell Factories**, London, v.7, p.2-11, 2008.

BARFORD, J.P.; PHILLIPS, P.J.; ORLOWSKI, J.H. A new model of uptake of multiple sugars by *S. cerevisiae*. **Bioprocess Engineering**, Berlin, v.7, p.303-307, 1992.

BASSO, L. C. ; ALVES, D. M. G. ; AMORIM, H. V . The antibacterial action of succinic acid formation by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 77-82, 1997.

BASSO, L.C.;AMORIM, H.V.;OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.8, p.1155-1163, 2008.

BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Norwick, v.8, p.26-33, 2004.

BARROS, D.P. **Imobilização da invertase em quitina de Krill (*Euphasia superba*).** 121p. 1990. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

BARNETT, J.A. The utilization of dissaccharides and some other sugars by yeasts. **Advanced Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, New York, v.39, p.347-404, 1981.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos empregando-se as leveduras PE-2, VR-1 e TA. **Relatório Anual de pesquisas em fermentação alcoólica**, Piracicaba, n.18, p.103-137, 1998.

BERTHELS, N.J.; OTERO, R.R.C.; BAUER, F.F.; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.4, p.683-689, 2004.

BRUMM, P.I. ; HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentation. **Biotechnology Letters**, Kew, v.10, p.677-682, 1988.

CABRAL, J. M. F. **Estudo de imobilização de enzimas pelo método dos metais de transição**.150 p.1982. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa, 1982.

CAMPELO, A. F., BELO, I. Fermentative capacity of baker's yeast exposed to hyperbaric stress. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, p.1237-1240, 2004.

CANETTA, E.; ADYA, A.K. Atomic force microscopy: applications to nanobiotechnology. **Journal Indian Chemistry Society**, New Dehli, v. 82, p. 93–118, 2005.

CARLSON, M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces cerevisiae* species. **Journal of Bacteriology**, New York, v.169, p.4873-4877, 2009.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5'ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, Cambridge, v.28, p.145-154, 1982.

_____. Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. **Molecular Cell Biology**, New York, v.3, p.351-359, 1983.

_____. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, Cambridge, v.28, p.145-154, 1982.

CARLSON, M.; CELENZA, J.L.; ENG, F.J. Evolution of the dispersed SUC gene family of *saccharomyces cerevisiae* by rearrangements of chromosome telomeres. **Molecular Cell Biology**, New York, v.5, p.2894-2902, 1985.

CARVALHO, S.C.; **Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica**. 2001. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

CONVERTI, A., ZILLI, M., ROVATTI, M. Effects of glycerol on alcohol fermentation. Inhibition mechanism and diffusion limitations. **Bioprocess Engineering**, Berlin, v. 13, n.5, p. 257-263, 1995.

COSTENOBLE, R.; VALADI, H.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; FRANZÉN, C.J. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Goteborg, v.16, p.1483-1495, 2000.

CROWE, J.H.; WHITTAM, A.A.; CHAPMAN, D.; CROWE, L.M. Interaction of phospholipid monolayers with carbohydrates. **Biochimimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.769, p.151-159, 1984.

CUNNINGHAM, S.; STEWART, G. G. Acid washing and serial repitching a brewing Ale strain of *Saccharomyces cerevisiae* in high gravity wort and the role of wort oxygenation conditions. **Journal Institute of Brewing, London**, v. 106. p. 389-402, 2000.

D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; RUSSEL, I.; STEWART, G.G. A study of ethanol tolerance in yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 9, p. 287–304, 1990.

ECHEGARAY, O.F.; CARVALHO, J.C.M.; FERNANDES, A.N.R.; SATO, S.; AQUARONE, E.; VITOLO, M. Fed batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass & Bioenergy**, London, v.19, p.39-50, 2000.

ELANDER, E e MYRBACK, K. Isolation of crystalline trehalose after fermentation of glucose by maceration juice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.21, p.249-255, 1949.

ELBEIN, A.D. The metabolism of α,α – trehalose. **Advances in Carbohydrate Chememistry and Biochemistry**, New York, v.30, p.227-256, 1974.

ELBEIN, A.D.; PAN, Y.T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifuncional molecule. **Glycobiology**, Oxford, v.13, p.17-27, 2003.

ERASMUS, J.D.; VAN-DER-MERWE, K.G.; VAN-VUUREN, H.J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.3, p.375-399, 2003.

FAO. **Bioenergy**. 2005 Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/009/j4313e.htm>. Acesso em: 14 jan. 2010.

FARRELL, A.E.; PLEVIN, R.J.; JONES, A.D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D.M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, Washington, v. 311, p. 506-508, 2006.

FEREA, T.L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; ROSENZWEIG, F. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.96, p.9721-9726, 1999.

FERNANDES, L.; CORTE-REAL, M.; LOUREIRO, V.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; LEÃO, C. Glucose respiration and fermentation in *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, p.249–253, 1997.

FEREA, T.L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; ROSENZWEIG, F. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.96, p.9721-9726, 1999.

FONTANA, A.; GOMMIDH, C.; GUIRAUD, J.P.; NAVARRO, J.M. Continuous alcoholic fermentation of sucrose using flocculating yeast: The limits of invertase activity. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.14, p.505-510, 1992.

FRISS, J.; OTTOLENGHI, P. Localization of invertase in a strain yeast. **Comptes-Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg**, Carisberg, v.31, p. 259-271, 1959.

GADD, G.M.; CHALMERS, K.; REED, R.H. add, CHALMERS, G.M. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevesiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.48, p249-254, 1987.

GÁSCON, S.; NEUMANN, N. P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and externaç invertase from yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 3, p. 33-38, 1981.

GREIG, D.; TRAVISANO, M. The prisioner's dilemma and polymorphism in yeast SUC genes, **Proceedings the Royal Society**, Houston, v.271, p.25-26, 2004.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 10, p. 141-146, 2006.

GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, n.48, p.55-69, 1991.

HAJNY, G.J.; HENDERSHOT, W.F.; PETERSON, W.H. Factors affecting glycerol production by a newly isolated osmophilic yeast. **Applied Microbiology**, New York, v.8, p.5-11, 1960.

HAZELL P., PACHAURI R.K. Overview. In:_____. **Bioenergy and agriculture:** promises and challenges. Washington: IFPRI, 2006.

HEGGART, H.; MARGARITIS, A.; PILKINGTON, H.; STEWART, R. J.; DOWHANICK, T. M. ; RUSELL, I. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. **Technical Quarterly**, Saint Paul, v. 36, p. 383-406, 1999.

HERRERA, S. Bonkers about biofuels. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, p. 756-759, 2006.

HERWING, C.; DOERRIES, C.; MARISON, I.; VON STOCKAR, U. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.76, p.247-258, 2001.

HOHMANN, S.; BELL, W.; NEVES, M.J.; VALCHX, D & THEVELEIN, J.M. Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and - independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 20, p. 981–991, 1997.

HOTTINGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.220, p.113±115, 1987.

JENNINGS, D.H. Polyol metabolism in Fungy. **Advances in Microbial Physiology**, London, v.25, p. 149-193, 1984.

IHMELS, J.; BERGMANN, S.; GERAMI-NEJAD, M.; YANAI, I.; MCCLELLAN, M.; BERMAN, J.; BARKAI, N. Transcriptional network through the evolution of motif usage. **Science**, Washington, v. 309, p.938-940, 2005.

ISIK, S., ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I.; YAGCI, Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl 2-(3-thienyl) acetate polypyrrole matrices. **European Polymer Journal**, New York, v. 39, p. 2375-2381, 2003.

JENKINS, C. L., KENNEDY, A. I., HODGSON, J. A., THURSTON, P. & SMART, K. A. Impact of serial repitching on Lager brewing yeast quality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v. 61, p. 1-9, 2003.

KELLYS, M.; BIRREN, B.W.; LANDER, E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, London, v.428, p.617-624, 2004.

KOBI, D., ZUGMEYER, S., POTIER S., GUTFREUND, L. J. Two-dimensional protein map of an “ale”-brewing yeast strain: proteome dynamics during fermentation. **FEMS Yeast Research Amsterdam**, v. 5, p. 213-230, 2004.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 104, p.1107-1112, 1993.

LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, R.C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnologies and Bioengineering**, New York, v.37, p.528-536, 1991.

LANDRY, C.R.; TOWNSEND, J.P.; HARTL, D.L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, Oxford, v.15, p.575-591, 2006.

LARSSON, C. & GUSTAFSSON, L. Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeast *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.147, p. 358-363, 1987.

LEITE R.C.C. **Biomassa, a esperança verde para poucos**. 2005. Disponível em : <http://www.agrisustentavel.com/san/biomassa.htm>. Acesso em: 09 dez. 2009.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* responses to nutrient limitation. **The Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.143, p. 1394-1394, 1980.

MADIN, K.A.C.; CROWE, J.H. Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. **Journal of Experimental Zoology**, London, v.193, p.335-342, 1975.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 26, p. 1156-1166, 1984.

MARZA, E.; CAMOUGRAND, N.; & MANON, S. Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 521, p. 47–52, 2002.

MIZOGUSHI, H.; HARA, S. Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 83, p.12–16, 1997.

MOREIRA, J.R. Brazil's experience with bioenergy. In: HAZELL, P.; PACHAURI, R. K. (Ed.) **Bioenergy and agriculture: promises and challenge**. Washington,: International Food Policy Research Institute, 2006.

MUTTON, M. A.; AZANIA, A. A. P. M.; TASSO JÚNIOR, L. C., NOGUEIRA, G. A., VALE, D. W. In: MARQUES, M.O. **Tópicos em tecnologia sucroalcoeira**. Jaboticabal: Ed. UNESP, 2006. 191p.

MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.M.; ATTFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p.145-150, 1997.

MWESIGYE, P.K.; BARFORD, J.P. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v.42, p. 209-306, 1996.

NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; SANCHÓ, E.D.; KORHOLA, M.P. Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.135, p.31-35, 1996.

NEVOIGT, E; STAHL, U. *Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.21, p. 231-241, 1997.

NORDSTRÖM, K. Yeast growth and glycerol formation. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v.20, p. 1016-1025, 1966.

OLIVEIRA, E. P.; SOBRINHO, J. B. S.; NEGREIROS, J. C.; AMAZONAS, L.; ALMEIDA, M. B. A.; ANDRADE, R. A.; PIFFER, T. R. O.; TEIXEIRA, W. S.. **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar - safra 2007/2008, terceiro levantamento**. 13p Brasília: CONAB, 2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/downloads/safra/2lev-cana.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2008.

ORLOWSKI, J.H.; BARFORD, J.P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v.37, p.215-218, 1991.

PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER, M. H. JR. Major facilitator superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 1-34, 1998.

PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.86, p.207-210, 1980.

PANEK, A.D.; MATTOON, J.R. Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relationship between catabolite repression, trehalose synthesis, and mitochondrial development. **Archives of Biochemistry**, New York, v.183, p.306-316, 1977.

PANEK, A.D.; MANSURE, J.J.C.; ELEUTHERIO, E.C.A. **Cryobiology**, San Diego, v.30, p.238-239, 1993.

PARAZZI JR, O. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase**. 106p. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCIA, I.; ROMAY, C; KOTYK, A. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 32, p. 374-378, 1988.

PATKAR, A.; SEO, J.H. fermentation kinetics of recombinant yeast in batchand feed batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.40, p.103-109, 1992.

PFEIFFER, T.; SCHUSTER, S.; BONHOEFFER, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-Producing pathways. **Science**, Washington, v.292, p.504-507, 2001.

PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v.1.

PETROV, V.V.; OKOROKOV, L.A. Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its deenergization. **Yeast**, Davis,v. 6, p. 311–318, 1990.

POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v.5, p.159-165, 1989.

POWELL, C. D., QUAIN, D. E.; SMART, K. A. The impact of brewing yeast age on fermentation performance, attenuation and flocculation. **FEMS Yeast Research, Amsterdam**, v. 3, p. 149-157, 2003.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; DEL OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.86, p.3-10, 2003.

RENEWABLE FUEL ASSOCIATIONS – RFA. **Annual world ethanol production by country**. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics>. Acesso em: 15 jan. 2008.

REDDY, A.; JOHNSON, R.S.; BIEMANN, K.; WILLIAMS, R.S.; ZIEGLER, F.D.; TRIMBLE, R.B.; MALEY, F. Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. **The Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v.263, n.15, p.6978-6985, 1988.

RODRIGUES, M.I. ; ANDRIETTA, M.G.S. **Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicos**. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp, 1995. 54p. (Curso de Extensão).

SAIER, M. H. JR. Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 182, p. 5029-5035, 2000.

SANTOS, E., et al. Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.216, p.652-660, 1982.

SAIER, M. H. JR. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiology and Molecular Biology Review**, New York, v. 64, p. 354 – 411, 2000(a).

SMART, K. A.; WHISKER, S. W. Effect of serial repitching on fermentation properties and condition of brewing yeast. **Journal of the American Society of Brewing Chemistry**, St. Paul, v. 54, p. 41-44, 1996.

STAMBUK, B.U.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.1, p. 73-78, 2001.

STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka v. 89, p. 212-214, 2000.

STAMBUK, B.U.; DA SILVA, M.A.; PANEK, A.D.; DE ARAUJO, P.S. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.170, p.105-110, 1999.

STEWART, L.C.; RICHTMYER, N.K.; HUDSON, C.S. Preparation of trehalose from yeast. **Journal of the American Chemistry Society**, Washington, v.72, p.2059-2061, 1950.

TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v.79, n.5, p.449-452, 1995a.

TOKUOKA, K. A Review. Sugar- and salt – tolerant yeast. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.74, p. 101-110, 1993.

TREVELEIN, J.M. Regulation of Trehalose Mobilization in Fungi. **Microbiology Review**, Amsterdam, v.48, p. 42–59, 1984.

VALDES, C. Ethanol demand driving the expansion of Brazil's sugar industry. **Sugar Journal**, New Orleans, v.70, p. 9-11, 2007.

WALKER-CAPRIOGLIO, H.; RODRIGUEZ, R.J.; PARKS, L.W. Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* from ethanol-induced growth inhibition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p.685–689, 1985.

YAMAGISHI, H., YUUKI, T., KAGAMI, N. YOKOGAWA, Y., SHIBATA, K., MINEMURA, M.; OHYA, Y. Appearance of poor-fermenting variants in Brewing yeast culture. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 2361-2363, 2001.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 2 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no decorrer dos 3 ciclos fermentativos

TRATAMENTO	RENDIMENTO FERMENTATIVO (%)			MÉDIA GERAL	PESO DE FERMENTO (g)			pH			
	R1	R2	R3		P1	P2	P3	pH1	pH2	pH3	pH4
CAT-1	83,02	83,45	84,88		9,94	11,82	12,60	4,72	4,78	4,89	4,84
	83,08	83,53	85,69		9,99	11,85	12,70	4,71	4,79	4,88	4,85
	82,99	83,94	85,59		9,98	12,02	12,92	4,72	4,78	4,88	4,86
	83,03	83,64	85,39	84,02	9,97	11,90	12,74	4,72	4,78	4,88	4,85
HCJ 003	87,30	85,90	88,04		9,51	10,83	11,44	4,71	4,79	4,84	4,92
	86,75	86,15	88,59		10,63	10,88	11,37	4,69	4,79	4,86	4,92
	87,19	86,08	89,79		9,68	10,99	11,52	4,71	4,77	4,86	4,95
	87,08	86,04	88,81	87,31	9,94	10,90	11,44	4,70	4,78	4,85	4,93

ANEXO B

Tabela 3 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre a viabilidade da levedura (%) e taxa de brotamento (%) e taxa de brotamento (%) nos 3 ciclos e os teores de trealose (%) no decorrer dos 4 ciclos fermentativos

TRATAMENTO	VIABILIDADE (%)				BROTAMENTO (%)				TREALOSE (%)			
	V1	V2	V3	V4	B1	B2	B3	B4	TRI	TR1	TR2	TR3
CAT-1	99,70	99,80	99,70	98,70	3,30	3,40	1,50	8,90	3,88	4,84	6,06	7,56
	100,00	99,80	99,80	99,80	4,50	5,00	2,40	7,30	3,84	4,76	5,76	7,84
	100,00	99,80	99,40	98,10	3,20	4,70	1,40	8,40	3,97	4,53	6,37	7,48
MÉDIA	99,90	99,80	99,63	98,87	3,67	4,37	1,77	8,20	3,90	4,71	6,06	7,63
HCJ 003	97,60	98,50	97,60	92,80	18,90	16,10	8,00	15,50	6,95	5,87	4,49	5,24
	98,30	97,80	97,30	96,10	18,40	14,00	8,80	16,60	7,20	5,12	4,70	5,21
	95,90	96,30	97,80	96,90	27,60	19,20	8,30	16,20	7,03	5,82	4,52	5,49
MÉDIA	97,27	97,53	97,57	95,27	21,63	16,43	8,37	16,10	7,06	5,60	4,57	5,31

ANEXO C

Tabela 4 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre os teores de açúcares residuais expressos em ART (%), e sacarose no decorrer dos 4 ciclos fermentativos

TRATAMENTO	ART RESIDUAL (%)				SACAROSE RESIDUAL (%)			
	ART1	ART2	ART3	ART4	SAC1	SAC2	SAC3	SAC4
CAT-1	0,021	0,067	0,048	0,085	0,020	0,043	0,026	0,038
	0,058	0,061	0,033	0,044	0,016	0,011	0,012	0,022
	0,048	0,048	0,051	0,037	0,025	0,015	0,031	0,015
MÉDIA	0,042	0,059	0,044	0,055	0,020	0,023	0,023	0,025
HCJ 003	0,047	0,048	0,051	0,043	0,025	0,024	0,027	0,022
	0,044	0,053	0,037	0,025	0,024	0,032	0,016	0,000
	0,040	0,064	0,032	0,035	0,022	0,037	0,018	0,019
MÉDIA	0,044	0,055	0,040	0,034	0,024	0,031	0,020	0,014

ANEXO D

Tabela 5 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre os teores de açúcares residuais expressos em glicose (%) e frutose (%) no decorrer dos 4 ciclos fermentativos

TRATAMENTO	GLICOSE RESIDUAL (%)				FRUTOSE RESIDUAL (%)			
	G1	G2	G3	G4	F1	F2	F3	F4
CAT-1	0,000	0,022	0,021	0,021	0,000	0,000	0,000	0,025
	0,025	0,018	0,020	0,021	0,015	0,032	0,000	0,000
	0,022	0,032	0,019	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
MÉDIA	0,016	0,024	0,020	0,021	0,005	0,011	0,000	0,008
HCJ 003	0,020	0,023	0,023	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,019	0,020	0,020	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,017	0,025	0,013	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000
MÉDIA	0,019	0,022	0,019	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000

ANEXO E

Tabela 6 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1 e HCJ 003 sobre a quantidade de glicerol e teor de etanol expresso em porcentagem (%) no decorrer dos 4 ciclos fermentativos

TRATAMENTO	GLICEROL (%)				ETANOL (%)			
	GLI1	GLI2	GLI3	GLI4	ETOH1	ETOH2	ETOH3	ETOH4
BG - 1	0,532	0,501	0,419	0,451	8,18	8,52	8,66	8,88
	0,536	0,497	0,429	0,462	8,18	8,52	8,74	8,82
	0,532	0,499	0,446	0,451	8,18	8,56	8,74	8,90
	0,533	0,499	0,431	0,455	8,18	8,53	8,71	8,87
PE -2	0,465	0,463	0,398	0,398	8,58	8,78	8,98	8,96
	0,485	0,468	0,392	0,390	8,54	8,86	9,04	8,98
	0,466	0,490	0,414	0,395	8,56	8,80	9,16	8,94
	0,472	0,474	0,401	0,394	8,56	8,81	9,06	8,96

ANEXO F

Tabela 7 - Estudo comparativo do perfil de metabolização dos açúcares entre as cepas CAT-1, HCJ 003 e BG -1 expressos em sacarose (%) e ART (%) no decorrer do 4 ºciclo fermentativo

TRATAMENTO	SACAROSE(%)								ART (%)							
	SAC 0h	SAC 1h	SAC 2h	SAC 4h	SAC 6h	SAC 8h			ART 0h	ART 1h	ART 2h	ART 4h	ART 6h	ART 8h		
CAT-1	0,032	0,468	0,808	1,584	0,062	0,044			0,033	0,729	1,112	1,964	0,125	0,066		
	0,000	0,511	0,905	1,545	0,049	0,054			0,000	0,801	1,211	1,907	0,102	0,074		
	0,000	0,578	0,950	1,463	0,000	0,030			0,000	0,867	1,267	1,794	0,048	0,032		
MÉDIA	0,011	0,519	0,888	1,531	0,037	0,042			0,011	0,799	1,197	1,888	0,092	0,057		
HCJ 003	0,010	0,020	0,100	0,535	0,022	0,032			0,010	0,269	0,720	2,603	0,054	0,057		
	0,016	0,044	0,120	0,491	0,038	0,029			0,017	0,426	0,838	2,591	0,054	0,046		
	0,016	0,076	0,117	0,245	0,044	0,028			0,017	0,572	1,026	2,325	0,088	0,048		
MÉDIA	0,014	0,047	0,112	0,424	0,035	0,030			0,015	0,423	0,861	2,507	0,065	0,050		
BG - 1	0,000	0,000	0,020	0,029	0,021	0,023			0,000	0,065	0,109	0,506	0,045	0,024		
	0,000	0,017	0,031	0,000	0,014	0,027			0,000	0,092	0,130	0,077	0,036	0,029		
	0,000	0,000	0,016	0,000	0,019	0,023			0,000	0,043	0,137	0,803	0,044	0,042		
MÉDIA	0,000	0,006	0,023	0,010	0,018	0,024			0,000	0,066	0,126	0,462	0,042	0,032		

Tabela 8 - Estudo comparativo do perfil de metabolização dos açúcares entre as cepas CAT-1, HCJ 003 e BG -1 expressos em glicose (%) e frutose (%) no decorrer do 4º ciclo fermentativo

TRATAMENTO	GLICOSE (%)						FRUTOSE (%)					
	GOh	G1h	G2h	G4h	G6h	G8h	FRU 0h	FRU 1h	FRU 2h	FRU 4h	FRU 6h	FRU 8h
CAT-1	0,000	0,083	0,097	0,099	0,025	0,020	0,000	0,154	0,164	0,198	0,035	0,000
	0,000	0,091	0,093	0,089	0,021	0,017	0,000	0,172	0,166	0,191	0,029	0,000
	0,000	0,094	0,096	0,081	0,022	0,000	0,000	0,164	0,171	0,174	0,026	0,000
MÉDIA	0,000	0,089	0,095	0,089	0,022	0,012	0,000	0,163	0,167	0,188	0,030	0,000
HCJ 003	0,000	0,047	0,144	0,622	0,017	0,024	0,000	0,201	0,471	1,419	0,014	0,000
	0,000	0,089	0,173	0,631	0,014	0,015	0,000	0,291	0,538	1,443	0,000	0,000
	0,000	0,118	0,229	0,551	0,027	0,018	0,000	0,374	0,674	1,516	0,016	0,000
MÉDIA	0,000	0,085	0,182	0,602	0,019	0,019	0,000	0,288	0,561	1,459	0,010	0,000
BG - 1	0,000	0,016	0,026	0,125	0,023	0,000	0,000	0,049	0,062	0,352	0,000	0,000
	0,000	0,016	0,025	0,022	0,021	0,000	0,000	0,058	0,072	0,055	0,000	0,000
	0,000	0,000	0,033	0,198	0,024	0,018	0,000	0,043	0,088	0,605	0,000	0,000
MÉDIA	0,000	0,011	0,028	0,115	0,023	0,006	0,000	0,050	0,074	0,337	0,000	0,000

ANEXO H

Tabela 9 - Estudo comparativo entre as cepas CAT-1, HCJ 003 e BG -1 sobre os teores de glicerol (%) e trealose (%) no decorrer do 4° ciclo fermentativo

TRATAMENTO	GLICEROL (%)						TREALOSE (%)					
	GLI 0h	GLI 1h	GLI 2h	GLI 4h	GLI 6h	GLI 8h	TRE 0h	TRE 1h	TRE 2h	TRE 4h	TRE 6h	TRE 8h
CAT-1	0,202	0,250	0,285	0,358	0,403	0,432	12,032	7,419	8,592	9,216	11,662	10,578
	0,204	0,248	0,296	0,369	0,419	0,430	11,559	10,582	8,977	9,952	11,585	10,976
	0,189	0,248	0,298	0,369	0,418	0,429	12,105	9,438	9,233	10,162	11,676	10,789
	MÉDIA	0,198	0,249	0,293	0,365	0,413	11,899	9,147	8,934	9,776	11,641	10,781
HCJ 003	0,173	0,227	0,269	0,313	0,373	0,390	6,898	5,937	6,672	8,412	9,616	8,148
	0,166	0,236	0,271	0,314	0,382	0,385	6,296	5,422	7,146	7,964	9,239	7,989
	0,172	0,236	0,274	0,334	0,387	0,388	5,914	5,905	6,719	8,340	9,608	8,410
	MÉDIA	0,170	0,233	0,272	0,320	0,381	6,369	5,755	6,845	8,239	9,487	8,182
BG - 1	0,191	0,301	0,339	0,442	0,457	0,446	6,815	6,774	4,112	5,669	6,796	7,003
	0,186	0,320	0,345	0,371	0,376	0,374	7,040	5,986	3,745	4,665	7,332	7,621
	0,195	0,298	0,338	0,412	0,442	0,465	6,344	5,903	3,791	5,147	6,855	7,892
	MÉDIA	0,191	0,307	0,341	0,408	0,425	6,733	6,221	3,882	5,161	6,994	7,505