**EFEITO DE AGENTES ESTRESSANTES SOBRE O TEOR DE
TREALOSE EM *Saccharomyces cerevisiae***

HEVENILTON J. MATIAZI

Farmacêutico - Bioquímico

Orientador: Prof. Dr. LUIZ EDUARDO GUTIERREZ

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de concentração: Microbiologia
Agrícola.

**PIRACICABA
ESTADO SÃO PAULO - BRASIL
JANEIRO DE 1995**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Matiazi, Hevenilton J.

Efeito de agentes estressantes sobre o teor de trealose em *Saccharomyces cerevisiae* / Hevenilton J. Matiazi. - - Piracicaba, 1995.
70p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1995.
Bibliografia.

1. Levedura - Fermentação 2. Trealose em levedura - Teor I. Título

CDD 589.23
547.7815

**EFEITO DE AGENTES ESTRESSANTES SOBRE O TEOR DE
TREALOSE EM *Saccharomyces cerevisiae***

HEVENILTON J. MATIAZI

Aprovada em: 24.02.1995

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho

Prof. Murilo de Mello

Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo

ESALQ/USP

CEBTEC/USP

CEBTEC/USP

Prof. Dr. LUIZ EDUARDO GUTIERREZ

Orientador

Dedico

aos meus pais

OLGA e ANTONIO MATIAZI

e ofereço

aos meus irmãos

JORGE, FÁTIMA, CRISTINA e MARA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez, Professor Titular do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pela orientação, incentivo e amizade.

Ao Departamento de Química/ESALQ/USP.

Ao Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pelo fornecimento das leveduras utilizadas no presente trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho, Coordenador do CPG Microbiologia Agrícola, pelo apoio e amizade.

Aos Professores e Funcionários do Setor de Bioquímica pelos auxílios prestados, apoio e amizade.

Ao Técnico de Laboratório, Sr. Luiz Lucatti pelo auxílio nas análises químicas e constante apoio e amizade.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela amizade.

Aos amigos moradores da Vila Estudantil de Pós-Graduação pelo apoio e amizade.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
 1. INTRODUÇÃO	 01
 2. REVISÃO DE LITERATURA	 03
2.1. Trealose	03
2.2. Função da trealose	04
2.3. Mobilização da trealose	07
2.4. Acúmulo de trealose	09
2.5. Agentes estressantes	10
2.6. Potássio na fermentação	13
2.7. Concentração do substrato	14
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 16
3.1. Microrganismos	16
3.2. Ensaio 1	17
3.2.1. Meio para fermentação	17
3.2.2. Condução	17
3.3. Ensaio 2	19
3.3.1. Meio para crescimento	19
3.3.2. Obtenção do inóculo	19
3.3.3. Meio para fermentação	20
3.3.4. Condução	21

	Página
3.4. Ensaio 3	21
3.4.1. Obtenção do inóculo com alto teor de trealose	22
3.4.2. Meio para fermentação e condução	22
3.5. Ensaio 4	23
3.5.1. Condução	23
3.6. Análises	24
3.6.1. Viabilidade celular	24
3.6.2. Determinação do teor de matéria seca	24
3.6.3. Determinação de trealose	24
3.7. Análise estatística	25
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 26
4.1. Ensaio 1	26
4.1.1. Teor de matéria seca	26
4.1.2. Teor de trealose	29
4.2. Ensaio 2	31
4.3. Ensaio 3	34
4.4. Ensaio 4	37
 5. CONCLUSÕES	 40
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 41
 7. APÊNDICE	 52

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº.	Página
1 Composição do meio sintético utilizado no Ensaio 1 de fermentação	18
2 Efeito da concentração dos agentes estressantes, sacarose, sorbitol, KCl e etanol no teor de matéria seca (g/100 ml) de leveduras após fermentação em meio sintético 12% ART (pH 4,5- temperatura 30°C)	27
3 Efeito da concentração dos agentes estressantes, sacarose, sorbitol, KCl e etanol no acúmulo de trealose (g/100g de biomassa seca) de leveduras após fermentação em meio sintético 12% ART (pH 4,5- temperatura 30°C)	30
4 Efeito de diferentes agentes estressantes em concentrações que produziram uma atm de pressão osmótica na produção de biomassa e trealose por 3 diferentes tipos de leveduras	33
5 Efeito da concentração do sorbitol sobre a viabilidade celular (%) em levedura de panificação a 40°C	36
6 Efeito da concentração do sorbitol sobre a viabilidade celular (%) durante fermentação a 40°C com 5% glucose e tampão citrato de K (pH 4,5).....	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº.	Página
1 . Efeito da pressão osmótica com sorbitol sobre a degradação de trealose durante a fermentação endógena	35
2 Efeito da pressão osmótica com sorbitol sobre o acúmulo de trealose durante a fermentação	38

**EFEITO DE AGENTES ESTRESSANTES SOBRE O TEOR DE TREALOSE
EM *Saccharomyces cerevisiae***

Autor: HEVENILTON J. MATIAZI

Orientador: Prof. Dr. LUIZ EDUARDO GUTIERREZ

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a ação de agentes estressantes sobre o acúmulo e a degradação, no teor de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a sacarose, sorbitol, cloreto de potássio e o etanol.

Foram realizados quatro ensaios, sendo que em três deles utilizou-se leveduras de panificação encontradas no comércio, e no outro ensaio foram utilizadas as leveduras M-300-A e uma linhagem isolada da usina Jardest da safra de 1990.

No primeiro ensaio foi realizada uma fermentação utilizando a levedura de panificação e diferentes concentrações (2, 4 e 8%) dos agentes estressantes a uma temperatura de 30°C. Foi observado um maior acúmulo no teor de trealose e menor teor de matéria seca no ensaio com KCL. Com os outros agentes estressantes utilizados (sacarose, sorbitol e etanol), não foram observadas diferenças significativas.

No segundo ensaio a fermentação foi realizada com a levedura M-300-A, Jardest e com a de panificação a uma temperatura de 30°C. Os agentes estressantes foram adicionados em uma concentração que proporcionou uma pressão de 1 atm. Novamente o cloreto de potássio foi o agente estressante que mais influenciou o acúmulo de trealose, assim como o menor crescimento celular observado. Quanto as três linhagens de levedura utilizada, a M-300-A foi a que apresentou o maior acúmulo no teor de trealose e o maior crescimento celular.

O terceiro ensaio foi realizado com o objetivo de verificar o efeito dos agentes estressantes na degradação endógena no teor de trealose em leveduras de panificação. Foi utilizado um meio composto por tampão citrato de potássio, 0,1M e pH 4,5 a 40°C durante um período de quatro horas. Previamente foi estimulado um acúmulo de trealose nas leveduras. Foram utilizadas as concentrações de 8, 16 e 24% de sorbitol. Não foi observada nenhuma alteração significativa na degradação endógena de trealose.

O quarto ensaio foi realizado com o objetivo de verificar o acúmulo de trealose em leveduras de panificação pela ação da pressão osmótica exercida pelo sorbitol em concentrações de 8, 16 e 24%. O meio utilizado era composto por tampão citrato 0,1M e pH 4,5, contendo 5% de glucose. O ensaio foi conduzido a 40°C por um período de quatro horas. O acúmulo de trealose foi observado somente com o controle, atingindo até 17%. Nas concentrações de 8, 16 e 24% não foi observado um acúmulo significativo.

EFFECTS OF STRESSING AGENTS ON TREHALOSE CONTENT

in *Saccharomyces cerevisiae*

Author: HEVENILTON J. MATIAZI

Adviser: Prof. Dr. LUIZ EDUARDO GUTIERREZ

SUMMARY

This research has been carried out aiming at assaying stressing agents action on the accumulation and on the endogenous degradation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* of sorbitol, potassium chloride and ethanol stress.

Four assays were done and including three different commercial baker's yeast M-300 A strain, and a isolate from Jardest sugar plant (1990 harvest season), one test.

In the first assay, fermentation was carried out by using baker's yeast in presence of concentrations (2, 4 and 8%) of the stressing agents at 30°C temperature. It has been observed high influence of KCl on trehalose accumulation together with low. No significant differences were observed when the stressing agents (sucrose, sorbitol and ethanol).

In the second assay, fermentation was carried out by using M-300-A, commercial baker's and Jardest at 30°C. The stressing agents concentration were those to give stressing agents at 1 atm. Again, KCl was the most affecting stressing agent on trehalose accumulation, and cell growth, for out three yeast strains tested. M-300 A had higher trehalose content and cell growth, compared to Jardest and commercial baker's yeast.

The third assay was carried out to look at the effect endogenous trehalose degradation in trehalose accumulation stimulated baker's yeast, through stressing

agents. The growth was buffered with potassium citrate buffer 0,1 M and pH 4,5. The fermentation was performed at 40°C for four hours.

No significant change in endogenous trehalose degradation was observed, for all three different osmotic pressure tested.

The fourth assay was carried out aiming at verifying trehalose accumulation in baker's yeast by sorbitol caused osmotic pressure (at 8, 16 and 24% concentrations) the used must was contained 5% of glucose and was buffered with citrate buffer 0,1 M, pH 4,5. The assay was kept at 40°C for four hours. Trehalose accumulation was observed only in the control treatment, reaching up to 17%. No significant accumulation was observed for the 8, 16 and 24% sorbitol treatments.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos mais utilizados industrialmente pelo homem para a obtenção de etanol e produção de bebidas alcoólicas são as leveduras, principalmente as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

A busca do completo conhecimento e domínio sobre esses microrganismos levam a uma melhoria da qualidade e da quantidade do produto desejado, assim como a uma nova visão e utilização de produtos relacionados a estes microrganismos.

Durante a fermentação alcoólica as leveduras produzem, além do etanol e gás carbônico, outros produtos como álcoois superiores, ácidos succínico e acético, glicerol, aldeídos e armazenam carboidratos na forma de glicogênio e trealose.

PANEK et al. (1990) demonstraram que células de *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de acumular dois tipos de carboidratos quando colocados em condições especiais: a trealose e o glicogênio. Estes carboidratos possuem funções muito importantes na manutenção, diferenciação e sobrevivência das leveduras.

A trealose é um dissacarídeo não redutor cuja função, atualmente aceita, seria a de proteção contra o estresse fisiológico em leveduras.

Sabe-se que o acúmulo desse carboidrato é importante para a manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento de leveduras de panificação,

THEVELEIN (1984). Também o acúmulo de trealose parece contribuir para a proteção das leveduras contra a elevação da temperatura durante o processo fermentativo.

Atualmente a trealose está sendo empregada em diversas áreas da ciência, como por exemplo, na preservação de órgãos à serem transplantados e na integridade das membranas dos lipossomos presentes no sangue liofilizado.

BASSO¹ verificou que após o consumo do açúcar exógeno, a levedura ainda pode produzir mais etanol mediante a fermentação de suas reservas endógenas (trealose), onde 56 litros de etanol absoluto seriam produzidos por tonelada de levedura (massa seca).

PANCHAL & STEWART (1989) observaram que a produção líquida de etanol comparada a produção teórica esperada decai com o aumento da pressão osmótica, seja ela proporcionada pela sacarose ou pelo sorbitol adicionado ao meio fermentativo.

O objetivo do presente trabalho foi de verificar o efeito de agentes estressantes sobre o acúmulo e degradação de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando diferentes concentrações de sacarose, sorbitol, cloreto de potássio e etanol (agente estressante), em diversas condições.

¹ BASSO, L.C. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1991.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Trealose

A trealose (2-p-glucopiranosil (1-1) 2-D glucopiranosídeo) é um dissacarídeo não redutor. O nome trealose é originário de um doce chamado de "trehala manna" que era produzido da pupa de um besouro que vivia no deserto WIENKEN (1990).

A trealose foi primeiramente isolada da ferrugem do centeio por WIGGERS em 1832 e foi extraída pela primeira vez de células de levedura em 1925 por KOCK & KOCK. Ela se encontra localizada no citossol da célula segundo THEVELEIN (1984). Este encontrou que o acúmulo de trealose em fungos estava associado em geral com períodos de reduzida taxa de crescimento. A síntese seria mais intensa durante os processos de diferenciação e períodos de deficiência de nutrientes.

PANEK et al. (1990) verificaram que células de *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de acumular dois carboidratos quando em condições especiais: a trealose e o glicogênio. Estes polissacarídeos possuem uma função muito importante na manutenção, diferenciação e sobrevivência das leveduras.

PANEK (1975) utilizando leveduras de panificação encontrou que o glicogênio não contribui para a síntese de trealose. Para CROWE et al. (1984) o glicogênio poderia ser transformado sob algumas condições em trealose e vice-versa.

Para KELLER et al. (1982) a trealose e o glicogênio podem ser acumulados pelas células em quantidades semelhantes, porém o que difere é o modo de acúmulo e de utilização desses carboidratos.

Em relação às condições de formação de trealose, GRBA et al. (1975) encontraram que a formação desse carboidrato foi mais rápida em levedura de panificação, em condições aeróbias do que em condições anaeróbias, tanto utilizando glucose como maltose como substrato.

PANEK (1975) não detectou a síntese de trealose em anaerobiose, nem em células em jejum e nem semi-anaerobiose. Nessas condições PANEK (1975) atribuiu a ausência de síntese de trealose à carência das enzimas da gluconeogênese e do ciclo de glioxilato e a não ocorrência da interconversão do glicogênio em trealose. No entanto, FRANÇOIS et al. (1991) trabalhando com mutante deficiente em carboquinase de fosfoenolpiruvato, verificou que a síntese de trealose ocorreu concomitante à degradação do glicogênio

2.2. Função da trealose

Em relação a função da trealose, atualmente aceita-se que seja a de proteção das células durante períodos de estresse, e não de carboidrato de reserva.

Segundo LILLE & PRINGLE (1980) para que um composto seja considerado de reserva ele deve ser acumulado quando as fontes externas (carbono, nutriente e outros) são abundantes com o intuito de servir como substrato em períodos desfavoráveis. A trealose possui um comportamento diferente, ou seja, só é acumulada pela célula após a exaustão da glucose no meio durante a fase “lag” de diauxia.

Segundo PANEK (1975), a trealose é somente acumulada quando a glucose foi quase exaurida, atingindo alta concentração dentro da célula durante a limitação de glucose e nutrientes e sugere que a trealose sintetase pode ser mais ativa em baixas concentrações de glucose-6-fosfato.

Segundo GRBA et al. (1975), utilizando levedura de panificação foi encontrado que a formação de trealose depende da quantidade de glucose presente no meio, sendo que, quando termina a glucose cessa a produção de trealose.

WIENKEN (1990) conclui que a função primária da trealose é a de proteção dos componentes do citossol contra condições desfavoráveis. A função em esporos de leveduras em dormência poderia ser a de suprimento de energia, sendo utilizada como fonte de energia para a formação de ATP nessas condições, (BARTON et al. 1982).

Em esporos, que são estruturas muito resistentes ao calor, frio, e desidratação, THEVELIEN (1984), sugere que a trealose teria a função de carboidrato de proteção nessas estruturas, pois verificou que com a germinação do esporo a trealose é rapidamente consumida.

SOUMALAINEN & PFAFFLI (1961) trabalhando com levedura de panificação, verificaram que a maior viabilidade celular e a atividade da levedura eram devidos ao elevado teor de trealose. Nesse caso a função seria a de proteger as células contra a autólise.

A melhor temperatura para o acúmulo de trealose segundo GRBA et al. (1975) foi de 45°C. Segundo os autores é importante selecionar uma temperatura de incubação na qual se obtenha levedura com alto acúmulo de trealose (20%), com essa alta taxa essas leveduras seriam mais resistentes a desidratação.

ATTFIELD (1987), verificou que havia acúmulo de carboidrato quando as células eram expostas aos agentes estressantes como o etanol, sulfato de cobre ou peróxido de hidrogênio a 30°C, indicando que esse acúmulo poderia ser uma resposta geral das células a qualquer tipo de estresse fisiológico.

Os organismos anidrobióticos possuem a capacidade de viver muito tempo no estado de desidratação sendo metabolicamente inertes e muito resistentes a condições ambientais como seca, calor e frio (WIENKEN, 1990). CROWE et al. (1984) verificaram que grande quantidade de trealose é encontrada nesses organismos (até 20% do peso seco).

D'AMORE et al. (1991) testaram 12 cepas de levedura de várias espécies com relação a capacidade dessas células de produzirem etanol a partir de concentrações elevadas de glucose. Eles encontraram que as células produtoras de quantidades mais elevadas de etanol possuíam concentrações iniciais mais altas de trealose, possuindo maiores viabilidades celulares quando estocadas em baixas temperaturas (-20°C) ou em vinho com 5% (v/v) de etanol a 4°C durante 3 dias. Com esses resultados podemos ver a importância do teor de trealose para que tenhamos um maior desempenho das leveduras durante o processo fermentativo.

Há alguns modelos que procuram explicar o efeito de proteção da trealose na membrana das células durante os processos de desidratação/hidratação e congelamento/descongelamento. O modelo mais aceito atualmente é o de que a trealose interage com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana. A trealose segundo o

modelo proposto por CROWE et al. (1984) substituiria a água ligada nas extremidades polares dos fosfolípidios quando em condições favoráveis e seria perdida nos processos de estresse. Com a ligação da trealose à membrana não haveria alteração do espaçamento entre os fosfolípidios, evitando assim as separações laterais de fase dos componentes da membrana. Deste modo, com a substituição das moléculas de água pela trealose não haveria passagem da fase fluída para a fase gel da membrana, sendo com isso mantida a integridade e fluidez das membranas, aumentando a viabilidade das células.

2.3. Mobilização da trealose

A mobilização da trealose observada na fase “lag”, é acompanhada por liberação de CO₂ (PANEK, 1963) e é independente da concentração de glicose do meio (VASCONCELLOS & PANEK, 1978). Entretanto, quando as células são colhidas na fase de crescimento logarítmico e reinoculadas em meio fresco contendo glucose, acumulam grande quantidade de trealose, sugerindo que a síntese ou degradação desse carboidrato está relacionada com o estado fisiológico das células (VASCONCELLOS & PANEK, 1978).

Durante a fase de crescimento exponencial sob aerobiose, ocorrem síntese e mobilização simultânea da trealose, resultando na pequena quantidade dessa reserva armazenada nessas condições. Por outro lado, durante o crescimento das leveduras, há ativação na síntese de aminoácidos, a qual passaria a competir pelo metabólito intermediário comum, a UDP-glucose em detrimento da síntese de trealose (TREVELYAN & HARRISON, 1954; PANEK, 1962).

A possível competição entre as vias de biossíntese de trealose e aminoácidos foi suportada por dados apresentados por TREVELYAN & HARRISON (1954). Esses autores observaram que em meio completo em nutrientes, as células de leveduras acumulam mais aminoácidos e menos trealose, sendo o inverso obtido na ausência de nitrogênio.

Em processo fermentativo (anaerobiose) o metabolismo da trealose em leveduras apresenta comportamento idêntico ao observado em crescimento aeróbico. Há intensa mobilização de trealose logo após a inoculação, correspondendo a maior taxa de fermentação. Após o término do ciclo fermentativo há ressíntese da trealose, seguida estabilização da mesma (TREVELYAN & HARRISON, 1956).

A transferência de células em final de fermentação para meio com glicose e sem nitrogênio não só diminui a quebra da trealose como também leva a uma taxa máxima de fermentação (TREVELYAN & HARRISON, 1954). A quantidade de trealose acumulada no final do processo é acentuadamente maior do que aquela observada na presença de nitrogênio (KUENZI & FIECHTER, 1972; PLAAT, 1974).

A única enzima conhecida como responsável pela degradação da trealose em *Saccharomyces cerevisiae* é a trealase. KELLER et al. (1982) utilizando uma linhagem diplóide de *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que a trealase estava localizada em vacúolos e a trealose no citosol.

A mobilização da trealose, de um modo geral, teria a síntese favorecida quando há superprodução de ATP que desacelera o fluxo glicolítico, (RIBEIRO 1993). LILLE & PRINGLE (1980) relataram que a trealose possui um comportamento no qual o seu acúmulo pela célula, se dá após a exaustão da glucose no meio durante a fase “lag” da diauxia.

2.4. Acúmulo de trealose

Diversos fatores são capazes de afetar o acúmulo de trealose nas leveduras. GUTIERREZ (1990) verificou que houve diferenças entre linhagens ocorrendo menor acúmulo com a *Saccharomyces uvarum* IZ-1904. O mesmo autor verificou maior teor de trealose nas leveduras fermentando meios com maior concentração de sacarose, confirmando observações de CHESTER & BYRNE (1968).

Substâncias que parecem bloquear a entrada de açúcar dentro da célula da levedura como Ni^{+2} também podem provocar redução no acúmulo da trealose. GUTIERREZ et al. (1991a) verificaram que o efeito do Ni^{+2} na redução do acúmulo de trealose foi mais significativo em pH 4,0 do que em pH 5,0.

Trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae*, HOTTIGER et al. (1987a,b) encontraram que com elevação da temperatura de 27°C para 40°C havia um aumento no acúmulo de trealose, sendo que com a transferência das células novamente para 27°C ocorria uma diminuição no nível de trealose. HOTTIGER et al. (1987b) utilizando a mesma levedura encontraram que com a elevação da temperatura de 27 para 40°C havia um aumento de seis vezes na atividade da enzima responsável pela biossíntese da trealose, a trealose fosfato sintase.

PANEK et al. (1990) trabalharam com linhagens de *Saccharomyces* controles e mutantes sendo que uma delas (klg 102) não produzia trealose. Nesse experimento as células cresceram a temperatura de 23°C, sendo submetidas a um estresse térmico (36°C por 90 minutos) e logo após submetidas a um choque térmico (52°C por 2 minutos). Foi encontrado que o mutante que acumulava maior quantidade de trealose foi o mais resistente ao choque

térmico, entretanto, o mutante que não acumulava trealose (klg 102) mostrou boa resistência ao choque térmico, podendo seu desempenho ser comparado ao dos controles. Foi concluído pelos autores que a sobrevivência das células ao choque térmico não está exclusivamente correlacionado com o acúmulo de trealose ou com a síntese de proteínas de choque térmico.

2.5. Agentes estressantes

Os agentes estressantes bem como os inibidores de processos metabólicos podem interferir com o processo de acúmulo da trealose. Assim, a adição de 18 ppm de 2,4 dinitrofenol ao meio fermentativo promove decréscimo significativo no acúmulo de trealose pela levedura de panificação com pouco ou nenhum efeito para *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A e *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 (GUTIERREZ, 1990). Com a adição de nitrito ao meio fermentativo ocorreu aumento no acúmulo de trealose e glicogênio em *Saccharomyces cerevisiae* (GUTIERREZ & ORELLI, 1991).

A presença de ácidos orgânicos no meio de fermentação sejam os produzidos pelas leveduras ou os componentes normais desse meio podem afetar o processo de acúmulo de carboidratos nas leveduras. Meios fermentativos contendo 4200 ppm de ácido acético afetaram 0 significativamente o teor de trealose. (GUTIERREZ et al. 1991b). Entretanto, quanto maior o peso molecular do ácido ou maior a polaridade, o efeito tóxico aumenta sensivelmente, como observado por GUTIERREZ (1993) para o ácido octanóico, quando teores de 240 mg/l reduziram drasticamente o nível de trealose das leveduras.

O etanol é conhecido por inibir a fermentação e causar outros efeitos desfavoráveis às células de levedura, tais como a diminuição na taxa de crescimento e redução na viabilidade celular. Uma das explicações dos efeitos adversos do etanol tem se centralizado na interação deste produto com os lipídios da membrana plasmática, PASCUAL et al. (1988).

NAVARRO & DURAND (1978) observaram que quanto maior a temperatura da fermentação, maior é o efeito inibitório do etanol, tanto endógeno quanto exógeno.

D'AMORE & STEWART (1987) utilizaram diferentes linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e verificaram que, com o aumento da concentração de carboidratos no meio e consequente aumento da pressão osmótica, havia uma elevação na concentração intracelular de etanol no início da fermentação, sendo que após esse período a concentração intracelular e extracelular se igualaram.

Para HOPE & HANSFORD (1982) o álcool tem ação inibitória maior para levedura quando gerado endogenamente do que quando adicionada externamente.

WATSON & CAVICHIOLI (1983) após submeterem as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces sake* a temperatura de 37°C e submetidas ao choque térmico de 52°C por 5 minutos ou crescidas em uma temperatura de 23°C e com choque térmico de 37°C por 30 minutos notaram que estas adquiriram maior tolerância ao etanol, e sugeriram que há produção de proteínas de choque térmico pelas células.

A adição de ácidos graxos (GUTIERREZ, 1991), óleos vegetais (SAIGAL & VISWANATHAN, 1983) e adição de cálcio NABAIS et al. (1988), provocaram uma melhora em relação à tolerância ao etanol durante a fermentação.

INGRAM (1976) estudou o efeito do etanol em células de *Escherichia coli* com relação a alteração que este causa na membrana das células. Ele inferiu que o etanol se insere no interior da biocamada lipídica restringindo a movimentação das cadeias de ácidos graxos ou preenchendo os espaços causados pelos ácidos graxos insaturados; agem assim diminuindo a fluidez da membrana.

Para FARREL & ROSE (1967) a composição lipídica de levedura varia com relação à temperatura. Para BROWN & ROSE (1969) a composição dos ácidos graxos dos microrganismos varia em relação, além da temperatura, com a espécie do microrganismo, a idade da cultura e a composição do meio de cultura.

Foi verificado por ALTHERTHUM & CRUZ (1987) que em temperaturas elevadas há uma predominância de ácidos graxos com cadeias longas e saturadas, em baixas temperaturas há um aumento no grau de insaturação da cadeia carbônica e diminuição da mesma.

GUTIERREZ (1991a) trabalhou com levedura de panificação e obteve que a adição de ácido linoleico ao meio é benéfica para a proteção de células contra o estresse térmico.

CASEY et al. (1984) utilizando a levedura de cervejaria *Saccharomyces uvarum* (carlbengensis) em mostos com alta pressão osmótica em temperaturas de 14, 20, 25 e 30°C, verificaram que em temperaturas mais elevadas (30°C) a levedura apresentava menor viabilidade celular, provavelmente devido a limitação de nutrientes, como oxigênio e o nitrogênio assimilável.

KROWELL & BRABER (1979) testaram uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* e realizaram experimentos elevando a temperatura de 30 para 39°C e encontraram que havia diminuição no crescimento e maior produtividade em álcool com

aumento da temperatura, porém em temperaturas acima de 39,6°C houve predominância de morte das células.

IDRIS EL SHERT & BERRY (1980) utilizaram 12 isolados de levedura para o estudo do efeito do crescimento a 30, 35 e 40°C sobre os conteúdos de ácido nucleico e proteína. Verificaram que a 40°C houve redução no conteúdo de proteína e redução dos níveis de ácido nucleico. PARADA & ACEVEDO (1983) verificaram também que com aumento da temperatura de 23 para 35°C houve diminuição no conteúdo de RNA em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.6. Potássio na fermentação

O potássio foi considerado ser um elemento traço por JONES et al. (1981) baseando-se no seu requerimento pela célula e seu nível adequado à fermentação foi sugerido estar em torno de 390 mg/l, embora AMORIM (1985) tenha relatado um nível maior, em torno de 700 a 1200 mg/l.

Os mecanismos de tolerância ao sal ainda não foram totalmente esclarecidos, parecendo ser distinto entre as várias espécies de levedura consideradas osmotolerante, pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Debariomyces* e *Candida*, TUKUOKA (1993).

A absorção de K^+ é um dos fatores do qual decorre a acidificação do meio extracelular durante a fermentação. Esse transporte é permitido pela diferença de potencial

eletroquímico que é gerada pela extrusão de H^+ com hidrólise do ATP, mediada pelo H^+ - ATPase da membrana plasmática, VILLALOBO (1984).

A habilidade da célula em absorver K^+ deve-se à acidificação intracelular causada pela utilização da glicose, especialmente em fermentação quando ácidos orgânicos são produzidos, (CONWAY & DOWNEY 1950, CONWAY & BRADY, 1950 e SINGLER et al. 1981).

2.7. Concentração do substrato

O efeito de altas concentrações de açúcar sobre o metabolismo da levedura vem sendo estudado, principalmente sob os aspectos dos mecanismos de tolerância frente às altas pressões osmóticas decorrentes.

A alta concentração de substrato permite um alto teor alcoólico, que é desejável a nível industrial pois reduz os custos da destilação, além de propiciar maior assepsia. No entanto, os efeitos danosos são sentidos pela levedura, reduzindo a viabilidade (NAGODAWITHANA et al., 1974, NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976) o crescimento e a fermentação, prejuízos que relaciona-se com o acúmulo de etanol intracelular no início da fermentação, (D'AMORE et al. 1988).

BRUMM & HEBEDA (1988) relataram que nas mais altas concentrações de glicose, a produção de glicerol relativa, ou seja, a razão entre glicerol e etanol ao final da fermentação, decaiu. Isto contrapõe-se à idéia de que, se o glicerol tem função osmorreguladora, para tal, a relação deveria manter-se estável ou crescer. Assim, os autores propõem um mecanismo para produção de glicerol com dois moduladores. Primeiro seria a

pressão osmótica do meio, estimulando a síntese de glicerol como estabilizador. O segundo modulador seria a taxa de fermentação, em altas concentrações de substrato, que sendo absorvido e rapidamente metabolizado, a taxa de formação de NADH a partir da triose-fosfato excede a taxa de redução do acetaldeído, desviando o fluxo glicolítico para a síntese de glicerol. Este, segundo os autores, seria o principal motivo da produção de glicerol.

PANCHAL & STEWART (1989) observaram que a produção de etanol a partir do teórico esperado decai com o aumento da pressão osmótica, seja ela proporcionada pela sacarose ou pelo sorbitol adicionados, devido à produção de glicerol que é aumentada nessas condições.

GUTIERREZ (1989) observou acúmulo de trealose, aumento no crescimento e queda na eficiência fermentativa com o aumento da concentração de açúcar. Como a redução na eficiência fermentativa correlaciona-se com o aumento da produção de glicerol, este é considerado um soluto osmorregulador, o aumento na pressão osmótica decorrente de elevadas concentrações de açúcar ocasionaram um aumento na sua síntese, PANCHAL & STEWART (1989).

Quanto ao acúmulo de trealose, DELGADO (1993) trabalhando com diferentes linhagens de leveduras, e com teores de 5 e 12% de açúcares redutores totais (ART) não constatou tendência significativa com o aumento da concentração de açúcar nos teores finais desse carboidrato, pois com o aumento da pressão osmótica do meio de fermentação de 5 para 12% de ART, houve diminuição do acúmulo de trealose pelas leveduras testadas nas duas concentrações, sendo que o esperado seria ocorrer aumento, devido a pressão osmótica representar um fator estressante para a levedura. Porém a autora observou uma tendência ao maior crescimento das leveduras com o aumento da concentração de glucose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em 4 ensaios de fermentação sem reciclagem de células, com a adição de sorbitol, KCl, etanol e sacarose.

O sorbitol foi escolhido devido ao fato de não ser absorvido e nem metabolizado por células de leveduras.

O KCl foi empregado nesse ensaio pois, na prática, a levedura encontra-se exposta à concentrações que podem atingir até 6.000 mg/l nos meios fermentativos à base de melaço.

Sacarose e etanol foram escolhidos pois estão intimamente relacionados com o processo fermentativo.

3.1. Microrganismos

Nos ensaios de fermentação foram utilizadas as levedura de panificação Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*), obtidas no comércio, inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A (levedura híbrida, IZ-671 x IZ-672, ambas *S. cerevisiae*) TAVARES (1981), e também uma linhagem *Saccharomyces cerevisiae* (BASSO²) isolada da usina Jardest

da safra de 1992, designada provisoriamente de Jardest. Essas leveduras foram obtidas junto ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da USP.²

3.2. Ensaio 1

3.2.1. Meio para fermentação

Esse primeiro ensaio foi realizado com o objetivo de verificar qual dos agentes estressantes selecionados (sacarose, KCl, sorbitol e etanol) atuaria com maior e menor intensidade sobre as leveduras de panificação no acúmulo de trealose, quando utilizado nas concentrações de 2, 4 e 8%.

O meio utilizado para a fermentação no primeiro ensaio foi o meio semi-sintético básico com sua composição descrita na Tabela 1.

3.2.2. Condução

A fermentação foi realizada em frascos com 120 ml de capacidade, onde foram adicionados 50 ml do meio sintético básico. Os frascos foram fechados com papel alumínio e esterilizados a 121°C por 15 minutos. A levedura de panificação foi inoculada

² BASSO, L. C. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1994.

asépticamente e correspondendo a 20 mg/ml, com base na matéria fresca. A fermentação foi realizada em quadruplicata sendo dividida em 4 grupos com 0, 2, 4 e 8% de cada composto (Sacarose, Sorbitol, KCl e Álcool). O pH do meio foi acetado a 4,5 e a temperatura de incubação foi de 30°C.

Tabela 1. Composição do meio semi-sintético utilizado no ensaio 1 de fermentação (pH = 4,5).

Componentes	Quantidade (g/l)
Sacarose	120
Extrato de levedura	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄	0,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
Ácido cítrico	4

Foram realizadas pesagens periódicas dos frascos para a determinação do final da fermentação, considerada quando atingiram peso constante. Após o final da fermentação foram retiradas amostras para a determinação de matéria seca produzida e do acúmulo de trealose.

3.3. Ensaio 2

O ensaio 2 foi realizado com o objetivo de verificar o comportamento dos agentes estressantes (sacarose, sorbitol, KCl e etanol, numa concentração fixa de 1 atm) sobre as leveduras M-300-A, Jardest e a de panificação. Foram analisados o crescimento (matéria seca produzida) e o acúmulo de trealose.

3.3.1. Meio para crescimento

O melaço utilizado para a preparação do meio de crescimento foi proveniente da Usina Santo Alexandre - Mococa da safra de 1990, contendo 64,05% de ART.

As leveduras utilizadas na fermentação foram multiplicadas em laboratório em meio de melaço a 5% de ART com suplementação de fosfato dibásico de potássio 0,5 g/l; sulfato de amônio 1,5 g/l e ácido cítrico 4 g/l.

O pH do meio foi corrigido para 4,5 com hidróxido de potássio 5N. O meio foi adicionado em erlenmeyer e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.3.2. Obtenção do inóculo

A levedura de panificação, a M-300-A e a Jardest, foram inoculadas 15 ml em condições assépticas, inicialmente em erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml de meio de crescimento e tampadas com folha de alumínio e incubadas a 30°C por 24 horas. Após esse

tempo o inóculo foi transferido para erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml do meio de crescimento e novamente incubadas a 30°C por 24 horas. Decorrido esse período o inóculo foi transferido para frascos de 3 litros contendo 2 litros de meio, e incubadas na mesma temperatura e por um período de 36 horas, correspondendo ao final da fermentação.

No final, como a quantidade do inóculo era grande, e por não possuir uma centrífuga com capacidade suficiente para todo o inóculo, os frascos foram levados à geladeira a cerca de 4°C para a decantação por 24 horas, sendo o sobrenadante descartado após esse período.

O precipitado de células foi ressuspensão em 500 ml de água destilada estéril e deixado a decantar por mais 24 horas a aproximadamente 4°C em geladeira.

O teor de matéria seca foi obtido através dessa suspensão de células, retirando 5 ml e transferindo para tubos de ensaio previamente tarados. A partir da obtenção do teor de matéria seca, foram realizados os cálculos do volume a ser inoculado nos frascos de fermentação.

3.3.3. Meio para fermentação

O meio utilizado para a fermentação neste ensaio foi o mesmo descrito na Tabela 1. Ocorrendo apenas variação na porcentagem dos agentes estressantes que foi fixada em 1 atm.

3.3.4. Condução

O ensaio foi realizado com as três leveduras em ensaios separados.

A fermentação foi realizada utilizando frascos de gargalo estreito com 120 ml de capacidade, onde foram adicionados 50 ml do meio semi-sintético básico mais 1 atm de cada composto separadamente sendo realizado em quadruplicata. Os compostos sacarose, sorbitol e o KCl foram esterilizados à 121°C por 15 minutos com o meio sintético básico. O etanol foi adicionado após a esterilização do meio.

As leveduras foram inoculadas assepticamente correspondendo a 20 mg/ml por base da matéria úmida.

Após a inoculação das leveduras, os frascos foram incubados em estufa a 30°C. Para determinar o final da fermentação foram realizadas pesagens periódicas até peso constante.

Após o término da fermentação foram retiradas amostras para a determinação do teor de trealose.

3.4. Ensaio 3

O ensaio 3 consistiu em realizar um tratamento com tampão citrato de K 0,1 M à 40°C e pH 4,5, a partir de um inóculo com alto teor de trealose. Nesse ensaio sem a presença de uma fonte de nitrogênio e de açúcar, o objetivo foi o de verificar o efeito de diferentes concentrações de sorbitol (8, 16 e 24%) sobre a fermentação endógena da trealose.

3.4.1. Obtenção do inóculo com alto teor de trealose

A obtenção do inóculo foi realizada em um meio tampão citrato de K 0,1 M e pH 4,5 contendo 5% de glucose. A levedura utilizada foi a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* obtida no comércio.

A inoculação foi realizada assepticamente e os frascos com o meio foram incubados em banho-maria a 40°C. Foram retirados alíquotas no tempo zero e a intervalos de uma hora até obter um alto teor de trealose aproximadamente quatro horas de incubação.

Após esse período o meio foi centrifugado a 800xG por 15 minutos e o precipitado lavado duas vezes com água gelada.

O precipitado foi transferido para um erlenmeyer de 500 ml e adicionado 200 ml de água destilada esterilizada e deixado decantar em geladeira à 4°C por 24 horas.

Alíquotas de 5 ml foram transferidas para tubos de ensaio previamente tarados para a obtenção da matéria seca.

3.4.2. Meio para a fermentação e condução

O meio para o ensaio 3 consistia de tampão citrato de K 0,1, pH 4,5. O experimento foi realizado em erlenmeyers de 1 litro com 250 ml do meio e 20 mg/ml de levedura, baseado na matéria fresca.

O ensaio foi conduzido a temperatura de 40°C na presença de 0, 8, 16 e 24% de sorbitol.

Aliquotas foram removidas de hora em hora para a determinação do teor de trealose e viabilidade celular.

3.5. Ensaio 4

Este ensaio teve por objetivo verificar o efeito de diferentes concentrações de sorbitol (0, 8, 16 e 24%) numa fermentação com tampão citrato de K 0,1 M em pH 4,5, contendo 5% de glucose em temperatura de 40°C.

3.5.1. Condução

O ensaio foi realizado em erlenmeyers de 1 litro com 250 ml do meio e 20 mg/ml de levedura.

O ensaio foi conduzido em banho-maria a 40°C em 4 frascos onde foi adicionado o sorbitol nas porcentagens de 8, 16 e 24%.

O ensaio teve duração de quatro horas, com retirada de alíquotas de 10 ml (quadruplicata) nas quais eram analisados o teor de trealose e determinada a viabilidade celular.

3.6. Análises

3.6.1. Viabilidade celular

A determinação de viabilidade celular foi obtida utilizando azul de metileno segundo PIERCE (1970).

3.6.2. Determinação do teor de matéria seca

5 ml do meio fermentado foram transferidos para tubos e centrifugados a 450xG durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado após lavagem com água gelada foi seco em estufa a 105-110°C até observação de peso constante.

3.6.3. Determinação de trealose

A análise do teor de trealose foi realizada através de extração com ácido tricloroacético a 0°C, conforme método descrito por TREVELYAN & HARRISON (1956) e determinação pelo método de antrona segundo BRIN (1966).

3.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas segundo GOMES (1987). Os experimentos foram conduzidos com delineamento experimental inteiramente casualizado.

Para a comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey para todas as variáveis analisadas, adotando-se o nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio 1

4.1.1. Teor de matéria seca

Na Tabela 2 podem ser observados os valores de matéria seca de leveduras obtida sob efeito das concentrações de 0, 2, 4 e 8% de sorbitol, sacarose, etanol e KCl.

Os maiores valores para o teor de matéria seca foram obtidos com os controles, chegando a 0,23 g/100 ml. Não foram realizados cálculos estatísticos entre os experimentos, apenas dentro de cada experimento.

Pela Tabela 2 pode-se notar que não houve uma variação significativa no teor de matéria seca nos experimentos onde a sacarose e o sorbitol foram empregados. Apenas ocorreu variação nos ensaios realizados com o cloreto de potássio e o etanol.

O menor valor do teor de matéria seca obtido foi no experimento com KCl a 8%. Neste ensaio o teor de matéria seca diminui com o aumento da concentração do sal.

Tabela 2. Efeito da concentração dos agentes extressantes, sacarose, sorbitol, KCl e etanol no teor de matéria seca de levedura de panificação após fermentação em meio semi-sintético. 12% ART (pH 4,5 - temperatura 30°C).

Composto	%	Teor de matéria seca	dms	CV(%)
Sacarose	0	0,18 A*	0,06	26,78
	2	0,16 A		
	4	0,17 A		
	8	0,11 A		
Sorbitol	0	0,19 A	0,09	22,74
	2	0,17 A		
	4	0,20 A		
	8	0,18 A		
KCl	0	0,18 A	0,09	26,75
	2	0,11 A B		
	4	0,08 A B		
	8	0,01 B		
Etanol	0	0,23 A	0,03	11,60
	2	0,20 A		
	4	0,12 B		
	8	0,02 C		

* Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5% de significância.

TOKUOKA (1993) considera que o complexo mecanismo de tolerância ao sal sugere a produção de polióis para a manutenção do equilíbrio osmótico, da adequada composição do envelope celular (parede e membrana plasmática) bem como de atividade da APTase plasmática capaz de manter baixo o teor de íon dentro da célula.

WATANABE et al. (1991) descreveram a espécie *Saccharomyces cerevisiae* como sensível ao cloreto de potássio. Os autores encontraram uma queda de 50% de ATPase quando exposto a 31.200 mg de K^+ por litro na forma de KCl.

Em nosso ensaio a concentração máxima de KCl utilizada correspondeu a 8%, o que equivale a 80.000 mg/l. Nessa concentração a levedura teria maiores dificuldades para manter seu metabolismo ativo e sua viabilidade, o que acarretou menor teor de matéria seca.

A variação no teor de matéria seca no experimento com o etanol, ocorrendo uma diminuição significativa com o aumento da concentração, pode ser relacionado com o fato do etanol ser um inibidor da fermentação, causando assim uma diminuição na taxa de crescimento e redução na viabilidade celular. Uma das explicações dos efeitos adversos do etanol tem se centralizado na interação deste produto com os lipídios da membrana plasmática (PASCUAL et al. 1988).

INGRAM (1976) estudou o efeito do etanol em células de *Escherichia coli* e inferiu que o etanol e outros álcoois de cadeia curta se inserem no interior hidrofóbico da bicamada lipídica restringindo a movimentação das cadeias de ácidos graxos ou preenchendo os espaços causados pelos ácidos graxos insaturados, agem diminuindo a fluidez da membrana.

4.1.2. Teor de trealose

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do acúmulo de trealose pelas leveduras nas diferentes concentrações de sacarose, sorbitol, cloreto de potássio e atanol.

O maior acúmulo de trealose foi observado no ensaio com KCl, onde, na concentração de 8% o teor de trealose chegou a 11,81 g/100g de biomassa seca. E nas demais concentrações o acúmulo também foi superior ao dos outros compostos empregados.

Relacionando o teor de matéria seca com o acúmulo de trealose, podemos notar que o menor teor de matéria seca e o maior acúmulo de trealose se deram no ensaio com o KCl. Assim podemos relacionar os resultados com os de WATANABE et al. (1991), que relatou a inibição da ATPase causada por uma alta concentração de K^+ no meio, causando uma diminuição na taxa de crescimento das leveduras e consequentemente um aumento no teor de trealose, THEVELEIN (1984) e LILLIE & PRINGLE (1980).

Os ensaios foram realizados individualmente com cada composto, assim como, as cepas eram diferentes. A diferença que pode ser notada no controle do ensaio do cloreto de potássio em relação aos outros ensaios, vem apenas confirmar a ação deste sobre o acúmulo de trealose, pois tendo esse apresentado o menor teor de matéria seca entre todos os ensaios realizados, o acúmulo de trealose foi bem superior. Com o sorbitol a sacarose e o etanol o acúmulo de trealose não variou significativamente entre as diferentes concentrações, houve um pequeno aumento e ocorreu no sentido crescente da concentração.

Tabela 3. Efeito da concentração de diferentes agentes estressantes, sacarose, sorbitol, KCl e etanol no acúmulo de trealose (g/100g de biomassa seca) de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação em meio sintético com 12% de ART (pH 4,5 - temperatura 30°C).

Composto	%	Trealose	dms	CV(%)
Sacarose	0	4,61 B	2,32	19,23
	2	4,85 A B		
	4	5,55 A B		
	8	7,17 A		
Sorbitol	0	4,08 B	1,37	13,14
	2	5,15 A B		
	4	4,75 A B		
	8	5,88 A		
KCl	0	2,56 B	4,49	26,75
	2	8,35 A		
	4	9,24 A		
	8	11,81 A		
Etanol	0	4,08 A B	1,29	17,10
	2	3,14 A B		
	4	2,94 B		
	8	4,29 A		

* Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5% de significância.

4.2. Ensaio 2

Neste ensaio as leveduras foram comparadas em relação ao crescimento e ao acúmulo de trealose, fixando uma concentração de 1 atm para os compostos sacarose, sorbitol, KCl e etanol. O meio utilizado foi o meio semi sintético com pH 4,5 e 12% de ART. As leveduras utilizadas foram Fleischmann, Jardest e a M-300-A.

Ao compararmos as três leveduras em relação ao acúmulo de trealose e crescimento, observa-se que a levedura M-300-A obteve o maior crescimento e o maior acúmulo do carboidrato. GUTIERREZ (1990) também observou a ocorrência desse maior acúmulo com a levedura M-300-A em relação a outras leveduras testadas em seu trabalho. Isso vem contradizer THEVELEIN (1984) que encontrou em seu trabalho, que o acúmulo de trealose em fungos estava associado em geral com períodos de reduzida taxa de crescimento. A explicação poderia estar relacionada com a melhor adaptação da levedura M-300-A a situações estressantes, como por exemplo, a composição de ácidos graxos na membrana citoplasmática, THEVELEIN (1984); HOTTIGER et al. (1987a,b); PANEK et al. (1990); ARTHUR & WATSON (1976), em relação a Jardest e a levedura de panificação, que apresentaram o menor crescimento e menor acúmulo de trealose.

Os maiores acúmulos de trealose encontrados nas três leveduras se deram nos ensaios relacionados com ação do K^+ , o que vem confirmar o ensaio anterior. ROTHSTEIN & DEMIS (1953) relataram que na presença do K^+ o consumo de açúcar aumentava 82%, não por um efeito estimulante direto sobre a fermentação, mas pela reversão do efeito inibitório dos íons H^+ . O que é concordante com PEÑA et al. (1969) que descobriram que

o estímulo de glicólise está relacionado com a absorção de K^+ e, na atividade da H^+ - ATPase para o equilíbrio do pH interno da célula, importante característica da osmotolerância.

O baixo acúmulo de trealose quanto a concentração de sacarose, foi observada também por GUTIERREZ (1990), que observou que a levedura M-300-A apresentou os menores teores de trealose quando o meio variou de 8 a 11% de sacarose.

Os resultados obtidos com o teor de trealose nesse ensaio sugerem que outras variáveis estão envolvidas, como por exemplo a composição em ácidos graxos da membrana citoplasmática das células de leveduras, como descrito por WATSON (1972), a limitação de composto como o magnésio relatada por DOMBEK & INGRAM (1986), a presença de fontes de nitrogênio que ativam a síntese de trealase reduzindo o acúmulo de trealose, DURNEZ et al. (1994).

Com o sorbitol e o etanol não foi possível observar diferenças significativas, pois o crescimento e o acúmulo de trealose variaram entre as três leveduras, o que vem apenas sugerir que outros fatores estão influenciando nos resultados.

Tabela 4. Efeito de diferentes agentes estressantes em concentrações que produziram uma atmosfera de pressão osmótica na produção de biomassa (g/100ml) e trealose(g/100g de biomassa seca) por 3 diferentes tipos de levedura

Leveduras	Compostos**	Biomassa	Composto	Trealose
Panificação	1	0,20 A*	1	4,93 B
	2	0,18 A	2	5,00 B
	3	0,20 A	3	7,41 A
	4	0,12 B	4	5,01 B
	5	0,18 A	5	4,73 B
		inicial	4,09	
DMS	0,03		1,67	
CV(%)	10,03		14,69	
M-300-A	1	0,24 A B	1	8,26 A B
	2	0,20 B	2	7,46 A B
	3	0,28 A	3	10,97 A
	4	0,13 B	4	5,61 B
	5	0,27 A	5	8,12 A B
		inicial		
DMS	0,04		4,52	
CV (%)	19,42		0,87	
Jardest	1	0,15 A	1	3,67 B C
	2	0,13 A B	2	4,39 B
	3	0,15 A	3	5,28 A
	4	0,10 B	4	3,42 C
	5	0,17 A	5	4,50 A B
		inicial	2,50	
DMS	0,04		0,87	
CV(%)	15,29		9,46	

* Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5% de significância.

** Composto 1 - sorbitol 3 - KCl 5 - testemunha
2 - etanol 4 - sacarose

4.3. Ensaio 3

O ensaio 3 foi realizado com um meio composto apenas de tampão citrato 0,1 M e pH 4,5, e foi realizado com o objetivo de observar o efeito da pressão osmótica atuando sobre as células de leveduras, e a ocorrência da degradação endógena de trealose em um meio onde não houvesse a presença de uma fonte de carbono e de nitrogênio que pudessem influenciar nos resultados.

O sorbitol foi o composto escolhido pois não é absorvido pelas células, tendo apenas a função de aumentar a pressão osmótica no meio de fermentação.

Podemos notar pela figura 1 e Tabela 7 (apêndice) que a degradação da trealose endógena, não foi estimulada pela presença de diferentes concentrações de sorbitol no meio. A degradação ocorreu acompanhando uma tendência entre as diferentes concentrações, e foram semelhantes ao comportamento do controle.

Podemos notar que a pressão osmótica exercida pelo sorbitol não exerceu influência na degradação de trealose. A trealase seria a única enzima conhecida como responsável pela degradação da trealose em *Saccharomyces cerevisiae*, e seria ativada segundo THEVELEIN (1983), pelo aumento no nível do AMP-cíclico, ou por uma acidificação intracelular proposta por VALE et al. (1986).

Figura 1. Efeito de diversas concentrações de sorbitol sobre a degradação de trealose durante a fermentação endógena. (Tampão Citrato de K 0,1M a 40°C e pH 4,5).

DURNEZ et al. (1994) verificaram que a ativação da trealase é induzida por uma fonte de nitrogênio presente no meio de fermentação. Como se pode verificar pela Figura 1, a degradação da trealose endógena mesmo em altas concentrações de agente estressante (24% de sorbitol), mostrou uma tendência igual, acompanhando a curva do controle. GUTIERREZ (1993) através da adição de ácido octanóico em mesmas condições de fermentação verificou uma queda bem acentuada na degradação da trealose endógena.

A viabilidade foi acompanhada e não ocorreu alteração durante a fermentação (Tabela 6).

Tabela 5. Efeito da concentração do sorbitol sobre a viabilidade celular (%) de levedura de panificação a 40°C. Fermentação endógena.

Tempo	Controle	Concentração sorbitol (%)		
		8	16	24
Inicial	97,0	97,2	97,0	97,0
1 hora	97,0	96,6	96,1	95,1
2 horas	96,6	96,6	96,7	93,0
3 horas	97,0	97,0	95,2	96,0
4 horas	96,3	95,0	96,0	94,0

4.4. Ensaio 4

Neste ensaio pode-se notar através da Figura 2 e Tabela 8 (apêndice), que o aumento da pressão osmótica no meio fermentativo sem uma fonte de nitrogênio e presença de 5% de glucose como única fonte de carbono a 40°C, não acarretou um acúmulo significativo de trealose em comparação ao controle que atingiu 17%.

O maior acúmulo de trealose verificado no controle poderia ser explicado pela ação da alta temperatura utilizada que foi de 40°C, sendo que esta ação foi de algum modo neutralizada pela presença dos agentes estressantes no meio em relação aos outros ensaios, o que também foi verificado por GRBA et al. (1975).

PARADA & ACEVEDO (1983) verificaram que a 35°C houve menor formação de RNA nas células de leveduras e provocando menor crescimento. Assim quanto menor o crescimento maior o acúmulo de trealose.

O gráfico nos mostra que as curvas seguem uma tendência de queda, porém os frascos contendo diferentes concentrações de sorbitol tiveram um acúmulo bem inferior ao controle. Poderíamos sugerir que o sorbitol estaria agindo como um competidor na absorção de glucose pelas células, pois quanto maior a concentração do sorbitol menor foi o acúmulo de trealose.

GUTIERREZ (1993) verificou que na presença de ácido octanóico, a síntese de trealose foi significativamente inibida a temperatura de 40°C. Segundo o autor essa inibição provavelmente seria devido a ligação do ácido octanóico a hexoquinase ou outra proteína plasmática, ocorrendo inibição da via glicolítica. No presente ensaio ocorreu uma ligeira inibição da síntese, mas não temos condições de afirmar que o sorbitol estaria atuando da mesma maneira.

Figura 2. Efeito da pressão osmótica sobre o acúmulo de trealose durante uma fermentação com tampão citrato de K 0,1M em pH 4,5 contendo 5% de glucose em temperatura de 40°C.

Tabela 6. Efeito da concentração de sorbitol sobre a viabilidade celular (%) de levedura de panificação a 40°C. Contendo 5% de glucose.

Tempo	Controle	Concentração sorbitol (%)		
		8	16	24
inicial	93,0	95,0	94,0	96,0
1 hora	89,0	89,0	82,0	83,0
2 horas	94,0	94,0	86,0	89,0
3 horas	97,0	95,0	89,0	92,0
4 horas	95,0	93,0	87,0	89,0

5. CONCLUSÕES

Dentre os compostos utilizados para a verificação do efeito dos agentes estressantes em *Saccharomyces cerevisiae*, o cloreto de potássio foi o composto que provocou o maior acúmulo de trealose e a menor produção de matéria seca.

Entre as três linhagens de levedura utilizadas, a M-300-A foi a que obteve maior acúmulo de trealose, assim como uma taxa superior de crescimento em relação a Fleischmann e Jardest.

A adição de sorbitol ao meio sem nenhuma fonte de carbono não afetou sensivelmente a degradação endógena da trealose.

Na presença de sorbitol em meio com 5% de glucose o acúmulo de trealose é reduzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERTHUM, F. & CRUZ, M.R.M.G. Aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, **18**(1): 52-7, 1987.
- AMORIM, H. V. Nutrição mineral de leveduras. Aspectos teóricos e práticos. IN: Semana da Fermentação Alcoólica "JAIME ROCHA DE ALMEIDA", 4, Piracicaba, **Anais**, ESALQ/STAB. p. 44-8, 1985.
- AMORIM, H.V. & BASSO, L.C. Pedido de privilégio de Propriedade Industrial junto ao Instituto de Propriedade Industrial, em 18/06/91 sob o número de Depósito 9102738, para o processo denominado "Processo para Aumentar os teores alcoólico do vinho e protéico da levedura após o término da Fermentação". 1991.
- ARTHUR, H. & WATSON, K. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. **The Journal of Bacteriology**, Baltimore, **128**(1): 56-8, 1976.
- ATTFIELD, P.V. Trealose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Letters**, Amsterdam, **225**(12): 259-63, 1987.

- BARTON, J.K.; HOLLANDER, J.A.D.; HOPFIELD, J.J.; SHULMAN, R.G.. ¹³C Nuclear Magnetic resonance study of trehalose mobilization in yeast spores. **Journal of Bacteriology**, **151**(1): 177-85, 1982.
- BRIN, M. Tranktolase: clinical aspects. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., ed. **Method in enzymology**. New York, Academic Press, 1966. v.9, p.506- 14.
- BROWN, C.M. & ROSE, A.H. Fatty-acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolved-oxygen tension. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **99**(2): 371-8, 1969.
- BRUMN, P.I. & HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alchol fermentations. **Biotechnology Letter**, Kew, **10**(9): 677-82, 1988.
- CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-growth brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentation ability, and alcohol production. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, **48**(3): 539-46, 1984.
- CHESTER, V.E. & M.J. BYRNE. Carbohydrate composition and UDP-glucose concentration in a normal yeast and a mutant defficient in glycogen. **Arch. Biochem. Biophys.**, **127**: 298-304, 1968.
- CONWAY, E.J. & BRADY, T.G. Biological production of acid an alkali. **Biochemical Journal**, Cambridge, **47**(2): 360-74, 1950.
- CONWAY, E.J & DOWNEY, M. ph values on the yeast cell. **Biochimsical Journal**, Cambridge, **47**(2): 355-60, 1950.

- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Presentation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. **Science**, Washington, **223**: 701-3, 1984.
- D'AMORE, T. & STEWART, G.G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, **9**: 322-30, 1987.
- D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, **54**(1): 110-14, 1988.
- D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWARD, G.G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, **7**(3): 191-5, 1991.
- DELGADO, D.A. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces* termotolerantes. Piracicaba, 1993. 123p. (Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).
- DE MARTIN, V.F. Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras. Piracicaba, 1987. 190p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. Magnesium and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, **52**(5):975-81, 1986.

- DURNEZ, P.; PERNAMBUCO, M.B.; THEVELEIN, J.M. Activation of trehalose during growth induction by nitrogen sources in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends of the free catalytic subunits of AMP - Dependent Protein Kinase, but not on Functional Ras Proteins. **Yeast**, **10**: 1049-64, 1994.
- ELBEIN, A.D. The metabolism of α,α -trehalose. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, New York, **30**: 227-56, 1974.
- ELEUTHERIO, E.C.A.; DE ARAÚJO, P.S.; PANEK, A.D. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **1156**: 263-6, 1993.
- FARREL, J. & ROSE, A. Temperatures effect on microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, **21**: 101-20, 1967.
- FRANÇOIS, J.; NEVES, M.S.; HERS, H.G. The contro of trehalose biossinthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a catabolite inativation and repression of trehalose-6-phosphate phosphatase. **Yeast**, New York, **7**: 575-87, 1991.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 12.ed., São Paulo, Nobel, 1987. 467p.
- GRBA, S.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H. On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. **European Journal Applied Microbiology and Biotecnology**, Berlin, **2**: 29-37, 1975.

- GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. Piracicaba, 1989. 160p. (Livredocência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz/USP).
- GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, **47(2)**: 597-6-08, 1990a.
- GUTIERREZ, L.E. Efeito da adição de sulfato de amônio sobre a produção de ácido succínico durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, **47(2)**: 597-608, 1990b.
- GUTIERREZ, L.E. & ORELLI, V.F.M. Efeito do nitrito sobre a fermentação alcoólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba,-SP, **48**: 41-54, 1991.
- GUTIERREZ, L.E. Composição em ácidos graxos e viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, **9(6)**: 31-4, Jul/ago. 1991a.
- GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, **48**: 55-69, 1991b.
- GUTIERREZ, L.E.; ANNICCHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L.; STIPP, J.M.S. Efeito do níquel sobre *Saccharomyces cerevisiae* durante fermentação alcoólica. **Acta Biológica Leopoldensia, São Leopoldo**, **13(2)**: 61-74, 1991a.

- GUTIERREZ, L.E.; ANNICCHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L.; STIPP, J.M.S. Efeitos do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. **Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba**, **34(2)**:235-42, 1991b.
- GUTIERREZ, L.E. Changes in trehalose content of baker's yeast as affected by octanoic acid. **Scientia Agrícola, Piracicaba**, **50(3)**: 460-3, out/dez. 1993.
- HOPPE, G.K. & HANSFORD, G.S. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. **Biotechnology Letters, Kew**, **4(1)**: 39-44, 1982.
- HOTTIGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKER, A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. **FEBS Letters, Amsterdam**, **220(1)**: 113-5, 1987a.
- HOTTIGER, T.; SHUMUTZ, P.; WEIMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology, Baltimore**, **169(12)**: 5518-22, 1987b.
- IDRIS EL SHERTH, E.T.A. & BERRY, D.R. Effect of temperature on the protein and nucleic acid content of thermotolerant yeasts. **Biotechnology Letters, Kew**, **2(2)**: 105-10, 1980.
- INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology, Baltimore**, **125(2)**: 670-8, 1976.
- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; FREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry, London**, **16**: 41-9, 1981.

- KELLER, F.; SHELLEMBERG, M.; WIEMKEN, A. Localization of trehalase in vacuoles and trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Archives of Microbiology**, Berlin, **131**: 298-301, 1982.
- KROUWEL, P.G. & BRABER, L. Ethanol production by yeast at supraoptimal temperatures. **Biotechnology Letters**, Kew, **1**(10): 403-8, 1979.
- KUENZ, M.T. & FIECHTER, A. Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. **Archiv Microbiologie**, Berlin, **84**: 254-65, 1972.
- LILLE, S.H. & PRINGLE, J.R. Preserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **143**: 1384-94, 1980.
- NABAIS, R.C.; CORREIA, I.S.; VEIGAS, C.A.; NOVAIS, J.M. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, **54**(10): 2439-46, 1988.
- NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C.; STEINKRAUS, K.H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". **Applied Microbiology**, Baltimore, **28**(3): 383-91, 1974.
- NAGODAWITHANA, T.W. & STEINKRAUS, K.H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **34**: 375-80, 1976.

- NAVARRO, J.M. & DURAND, G. Fermentation alcoholic: influence de la temperature sur l'accumulation d'alcol dans les cellules de levure. **Annales de Microbiologie**, Paris, **129B**: 215-21, 1978.
- PANCHAL, C.J. & STEWART, G.G. Regulatory factors in alcohol fermentations. **Advances in Biotechnology**, **4**: 1989.
- PANEK, A.D. Function of trehalose in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, **100**(3): 422-5, 1963.
- PANEK, A.D. Trehalose synthesis during starvation of baker's yeast. **European Journal Applied Microbiology**, Berlin, **2**(1): 39-46, 1975.
- PANEK, A.C.; MANSURE, J.J.A.; PASCHOALIN, M.F.; PANEK, D. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperature shifts. **Biochimie**, Paris, **72**: 77-9, 1990.
- PARADA, G. & ACEVEDO, F. On the relation of temperature and RNA content to the specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, Easton, **25**: 2785-8, 1983.
- 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, **32**: 374-8, 1988.
- PEÑA, A.; CINCO, G.; PUYOU, A.G.; TUENA, M. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **180**: 1-8, 1969.

- PIERCE, J.S. Institute of brewing: analysis committee measurements of yeast viability. **Journal Institute Brewing**, London, **76**(5): 442-3, 1970.
- PLAAT, J. B. Cyclil 3', 5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. **Biochemical Biophysical Research Communication**, New York, **66**(3): 580-7, 1974.
- RIBEIRO, M.J.S. Estudo de metabolismo de trealose durante o choque térmico a 36°C em *Saccharomyces cerevisiae*. Rio de Janeiro, 1993. 87p. (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- ROTHSTEIN, A. & DEMIS, C. The relation of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, London, **44**: 18-29, 1953.
- SAIGAL, D. & VISWANATHAN, L. Effect of oils fatty acids in the tolerance of distiller's yeast to alcohol and temperatures. **International Sugar Journal**, London, **85**(1017): 266-9, 1983.
- SIGLER, K.; KOTYK, A.; KNOTKOVA, A.; OPEKAROVA, M. Process involved in the creation of buffering capacity and in substrate induced proton extrusion in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **643**(3), 1981.
- SUOMALAINEN, H. & PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. **Journal Institute Brewing**, London, **67**: 249-54, 1961.
- TAVARES, F.C.A. Genetic Engineering For Biotechnology, 1., Piracicaba, 1981. **Proceedings**. Piracicaba, Promocet-ESALQ, 1981. p. 3-6.

- THEVELEIN, J.M. Activation of trehalase by membrane-depolarizing agents in yeast vegetative cells and ascospores. **Bacteriology Journal (4)** p 337-339, 1984.
- THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiological Review**, Washington, **48**(1): 42-56, 1984.
- TREVELYAN, W. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism III. The intracellular level of piruvate during yeast fermentations. **Biochemical Journal**, Cambridge, **57**(4): 556-61. 1954.
- TREVELYAN, W.E. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism, the trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, London, **61**: 177-83, 1956.
- TOKUOKA, K.A. Review. Sgar - and salt - tolerant yeasts. **Journal of Applied Bacteriology**, London, **74**: 101-10, 1993.
- VASCONCELLOS, A.M.H. & PANEK, A.D. Trehalose metabolism during the "lag" phase of growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **IRCS Medical Science**, Lancaster, **6**: 57, 1978.
- VALLE, E. ; BERGILLOS, L. ; GASCON, S. ; PARRA, F. ; RAMOS, S. Trehalase activation in yeast is mediated by an internal acidification. **European Jornal of Biochemistry**, Berlin, v.154, p.247-251, 1986.
- VILLALOBO, A. Energy dependent and potassium translocation by the reconstitute yeast plasma membrane ATPase. **Canadian Journal of Cellular Biology**, New York, **62**(9): 865-77, 1984. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 101(17): 282, dez. 1984.

- WATANABE, Y.; YAMAGUCHI, M.; SANEMITSU, Y.; TAMAI, Y. Characterization of plasma membrane proton - ATPase from salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* cell. **Yeast**, New York, **Z**: 599-606, 1991.
- WATSON, K. & CAVICCHIOLO, R. Acquisition of ethanol tolerance in yeast cell by heat shock. **Biotechnology Letters**, Kew, **5**(10): 683-8, 1983.
- WIENKEN, A. Trehalose in yeast, stress protection rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, **58**: 209-17, 1990.

6. APÊNDICE

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Tabela 7. Efeito da concentração do sorbitol sobre a fermentação endógena de trealose com a levedura de panificação a 40°C.

Tempo	Controle	Concentração sorbitol (%)		
		8	16	24
Inicial	17,0	17,0	17,0	17,0
1 hora	9,3	9,4	10,3	9,8
2 horas	8,0	10,5	9,3	8,6
3 horas	7,5	9,3	8,5	8,6
4 horas	7,7	5,5	7,7	6,5

Tabela 8. Efeito da concentração de sorbitol sobre o acúmulo de trealose em leveduras de panificação a 40°C.

Tempo	Controle	Concentração sorbitol (%)		
		8	16	24
inicial	7,2	7,2	7,2	7,2
1 hora	15,2	12,5	11,5	10,3
2 horas	17,2	11,4	9,9	8,6
3 horas	13,4	12,5	10,9	11,4
4 horas	11,7	10,4	1,2	9,8

Tabela 1. Dados originais e análise de variância do teor de matéria seca (g ms/100 ml) do ensaio 1 em leveduras de panificação com sorbitol.

Concentração de sorbitol (%)	Matéria (g m.s./100 ml) seca
0	0,19
	0,20
	0,12
	0,26
2	0,17
	0,16
	0,16
	0,22
4	0,25
	0,21
	0,17
	0,20
8	0,20
	0,14
	0,16
	0,23

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
Sorbitol	3	0,001875	0,0006250	0,33	0,8036
Resíduo	12	0,022700	0,0018916		
Média Geral = 0,1912500					

Tabela 2. Dados originais e análise de variância do teor de trealose (%) no ensaio 1 com sorbitol.

Concentração de sorbitol (%)	TREALOSE(%)
0	4,17
	3,93
	4,93
	3,30
2	4,95
	5,76
	5,15
	4,76
4	4,15
	4,38
	6,00
	4,49
8	5,49
	5,34
	6,65
	6,01

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
Sorbitol	3	6,78476875	2,2615895	5,31	0,147
Resíduo	12	0,022700	0,0018916		

Média Geral = 4,96812500

Tabela 3. Dados originais e análise de variância do teor de matéria seca (g ms/100 ml) do ensaio 1 em leveduras de panificação com etanol.

Concentração de etanol	Matéria (g m.s./100 ml) seca
0	0,26
	0,23
	0,21
	0,22
2	0,21
	0,20
	0,18
	0,23
4	0,12
	0,13
	0,13
	0,13
8	0,03
	0,02
	0,02
	0,01

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
Etanol	3	0,152018	0,0506729	204,39	0,0001
Resíduo	12	0,002975	0,0002479		

Média Geral = 0,135625

Tabela 4. Dados originais e análise de variância do teor de trealose (%) no ensaio 1 com etanol.

Concentração de etanol (%)	TREALOSE(%)
0	5,56
	4,06
	3,33
	3,38
2	3,28
	3,13
	3,31
	2,87
4	3,16
	2,98
	2,93
	2,71
8	4,93
	4,34
	4,46
	3,46

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
etanol	3	5,40711875	1,80237292	4,70	0,215
Resíduo	12	4,59712500	0,3830937		

Média Geral = 3,618125

Tabela 5. Dados originais e análise de variância do teor de matéria seca (g ms/100 ml) do ensaio 1 em leveduras de panificação com sacarose.

Concentração de sacarose (%)	Matéria (g m.s./100 ml) seca
0	0,18
	0,20
	0,19
	0,16
2	0,19
	0,15
	0,14
	0,16
4	0,14
	0,23
	0,15
	0,19
8	0,02
	0,10
	0,18
	0,14

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
sacarose	3	0,131500	0,0043833	2,46	0,1125
Resíduo	12	0,021350	0,0017799		

Média Geral = 0,157500

Tabela 6. Dados originais e análise de variância do teor de trealose (%) no ensaio 1 com sacarose.

Concentração de sacarose (%)	TREALOSE(%)
0	4,50
	4,85
	4,80
	4,30
2	4,21
	5,20
	4,87
	5,14
4	6,25
	3,84
	7,49
	4,62
8	8,37
	7,25
	5,20
	7,87

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
sacarose	3	15,9776505	5,32588333	4,30	0,271
Resíduo	12	14,6782500	1,2223187		

Média Geral = 5,547500

Tabela 7. Dados originais e análise de variância do teor de matéria seca (g ms/100 ml) do ensaio 1 em leveduras de panificação com KCl.

Concentração de KCl (%)	Matéria (g m.s./100 ml) seca
0	0,16
	0,21
	0,18
	0,18
2	0,02
	0,10
	0,14
	0,18
4	0,07
	0,07
	0,06
	0,12
8	0,02
	0,01
	0,01
	0,02

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
KCl	3	0,253118	0,0084395	4,47	0,0251
Resíduo	12	0,022675	0,0018895		

Média Geral = 0,05562500

Tabela 8. Dados originais e análise de variância do teor de trealose (%) no ensaio 1 com KCl.

Concentração de KCl (%)	TREALOSE(%)
0	2,40
	2,70
	2,77
	2,40
2	8,40
	8,32
	10,40
	6,31
4	12,45
	9,50
	13,77
	11,52
8	12,19
	6,04
	6,40
	12,36

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
KCl	3	182,848568	60,9495229	13,32	0,0004
Residuo	12	54,8956250	4,5746354		

Média Geral = 7,99562500

Tabela 9. Dados originais da Biomassa da levedura M-300 A em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

Compostos	Biomassa (g /100 ml)
sorbitol	0,21
	0,23
	0,25
	0,28
etanol	0,25
	0,19
	0,19
	0,17
KCl	0,25
	0,28
	0,32
	0,22
sacarose	0,11
	0,15
	0,13
	0,14
controle	0,31
	0,23
	0,27
	0,27

Tabela 10. Dados originais do teor de trealose da M-300 A em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

Compostos	TREALOSE(%)
sorbitol	7,95
	7,77
	8,97
	8,37
etanol	8,43
	7,35
	6,98
	7,10
KCL	11,00
	14,10
	7,35
	11,44
sacarose	5,96
	5,05
	5,54
	5,90
controle	4,81
	7,71
	9,87
	10,11

Tabela 11. Análise de variância da biomassa da M-300 A em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
M-300 A	4	0,0616300	0,0154075	7,96	0,012
Resíduo	15	0,029025	0,0019355		
Média geral = 0,2265000					

Tabela 12. Análise de variância do teor de trealose da M-300 A em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
M-300 A	4	59,477070	14,869267	5,07	0,087
Resíduo	15	43,960050	2,9306700		
Média geral = 8,088000					

Tabela 13. Dados originais da Biomassa da levedura de panificação em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

Compostos	Biomassa (g /100 ml)
sorbitol	0,17
	0,24
	0,20
	0,20
etanol	0,16
	0,18
	0,20
	0,19
KCl	0,20
	0,19
	0,19
	0,22
sacarose	0,13
	0,13
	0,13
	0,12
controle	0,17
	0,20
	0,17
	0,20

Tabela 14. Dados originais do teor de trealose da levedura de panificação em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

Compostos	TREALOSE(%)
sorbitol	4,20
	5,20
	5,07
	5,25
etanol	4,11
	5,51
	5,33
	5,07
KCl	8,92
	6,52
	7,61
	6,56
sacarose	5,55
	4,46
	5,33
	4,73
controle	4,20
	5,38
	3,76
	5,60

Tabela 15. Análise de variância da biomassa da levedura de panificação em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
Lev.pan	4	0,147700	0,0036925	11,25	0,0002
Resíduo	15	0,0049250	0,0003283		
Média geral = 0,179500					

Tabela 16. Análise de variância do teor de trealose da levedura de panificação em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
Lev.pan	4	20,054450	5,0136125	8,51	0,0009
Resíduo	15	8,8845500	0,5889700		
Média geral = 5,4200000					

Tabela 17. Dados originais da Biomassa da levedura Jardest em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

Compostos	Biomassa(g /100 ml)
sorbitol	0,13
	0,19
	0,16
	0,15
etanol	0,12
	0,14
	0,12
	0,15
KCL	0,17
	0,14
	0,15
	0,17
sacarose	0,10
	0,09
	0,11
	0,10
controle	0,14
	0,22
	0,15
	0,17

Tabela 18. Dados originais do teor de trealose da levedura Jardest em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

Compostos	TREALOSE(%)
sorbitol	3,69
	3,68
	3,56
	3,78
etanol	4,53
	4,99
	3,78
	4,28
KCl	5,62
	5,41
	4,62
	5,49
sacarose	3,19
	3,27
	3,95
	3,27
controle	4,19
	5,20
	4,28
	4,36

Tabela 19. Análise de variância da biomassa da levedura Jardest em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
Jardest	4	0,012430	0,0031075	6,455	0,0032
Resíduo	15	0,00722500	0,0004816		
Média geral = 0,14350000					

Tabela 20. Análise de variância do teor de trealose da levedura Jardest em um meio contendo 1 atm dos agentes estressantes.

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
Causas de Variação	G.L	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
Jardest	4	8,6998700	2,1749650	13,41	0,0001
Resíduo	15	2,4329500	0,16219667		
Média geral = 4,2570000					