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

**Avaliação da relação C/N no desempenho da levedura
Saccharomyces cerevisiae CAT-1**

Helenilda Rodrigues da Cruz

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

**Piracicaba
2021**

Helenilda Rodrigues da Cruz
Tecnóloga em Biocombustíveis

Avaliação da relação C/N no desempenho da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT- 1

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **SANDRA HELENA DA CRUZ**

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

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Cruz, Helenilda Rodrigues da

Avaliação da relação C/N no desempenho da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT- 1/ Helenilda Rodrigues da Cruz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

69p.

Dissertação (Mestrado) – USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Nitrogênio 2. Sacarose 3. Fermentação 4. *Saccharomyces cerevisiae* I. Título

DEDICATORIA

Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele, eu não teria forças para essa longa jornada,

E, também aos meus familiares, em especial, meus pais, Cely e Antônio, e minha querida vó Maria da Consolação, que sempre apoiaram meus estudos;

Aos meus amigos e demais familiares, pelo incentivo e pelo apoio constante,

E, a todos que me apoiaram de maneira direta ou indireta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre abençoar meus estudos, me dando forças e saúde para superar todas as dificuldades do caminho.

A toda minha família pelo apoio e incentivo, em especial meus pais Cely e Antônio por todo suporte que me deram ao longo da minha vida acadêmica.

A minha orientadora Profa Dra Sandra Helena da Cruz pela paciência e sua imensa ajuda na realização deste trabalho.

A equipe de técnicos do LAN II - Pedro Lucentini, Rosemary Silva e Sylvino Torrezan- por toda colaboração para realização das análises e pela amizade.

A minha querida amiga Andressa Lopez, por me apoiar, incentivar e pelo companheirismo.

A minha amiga Jucy Martins, companheira de mestrado, obrigada pelos conselhos e por sempre me ouvir.

A doutoranda Nádia Viana, pelo auxílio, conselhos e conversas durante todo o percurso do mestrado.

Aos meus colegas de Mestrado Ana Laura Camargo e Matheus Ribeiro pela amizade e conversas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

*“Eu estou sempre fazendo aquilo que não sou capaz,
numa tentativa de aprender como fazê-lo”.*

Pablo Picasso

SUMARIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
HIPÓTESE:	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Panorama sobre o uso do Etanol como biocombustível	17
3.2 Fermentação alcoólica	19
3.3 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.4 Nutrição de leveduras: importância do carbono e nitrogênio	24
3.5 Relação C/N	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Microrganismos	29
4.2 Manutenção das leveduras	29
4.3 Avaliação da cinética de crescimento da linhagem CAT-1	29
4.3.1 Preparo do inóculo	30
4.3.2 Preparo das soluções estoque	31
4.3.3 Cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo YBN e diferentes concentrações de sacarose e fosfato diamônio	31
4.3.4 Cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo extrato de levedura (YE) e diferentes concentrações de sacarose e de fosfato de diamônio	32
4.4 Avaliação do desempenho fermentativo da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo	33
4.4.1 Preparo do inóculo	33
4.4.2 Ensaio fermentativo	33
4.4.3 Análises físico-química e microbiológicas	34
4.4.4 Relação C/N total	36
4.4.5 Cálculos de rendimento e produtividade	36
4.5 Análise estatística	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Caracterização físico-química dos meios	39
5.2 Estudo cinético da linhagem CAT-1 em meio contendo YE, DAP e SAC	42
5.3 Estudo cinético da linhagem CAT-1 em meio base contendo YNB	46
5.3.1 Análise das velocidades máximas e D.O.máx	49

5.3.2 Análise estatística por Superfície de resposta.....	52
CONCLUSOES.....	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS.....	67
Anexo 1. Composição do meio base YNB.....	67
Anexo 2. Composição do extrato de levedura Bacto	68
Anexo 3. Análise físico-química dos meios utilizados.....	69

RESUMO

Avaliação da relação C/N no desempenho da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado no processo de fermentação alcoólica, pois as diferentes linhagens apresentam as características ideais para a produção de etanol, dentre outros atributos pretendidos. No entanto, as células de levedura necessitam de uma série de nutrientes para seu desenvolvimento e desempenho fermentativo; uma fonte de carbono e de nitrogênio são os compostos mais utilizados pelas leveduras, destacando a importância da interação e o fluxo desses nutrientes nos processos metabólicos. As interações entre a fonte de nitrogênio e de carbono contribuem para a melhoria do processo fermentativo, favorecem o crescimento celular, melhoram o desempenho metabólico, além de aumentar a produção de etanol. Visando avaliar a relação carbono/nitrogênio no desempenho fermentativo e crescimento de leveduras, a linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 foi cultivada em meio contendo sacarose (SAC) e fosfato de diamônio (DAP) em diferentes concentrações. O crescimento cinético em meio contendo extrato de levedura (YE) apresentou biomassa maior no meio com 155 g/L de SAC e 10 g/L de YE. No meio contendo YNB a biomassa maior foi nas concentrações de SAC 172 g/L e DAP 8,5 g/L. Quanto ao desempenho fermentativo, a linhagem CAT-1 produziu 86,6g/L de etanol no meio com 155 g/L de SAC e 10 g/L de YE, sem o DAP. Nessas condições a produtividade foi de 3,62 g/L.h. Portanto, nos experimentos realizados com meio contendo extrato de levedura, a presença do fosfato de diamônio (DAP) não resultou em diferença ou melhora tanto no crescimento como na fermentação.

Palavras-chave: Nitrogênio; Sacarose; Fermentação; Carbono

ABSTRACT

Evaluation of the C/N ratio in yeast performance *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the microorganism most used in the alcoholic fermentation process, as the different strains have the ideal characteristics for the production of ethanol, among other intended attributes. However, yeast cells require a series of nutrients for their development and fermentative performance; a source of carbon and nitrogen are the compounds most used by yeasts, highlighting the importance of interaction and the flow of these nutrients in metabolic processes. The interactions between the nitrogen and carbon sources contribute to the improvement of the fermentation process, favor cell growth, improve metabolic performance, in addition to increasing ethanol production. In order to evaluate the carbon / nitrogen ratio in yeast performance and growth, the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 was grown in medium containing sucrose (SAC) and diamonium phosphate (DAP) in different concentrations. The kinetic growth in medium containing yeast extract (YE) showed higher biomass in the medium with 155 g / L of SAC and 10 g / L of YE. In the medium containing YNB the largest biomass was in the concentrations of SAC 172 g / L and DAP 8.5 g / L. Regarding the fermentative performance, the CAT-1 strain produced 86.6 g / L of ethanol in the medium with 155 g / L of SAC and 10 g / L of YE, without DAP. Under these conditions, the ethanol yield was 3.62 g / L.h. Therefore, in experiments carried out with a medium containing yeast extract, the presence of diamonium phosphate (DAP) did not show any difference or improvement in both growth and fermentation.

Keywords: Nitrogen, Sucrose, Fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Sequência de reações enzimáticas na fermentação alcoólica.....	20
Figura 2 . Reprodução assexuada em leveduras, com a formação de brotos	21
Figura 3 . Características de linhagens selecionadas de levedura	23
Figura 4 . Esquema simplificado da formação de espécies redutoras na biossíntese de aminoácidos.....	25
Figura 5 . Esquema utilizado para o estudo cinético da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB com sacarose e fosfato de diamônio (Tr01 a Tr10), meio contendo extrato de levedura (YE) e diferentes concentrações de sacarose e de fosfato de diamônio (Tr11 a Tr14). Br- Controle negativo correspondente.	30
Figura 6 . Cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo extrato de levedura (YE), sacarose (SAC) e fosfato de diamônio (DAP) à 30°C: Tr11 - SAC (52,2 g/L) e DAP (2,9 g/L); Tr12 - SAC (10 g/L) e DAP (10 g/L); Tr13 - SAC (155 g/L) e DAP 0 g/L; Tr14 - SAC (155 g/L) e DAP (10 g/L)	42
Figura 7 . Cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB, fosfato de diamônio e sacarose, a 30°C: Tr01 - SAC (33,4 g/L) e DAP (1,5 g/L); Tr02 - SAC (171,6 g/L) e DAP (1,5 g/L); Tr03 - SAC (33,4 g/L) e DAP (8,5 g/L); Tr04 - SAC (171,6 g/L) e DAP (8,5 g/L); Tr05 - SAC (5 g/L) e DAP (5 g/L); Tr06 - SAC (200 g/L) e DAP (5 g/L); Tr07 - SAC (102,5 g/L) e sem DAP; Tr08 - SAC (102,5 g/L) e DAP (10 g/L); Tr09 - SAC (102, 5 g/L) e DAP (5 g/L); Tr010 - SAC (102,5 g/L) e DAP (5 g/L).	47
Figura 8 . Valores de velocidade específica máxima (h^{-1}) por sacarose (A) ou (B) fosfato de diamônio, DAP, durante cultivo da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB a 30°C.....	52
Figura 9 . (A) Gráfico de Pareto e (B) valores de D.O. esperados por valores de D.O. experimentais	53
Figura 10 . Curva de contorno para a D.O. em função da concentração de sacarose e de fosfato diamônio (DAP) durante cultivo da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB, a 30°C, elaborado no PROTIMIZA.....	54
Figura 11 . Valores de D.O. por concentração de (A) sacarose ou (B) fosfato de diamônio, DAP, durante cultivo da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB a 30°C.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Faixa de estudo das variáveis independentes em análise no planejamento experimental fatorial do tipo 2 ² para cultivo da linhagem CAT-1 em microplacas.	31
Tabela 2 – Valores codificados e configuração experimental no planejamento fatorial do tipo 2 ² das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> .	32
Tabela 3 - Composição dos meios utilizados no estudo cinético.	32
Tabela 4 – Condições utilizadas nos ensaios de fermentação	34
Tabela 5 - Análise físico-química dos meios utilizados	40
Tabela 6 . Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e Densidade ótica máxima (D.O.máx) da linhagem CAT-1 durante cinética de crescimento em meio contendo YE, DAP e SAC em diferentes concentrações*	45
Tabela 7 - Valores de Velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}$, h ⁻¹) e densidade ótica máxima (D.O. máx) da linhagem CAT-1 cultivada em meio contendo YNB, fosfato de diamônio e sacarose, a 30°C.	50
Tabela 8 – Valores obtidos durante cultivo* da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo	56

1 INTRODUÇÃO

O etanol é um dos solventes mais utilizados no mundo e se apresenta como uma alternativa de biocombustível para compor a matriz energética, sendo visto como uma solução para o problema da energia global. A capacidade de suprir a demanda mundial de energia renovável é devido ao custo reduzido de produção do etanol e por apresentar baixo poder poluente (SANTOS et al., 2012).

O processo de obtenção de etanol ou bioetanol consiste na fermentação dos açúcares presentes em plantas como milho, cana-de-açúcar, beterraba e sorgo, com posterior destilação. A cana-de-açúcar é, tradicionalmente, a mais utilizada no Brasil, por apresentar alta produtividade além de ser uma cultura simples (NOVACANA, 2018). A partir de 2015 foi iniciada, no Brasil, a produção de etanol utilizando milho

Na fermentação alcoólica os açúcares são convertidos em etanol pelos microrganismos, sendo que os mais utilizados são linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (RIBEIRO et al., 1999). A *Saccharomyces* é a espécie mais indicada para a realização da fermentação, pois apresenta características ideais para a produção de etanol; dentre os atributos de interesse, destacam-se: alta capacidade de tolerância ao álcool e a variação de temperatura, possui tolerância osmótica, transformam açúcar rapidamente em etanol, além de tolerar ambientes com pH ácido (ANDRIETTA et al., 2006).

Para um bom desempenho da levedura é imprescindível que o meio de cultura contenha uma fonte de carbono e nitrogênio, além de sais e vitaminas. Os principais açúcares utilizados como fonte de carbono pela *Saccharomyces* são galactose, glicose e frutose (monossacarídeos), e sacarose e maltose (dissacarídeos) (FLORES et al., 2000); como fonte de nitrogênio podem ser utilizados os aminoácidos asparagina, glutamina, glutamato ou amônio (CRÉPIN et al., 2012). Estudos afirmam que essas fontes promovem altos índices de crescimento, além de serem muito usados pelas leveduras (MAGASANIK, 1992).

Esses compostos são os mais utilizados pelas leveduras, destacando-se a importância da interação e o fluxo desses nutrientes, que são essenciais nos processos metabólicos. O nitrogênio é um elemento fundamental para as leveduras sendo que suas células conseguem utilizar uma vasta diversidade de componentes nitrogenados como aminoácidos, amônio e peptídeos (CRUZ et al., 2001).

As interações entre a fonte de carbono e de nitrogênio no metabolismo de diversas linhagens industriais de leveduras apresentam grande relevância. E estes elementos contêm uma estrutura complexa e são usados pelas leveduras para obter um melhor desempenho metabólico. Convém ressaltar que a interação entre diferentes fontes de nitrogênio e de carbono, para eficiência da fermentação das leveduras, é um aspecto essencial para a melhoria do processo fermentativo por esses microrganismos, além de aumentar a produção de etanol (SANTOS et al., 2013).

O nitrogênio é um dos elementos mais encontrados nas macromoléculas dos seres vivos sendo fundamental para as funções e estrutura das células. Sabe-se que os organismos vivos contêm mecanismos elaborados de controle para fornecimento contínuo de nitrogênio. Desta forma, parte vital do desempenho celular necessita da assimilação e aquisição de nitrogênio. A ausência ou a baixa concentração de fontes elementares de nitrogênio pode limitar o crescimento celular das leveduras (CRUZ et al., 2002).

Além da presença de nitrogênio, a proporção entre a fonte de carbono e de nitrogênio exercem papel importante no desempenho da levedura, impactando a fermentação cause falte o nitrogênio (BETITE et al., 2012; GOBERT et al., 2019). Além disso, a falta de nitrogênio pode causar paradas ou lentidão na fermentação.

Dentre diferentes fontes de nitrogênio disponíveis para o cultivo, o trabalho de Monteiro (2016) mostrou resultados bastante promissores quando o mosto contendo caldo de cana concentrado foi suplementado com fosfato de diamônio (DAP).

No presente trabalho, a linhagem CAT-1 foi cultivada em diferentes meios contendo sacarose, como fonte de carbono e fosfato de diamônio (DAP), como fonte de nitrogênio. Variando a relação carbono/nitrogênio (C/N) foi avaliado o crescimento e desempenho fermentativo da levedura, buscando determinar se existe uma quantidade ideal de C/N que favoreça o metabolismo celular.

2 OBJETIVOS

Avaliar o desempenho da levedura *S. cerevisiae* linhagem CAT-1, quanto ao crescimento e a fermentação, em diferentes concentrações de sacarose e DAP variando a relação carbono/nitrogênio (C/N). E, determinar se existe uma quantidade adequada desses elementos para o desenvolvimento da levedura que favoreça um melhor desempenho fermentativo.

HIPÓTESE:

Existe uma relação C/N ideal na qual o desempenho fermentativo de *S. cerevisiae* é mais favorecido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Panorama sobre o uso do Etanol como biocombustível

O etanol pode ser obtido a partir de diferentes matérias primas como a cana-de-açúcar, milho, sorgo, beterraba, batata, mandioca, trigo, entre outros. No entanto, as mais utilizadas para uso do etanol como biocombustível, são o milho e a cana-de-açúcar (BALAT, 2011).

O etanol de cana-de-açúcar apresenta uma vantagem com relação ao etanol de milho, visto que, para cada hectare de cana plantado são produzidos 6800 litros de etanol, já a mesma área cultivada com milho produzem em média 3200 litros de álcool, isto é, a cana-de-açúcar apresenta maior rentabilidade se comparado ao milho (AQUINO et al., 2014). Tradicionalmente, no Brasil o etanol é proveniente da cana-de-açúcar, e nos Estados Unidos o etanol é produzido a partir do milho (SALLA et al., 2010). Entretanto, segundo dados da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA), cinco usinas de etanol de milho estavam em operação no Brasil no início de 2020 (NovaCana¹, 2020),

A cana-de-açúcar foi inserida no Brasil pelos portugueses no início do século XVI. Atualmente, ela é uma cultura duplamente importante para o país, uma vez que, a cultura ocupa 8,4 milhões de hectares, produzindo mais de 650 milhões de toneladas ao ano (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2020), fazendo com que o país seja o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo. E, é a partir dela que são obtidos dois produtos essenciais para a economia brasileira: o açúcar e o álcool, esse utilizado tanto na fabricação de bebidas alcoólicas como na forma de combustível para os carros (AGRIMEC, 2018). O país tomou conhecimento da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar ainda no período colonial, quando os agricultores produziam cachaça (BASSO; ROSA, 2010).

Em meados da década de 70, devido à crise do petróleo, o Brasil buscou diminuir sua dependência por combustíveis fósseis, reduzindo as importações de petróleo. Com isso, em 1975 iniciou o programa PRÓ-ALCOOL, com a finalidade de aumentar a produção de etanol, proporcionando benefícios financeiros aos produtores e baixando os impostos para os consumidores (BORGES et al., 2015).

¹ <https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/producao-etanol-milho-brasil-saltar-86-2020-21-unem-210120>

A partir da década oitenta o uso do etanol vem crescendo, sendo usado em vários países como combustível alternativo. A produção mundial de etanol teve um aumento considerável de 2007 (49,7 bilhões de litros) para 2015 (96,8 bilhões de litros) (AZHAR et al., 2017), sendo que o Brasil é responsável por, aproximadamente, um terço dessa produção.

A produção de etanol de cana-de-açúcar é uma tecnologia com capacidade para produzir biocombustível com eficiência e economia, havendo capacidade para substituir a gasolina (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Atualmente, esse biocombustível é um dos mais utilizados no mundo, sendo produzido em grande quantidade pelo Brasil e Estados Unidos. Ele pode ser misturado à gasolina com facilidade sendo usado em motores de ignição por faísca. Ou pode ser usado em carros de passeio na forma de etanol hidratado ou misturado com a gasolina (etanol anidro). Veículos de combustível flexível podem usar o etanol hidratado em qualquer proporção (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008).

O etanol hidratado é composto de 95% de etanol e o restante é água; o etanol anidro, resultado da desidratação do etanol hidratado, possui no máximo 0,4% de água (SZWARC, 2010).

No Brasil, o uso do etanol misturado com a gasolina é obrigatório por lei, sendo 27% desde 2015. Esse combustível é sinônimo de orgulho nacional devido a sua eficiência energética e sustentabilidade. O uso do etanol evitou a emissão de 535 milhões de toneladas de CO₂eq na atmosfera até fevereiro de 2019 (UNICA, 2019).

A produção de etanol tem crescido constantemente e as previsões indicam que continuará a crescer pelas próximas décadas devido a sua grande capacidade de substituir os combustíveis fósseis e prover de fonte renovável, além de melhorar a segurança energética e reduzir os déficits comerciais (CRUZ; RESENDE; RIBEIRO, 2018). Vários países começaram a produzir seu próprio etanol ou aderiram ao uso deste como combustível, afim de reduzir a dependência de petróleo e diminuir as emissões de gases de efeito estufa (LOPES et al., 2016).

Esse combustível pode ser obtido pela rota química que consiste na hidratação do etileno ou pelo processo microbiológico. A rota mais utilizada na indústria mundial é o processo microbiológico, conhecido também como fermentação alcoólica/ etanólica. Esse processo é realizado, principalmente, pela

levedura *Saccharomyces cerevisiae*, embora outros microrganismos também sejam capazes de produzir etanol (LOPES et al., 2016).

3.2 Fermentação alcoólica

O processo de fermentação é conhecido desde a antiguidade, sendo descrito como um processo bioquímico complexo (LOURENCETTI et al., 2017); consiste na transformação dos açúcares em etanol e CO₂ por meio de reações enzimáticas que ocorrem no interior das células de leveduras, principalmente, *S. cerevisiae* que metaboliza os açúcares em condições anaeróbicas. Essas reações são realizadas pelas leveduras para obter energia para suas funções vitais, liberando etanol e CO₂ (AMORIM, 2005).

Os açúcares como frutose e glicose, presentes no caldo da cana-de-açúcar ou oriundos da hidrólise da sacarose, são convertidos pelo processo da glicólise, em energia celular (ATP) produzindo o ácido pirúvico. Após a formação do piruvato, as reações acontecem em duas etapas: o piruvato sofre descarboxilação em uma reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, produzindo acetaldeído e a seguir a enzima álcool desidrogenase age sobre o acetaldeído reduzindo-o a etanol (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

Esse processo envolve 12 reações em uma sequência ordenada, sendo cada uma catalisada por uma enzima específica (Figura 1). Essas enzimas sofrem ação de diversos fatores, que pode favorecer ou reprimir a ação enzimática; portanto, esses fatores afetam o desempenho do processo de fermentação realizado pelas leveduras (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Os fatores que afetam o desempenho das leveduras são a concentração de substrato, pela pressão osmótica exercida, a concentração de etanol, pelas interações que ocorrem com a membrana das células, além de altas temperaturas e a acidez do mosto (JOHN et al., 2012)

A levedura é um microrganismo facultativo, ou seja, ela possui capacidade de ajustar seu metabolismo, tanto em ambientes aeróbicos como em anaerobiose. Desta forma em condições de aerobiose os açúcares são transformados em biomassa, H₂O e CO₂, enquanto que em anaerobiose a maior parte dos açúcares são transformados em etanol e CO₂. Os produtos finais da fermentação dependem das condições ambientais as quais a levedura está exposta no meio fermentativo (SANTOS; GUSMÃO; GOUVEIA, 2010).

3.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo unicelular, heterotrófico e facultativo (SANTOS et al., 2018), podem ser encontradas no ar, água e solo, além de haver algumas que vivem como parasitas em animais e insetos (PHAFF et al., 1987) e são capazes de resistir às condições estressantes da fermentação, possuindo os requisitos necessários para a realização deste processo (ANDRIETTA et al.; 2007). Sua reprodução pode ser assexuada por fissão, brotamento ou sexuada por formação de ascósporos (CECCATO-ANTONINI, 2010).

De acordo com Russel e Stewart (1998), quando a levedura se reproduz assexuadamente, uma célula de levedura se divide, dando origem a uma célula filha (Figura 2). A separação celular ocorre quando as camadas da parede celular se separam, deixando a cicatriz do broto na célula-mãe e a cicatriz do nascimento na célula-filha. A cicatriz do broto é composta principalmente de quitina.

Figura 2. Reprodução assexuada em leveduras, com a formação de brotos

Fonte: SANTOS (2008)

A maioria das definições sobre a estrutura celular das leveduras são baseadas na espécie *S. cerevisiae*. Devido ao seu modo de reprodução, condição de cultivo, idade e cultura, a célula de levedura pode apresentar diferentes formas e tamanho; as mais comuns são a esférica, globosa, ovoide e alongadas (AMORIM, 2005). As leveduras possuem tamanhos que variam de 1 a 5 μm de largura e 5 a 30 μm de comprimento (PELCZAR, 1997). Esse fungo eucarioto unicelular foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma sequenciado, sendo considerado um microrganismo modelo para diversas pesquisas (GOFFEAU et al., 1996).

A levedura foi um dos primeiros microrganismos a ser utilizado pela humanidade; há mais de 4000 anos os egípcios já usavam esses microrganismos para a obtenção de pães e bebidas alcoólicas mesmo sem saber de sua existência nos processos fermentativos. Em 1680, Antonie Van Leewenhoek observou pela primeira vez a presença deste microrganismo em uma amostra de cerveja em fermentação, utilizando um microscópio (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A descoberta das atividades metabólicas dos microrganismos em no início do século 19 favoreceu o avanço no desenvolvimento de processos industriais que utilizam as leveduras em seus diversos procedimentos. Dessa maneira, diversos processos fermentativos foram desenvolvidos com grande eficiência para a produção do etanol e diferentes produtos metabólicos utilizando bactérias, fungos filamentosos e as leveduras (MATTANOVICH et al., 2014). As leveduras têm sido utilizadas em diferentes processos fermentativos para produção de etanol combustível, bebidas e alimentos fermentados (AMORIM et al., 2011; SICARD; LEGRAS, 2011).

Com relação ao processo industrial de produção de etanol, diferentes linhagens de *S. cerevisiae* têm sido utilizadas. Nos últimos anos, as linhagens CAT-1 e PE-2 vem sendo utilizadas com sucesso pelas destilarias brasileiras nos processos de fermentação. Durante muitos anos essas cepas têm demonstrado dominância e persistência nas fermentações industriais (AMORIM et al., 2011). Ambas eram linhagens consideradas nativas, que viviam presentes nos processos fermentativos, até serem selecionadas para comercialização; essas leveduras se caracterizam pela eficiência nos processos fermentativos (BROWN et al., 2013). Segundo Basso et al. (2008), essas linhagens são utilizadas de 14-19 anos nos processos industriais, por apresentarem grande capacidade de fermentação.

Essas leveduras selecionadas apresentam maior competitividade em relação as linhagens contaminantes, representando em algumas destilarias a biomassa total no final de uma fermentação. A maior parte das destilarias no Brasil utilizam uma ou uma mistura dessas duas leveduras como iniciadores do processo fermentativo, representando cerca de 80% de levedura comercializada. Elas são responsáveis por mais de 60% da produção do etanol brasileiro (NASCIMENTO; FONSECA, 2019).

A linhagem CAT-1 é uma das linhagens que mais se destaca por possuir uma capacidade fermentativa muito eficiente em mosto com altas concentrações de

açúcar, além de possuir alto potencial para a produção de bebidas alcoólicas (BABRZADEH et al., 2012). Estudos realizados por Monteiro et al. (2018), com as linhagens CAT-1 e PE-2 utilizando alta concentração de açúcar (VHG), mostrou que com 25°Brix, a linhagem CAT-1 produziu 5% a mais de etanol total que a PE-2, a 35°Brix, a produção de etanol pela CAT-1 aumentou a um valor agregado de 145 mL L⁻¹, enquanto a PE-2 apresentou uma redução adicional de 5% no etanol total.

A linhagem CAT-1 foi utilizada por Moreira et al. (2013) como padrão para comparar o desempenho de leveduras nativas isoladas de processos de fermentação para produção de etanol; os autores concluíram que a linhagem CAT-1 apresentou eficiência fermentativa em média 4,5% superiores comparado com as demais linhagens, em sistema descontínuo de fermentação com reciclo de células.

Na Figura 3 estão apresentadas algumas características de leveduras selecionadas e utilizadas em processos industriais. A linhagem CAT-1 apresenta algumas características superiores as demais, principalmente quando comparada com a PE-2.

Parâmetro	Referência	SA-1	BG-1	CAT-1	PE-2
Y_{X/S}	0,04	0,044	0,0463	0,0409	0,0479
Y_{P/S}	0,46	0,4665	0,4642	0,4694	0,4637
Prod	2,50	2,6579	2,1971	2,5674	2,5113
VCS	5,80	6,0803	5,0518	5,8369	5,7802
Conv	90	93,96	79,07	90,48	89,82
Prod esp	0,48	0,4420	0,4183	0,4799	0,4042
VCS esp	1,05	0,9535	0,9069	1,0288	0,8772

Onde:

- **Y_{X/S}**: rendimento de células;
- **Y_{P/S}**: rendimento de produto;
- **Prod**: produtividade;
- **VCS**: velocidade de consumo de substrato;
- **Conv**: conversão de substrato;
- **Prod esp**: produtividade específica;
- **VCS esp**: velocidade de consumo de substrato específica.

Figura 3. Características de linhagens selecionadas de levedura

Fonte: <http://www.fatecc.com.br/alunos/apostilas/tecnicoagricola/acucarealcool/apostilacucarealcool.pdf>.

As características diferenciadas entre as linhagens de levedura são utilizadas para selecionar linhagens mais adaptadas ao processo. A cariotipagem é uma técnica que tem auxiliado na seleção de novas linhagens de leveduras, por exemplo, PE-2, CAT-1, FT858L e a Fermel que foi selecionada em 2014. Além disso, essa técnica permite compreender melhor o comportamento das leveduras durante o período da fermentação (LOPES et al., 2015). A utilização de cepas de leveduras selecionadas do ambiente de produção pode contribuir para a eficiência maior da fermentação (CAMPOS et al., 2009), pois para serem selecionadas apresentavam maior tolerância aos estresses do ambiente.

3.4 Nutrição de leveduras: importância do carbono e nitrogênio

As fontes de carbono e nitrogênio se encontram em uma estrutura complexa e diversa na natureza. Esses compostos são os principais nutrientes presentes em um mosto de fermentação, isso indica que a interação desses elementos desempenha uma função essencial no metabolismo das leveduras. Os microrganismos conseguem utilizar vários compostos como fonte de carbono e nitrogênio (CRUZ; BASTITOTE; ERNANDES, 2003).

As principais fontes de carbono utilizadas pelas leveduras são a glicose e a frutose, esses açúcares são usados rapidamente pelas células (SCHNEPER; DUVEL; BROACH, 2004). Como fonte de nitrogênio elas têm preferência por glutamato, glutamina, asparagina e amônio. A levedura utiliza, preferencialmente, substratos que proporcionam o melhor desenvolvimento do seu metabolismo, através de um mecanismo de regulação chamado repressão catabólica de nitrogênio (NCR), esse mecanismo impede a absorção das fontes pobres de nitrogênio quando há presença de melhores fontes disponíveis (CREPIN et al., 2012).

O nitrogênio exerce funções muito importantes na fisiologia celular da levedura e na bioquímica do processo de fermentação. Ele é considerado um elemento fundamental no crescimento e multiplicação das leveduras, auxilia no aumento da tolerância ao etanol, acelera a fermentação e proporciona maior produtividade e rendimento (THOMAS; INGLEDEW, 1990).

Os compostos utilizados como fontes de carbono e de nitrogênio são, do ponto de vista quantitativo, os principais nutrientes utilizados pelas leveduras, por isso deve-se considerar que o fluxo destes nutrientes e a interação mútua entre

eles devem interferir nos vários processos metabólicos (ter SCHURE et al., 1995 apud CRUZ, 2002). Na Figura 4 está esquematicamente descrita a biossíntese dos aminoácidos a partir de glicose (ALBERS et al., 1996); esse fluxo apresenta parte das interações que ocorrem entre a fonte de carbono e as fontes de nitrogênio.

Figura 4. Esquema simplificado da formação de espécies redutoras na biossíntese de aminoácidos

Fonte: ALBERS et al., 1996

As leveduras *S. cerevisiae* utilizam o nitrogênio, principalmente, na forma amoniacal (NH_4^+). Na falta dessa, as leveduras passam a usar o nitrogênio na forma amídica (ureia) ou amínica (na forma de aminoácidos) e pequenos peptídeos, e não possui habilidade metabólica para aproveitar o nitrato e pouca capacidade de utilizar as proteínas do meio (BASSO; AMORIM, 2001, VILANOVA et al., 2007). O nitrogênio assimilável é essencial para o metabolismo e crescimento da levedura. A disponibilidade de nitrogênio é muito importante para produção de biomassa na fase de crescimento exponencial da levedura durante o início da fermentação alcoólica (MARTÍNEZ-MORENO et al., 2012).

O nitrogênio é transportado pela membrana plasmática por meio de uma permeasse geral de aminoácidos (Gap 1). Os aminoácidos podem transportar

especificamente alguns compostos nitrogenados para célula, esses compostos nitrogenados podem ser incorporados diretamente nas vias de síntese de proteínas ou transformados em amônio e glutamato que entram na via biossintética. Qualquer aminoácido pode ser sintetizado se houver glutamina ou glutamato suficiente. Os compostos nitrogenados quando entram na célula são armazenados em vacúolos até serem utilizados pela levedura (HOFMAN-BANG, 1999).

O nitrogênio é um elemento que constitui vários compostos orgânicos na célula da levedura, onde, 70% é composto de proteína, de 8 a 10% de purinas e aproximadamente 4% são de piridinas, os demais são encontrados nos compostos solúveis, aminoácidos e nucleotídeos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011 apud FRANCISCHETTI, 2017).

A qualidade e quantidade das fontes de nitrogênio e carbono no ambiente, faz com que a célula da levedura corresponda ajustando seu metabolismo para aprimorar a utilização de nutrientes existentes e auxiliar seu desenvolvimento, fazendo com que sua capacidade de sobrevivência melhore perante as condições nutricionais do meio (SCHNEPER; DUVEL; BROACH, 2004).

A proporção entre as fontes de carbono e nitrogênio precisa ser equilibrada para garantir uma boa atividade metabólica da levedura. A deficiência de nitrogênio pode resultar em uma perda da capacidade de absorção dos açúcares pelas células (GOBERT et al., 2019). Além disso, a falta de nitrogênio pode causar fermentações paradas ou lentas (BETITE et al., 2012).

As células de levedura são submetidas a diversas fontes de estresse durante um processo industrial fermentativo, como alta concentração de açúcar e etanol, temperaturas elevadas durante o processo fermentativo, nutrientes do meio e etc. Uma medida indicada para auxiliar esse processo é suplementar o mosto com uma fonte de nitrogênio; diversas fontes nitrogenadas podem ser utilizadas. O nitrogênio estimula o crescimento microbiano, ampliando a captação de nutrientes essenciais e fortalecendo os mecanismos de respostas a estresse sobre a membrana plasmática (BATISTOTE; CRUZ; ERNANDES, 2006; BETITE et al., 2012; CERQUEIRA, 2013; MONTEIRO, 2015).

No estudo de Cruz (2002), preparações comerciais de hidrolisados enzimáticos de proteínas (com predominância de aminoácidos na forma de peptídeos), petonas, hidrolisados ácidos (com a predominância de aminoácidos na forma livre) e um sal de amônio (sulfato de amônio) foram utilizadas como fonte de

nitrogênio. Os meios continham também uma fonte de carbono sendo: monossacarídeos (glicose, galactose, frutose) dissacarídeos (maltose, sacarose, lactose), o trissacarídeo rafinose e um substrato não fermentescível (etanol). Os resultados obtidos sugerem que não somente a complexidade estrutural da fonte de carbono juntamente com a fonte de nitrogênio podem interferir no metabolismo das leveduras, mas também, as diferenças bioquímicas de distintas linhagens de leveduras podem ter influência no desempenho da fermentação.

É importante ressaltar que a quantidade e a variedade de compostos nitrogenados disponíveis no mosto são essenciais para ocorrer uma fermentação bem-sucedida nos processos industriais. Portanto, é necessário selecionar cepas de leveduras que além de apresentar capacidade de utilizar rapidamente todos os açúcares presentes, deve possuir capacidade de utilizar todos os tipos de fontes de nitrogênio, o que poderá garantir a excelência na qualidade e rendimento do produto final (BATISTOTE; CRUZ; ERNANDES, 2006).

De acordo com Amorim (2005), a quantidade de nitrogênio precisa ser bem dosada, caso tenha pouco nitrogênio o processo fica lento e o rendimento cai, se o nitrogênio estiver em excesso a levedura se multiplicará em quantidade elevada, desviando os açúcares para produção de biomassa ao invés de produzir álcool. A concentração adequada de nitrogênio livre, indicada pelo autor, para aumentar a eficiência da fermentação deve ser de 100 a 300 mg/L de mosto.

3.5 Relação C/N

A relação Carbono e Nitrogênio da matéria orgânica é a proporção da massa de carbono em relação a quantidade de nitrogênio presente. Na matéria orgânica sempre tem mais carbono do que nitrogênio. A proporção de carbono/ nitrogênio é escrita como C:N e geralmente é representada por um número (BRUST, 2019).

O carbono é um elemento que fornece uma fonte de energia e atua como constituinte na formação da massa celular microbiana. Já o nitrogênio é um elemento importante para a constituição de proteínas, ácidos nucleicos, enzimas e aminoácidos, que são necessários para os processos de crescimento e para o metabolismo microbiano (NOVIADI; ZAIRIFUL; CANDRA, 2018).

A proporção de carbono para nitrogênio é muito importante, pois o metabolismo de carbono e nitrogênio estão sempre ligados, onde sua assimilação é

coordenada e controlada de acordo com a disponibilidade de ambos os nutrientes (GINÉSY; RUSANOVA-NAYDENOVA; ROVA, 2017).

Uma relação C:N de 10:1 significa que há dez unidades de carbono para cada unidade de nitrogênio na substância. No solo a razão C:N pode ter um efeito significativo sobre a decomposição de resíduos e ciclagem de nutrientes (USDA-NRCS, 2011). Na fermentação a relação C/N atua como um papel vital na produção de etanol.

Em uma fermentação descontínua, a partir da farinha de tapioca, utilizando cepas de *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*, a relação C/N ótima obtida no meio de fermentação foi de 35,2, o que gerou uma concentração máxima de etanol de 8,85 g/L (MANIKANDAN; VIRUTHAGIRI, 2010).

Ao avaliar a relação C/N na compostagem, Akratos et al. (2017) ressaltou que os microrganismos precisam de um bom equilíbrio de carbono e nitrogênio que pode variar de 25 a 35. As altas relações C/N podem levar a uma duração de compostagem prolongada e baixas relações C/N pode elevar a perda de nitrogênio.

Ginésy et al (2017) avaliando a razão molar C/N ideal para maximizar a produção de L-arginina por *Escherichia coli* e evitar o desperdício de nitrogênio, encontrou uma razão de 6, nessa razão, o rendimento foi de, aproximadamente, 2,25 g/L de L-arginina a partir de 15 g/L de glicose com uma produtividade de 0,11 g/L/h.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CAT-1 liofilizada, fornecida gentilmente pela empresa LNF Latino Americana (<https://lnf.com.br/>), foi utilizada neste estudo.

4.2 Manutenção das leveduras

A levedura liofilizada foi ressuspensa em solução salina 0,85% e semeada em placas contendo meio YPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L e ágar, 20 g/L). As placas após incubação a 30°C foram armazenadas a 4°C e mensalmente repicadas em meio YPD.

4.3 Avaliação da cinética de crescimento da linhagem CAT-1

O desempenho da levedura *S. cerevisiae* foi estudado em meio contendo sacarose (SAC, $C_{12}H_{22}O_{11}$) como fonte de carbono e fosfato de diamônio (DAP, $(NH_4)_2HPO_4$) como fonte de nitrogênio, utilizando a linhagem CAT-1.

O crescimento da linhagem CAT-1 foi analisado utilizando um leitor de microplacas com capacidade para leitura de 96 micropoços (Tecan Infinite M200, RChisto). Foram realizados dois estudos: (1) crescimento da linhagem CAT-1 em meio base YNB² (Anexo1) contendo diferentes concentrações de sacarose (SAC) e fosfato diamônio (DAP) e, (2) meio contendo extrato de levedura (YE) e diferentes concentrações de sacarose e de DAP. Os experimentos seguiram o esquema apresentado na Figura 5 e foram realizados em triplicata, com os controles negativos (sem inóculo) correspondentes, em duplicata. Os ensaios de Tr01 a Tr10 correspondem ao meio contendo YNB, SAC e DAP e os ensaios Tr11 a Tr14 com meio contendo YE, SAC e DAP.

² YNB w/o aminoacids (Yeast nitrogen base) contendo 5 g/L de sulfato de amônio e demais nutrientes. Composição completa descrita em Anexo 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Tr01	Tr01	Tr01	Tr02	Tr02	Tr02	Tr03	Tr03	Tr03	Tr04	Tr04	Tr04
B	Tr05	Tr05	Tr05	Tr06	Tr06	Tr06	Tr07	Tr07	Tr07	Tr08	Tr08	Tr08
C	Tr09	Tr09	Tr09	Tr10	Tr10	Tr10	Tr11	Tr11	Tr11	Tr12	Tr12	Tr12
D	Tr13	Tr13	Tr13	Tr14	Tr14	Tr14					Br 3	Br 3
E	Br 7	Br7	Br 10	Br 10	Br 11	Br 11	Br 12	Br 12	Br 13	Br 13	Br 14	Br 14
F												
G												
H												

*Br – Brancos (controle negativo).

Figura 5. Esquema utilizado para o estudo cinético da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB com sacarose e fosfato de diamônio (Tr01 a Tr10), meio contendo extrato de levedura (YE) e diferentes concentrações de sacarose e de fosfato de diamônio (Tr11 a Tr14). Br- Controle negativo correspondente.

4.3.1 Preparo do inóculo

Utilizando palito estéril, uma pequena quantidade de células de levedura, proveniente de cultivo em meio YPDágar, foi inoculada em 5 mL de meio YPDlíquido em tubos de vidro com tampa rosqueada; os tubos foram incubados a 30°C em incubadora tipo BOD (Tecnal TE-391) por 24h. A seguir, as células foram recuperadas por centrifugação a 2046 g por 3 minutos em minicentrífuga (Kasvi, 6400 rpm) e transferidas para Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de YPSac 8% (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; sacarose, 80 g/L); os frascos foram incubados a 30°C em incubadora tipo shaker (Marconi- MA 832/1). Após 24h, as células foram recuperadas por centrifugação e transferidas para Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de YPSac 15% (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; sacarose, 150 g/L); os frascos foram incubados a 30°C em incubadora tipo shaker (Marconi- MA 832/1) por 24h. A seguir, as células foram recuperadas por centrifugação a 1058 g, 10°C por 5 min (Centrifuga refrigerada Nova Técnica - NT 815); o pellet obtido foi lavado duas vezes com solução salina (0,85%) gelada e ressuspenso na mesma solução. Foi retirado 500 µL do pellet lavado, este foi ajustado para 0,1 D.O (Abs₆₀₀), sendo utilizado como inóculo posteriormente.

4.3.2 Preparo das soluções estoque

As soluções preparadas foram: YNB (Yeast nitrogen base) 2x concentrado, soluções estoque de sacarose (200 g/L e 300 g/L) fosfato de diamônio (DAP, 20 g/L e 30 g/L) e extrato de levedura (40 g/L)

Todas as soluções foram esterilizadas, em autoclave a 121°C (1 atm) por 15 minutos. Antes do ensaio foram realizadas as misturas necessárias, contendo sacarose e fosfato de diamônio, em tubos tipo falcon (50 mL), obtendo um volume final de 10 mL da mistura.

4.3.3 Cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo YBN e diferentes concentrações de sacarose e fosfato diamônio

As Tabelas 1 e 2 apresentam as condições experimentais para o estudo cinético da linhagem CAT-1 em meio YNB 0,17% (concentração final) contendo diferentes concentrações de sacarose (SAC, fonte de carbono) e fosfato diamônio (DAP, fonte de nitrogênio), utilizando um planejamento fatorial do tipo 2².

Tabela 1 - Faixa de estudo das variáveis independentes em análise no planejamento experimental fatorial do tipo 2² para cultivo da linhagem CAT-1 em microplacas

Variáveis independentes		Níveis de variação				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
[SAC] (g/L)	X1	5	33,4	102,5	171,6	200
[DAP] (g/L)	X2	0	1,5	5	8,5	10

Para o estudo cinético da linhagem CAT-1 foi adicionado em cada micropoço 50 µL da solução estoque de YNB 2x conc (para concentração final de 0,17%), 25 µL de uma suspensão de células, conforme item 4.3.1, e 25 µL da mistura das soluções estoque de SAC e DAP, conforme item 4.3.2. Os controles negativos foram utilizados em duplicata, sendo composto por 50 µL de meio YNB 2x conc, 25 µL da mistura das soluções estoques de SAC e DAP (item 4.3.2) e 25 µL de água destilada.

Tabela 2 – Valores codificados e configuração experimental no planejamento fatorial do tipo 2² das linhagens de *S. cerevisiae*.

Níveis de variáveis codificados				
Ensaio	X1	[SAC] (g/L)	X2	[DAP] (g/L)
Tr01	-1	33,4	-1	1,5
Tr02	+1	171,6	-1	1,5
Tr03	-1	33,4	+1	8,5
Tr04	+1	171,6	+1	8,5
Tr05	-1,41	5	0	5
Tr06	+1,41	200	0	5
Tr07	0	102,5	-1,41	0
Tr08	0	102,5	+1,41	10
Tr09	0	102,5	0	5
Tr10	0	102,5	0	5

O cultivo foi realizado a 30°C com leitura de absorbância (densidade óptica – D.O.) em comprimento de onda 600 nm, a cada 30 min após precedidas de agitação automática realizadas pelo leitor de microplacas, durante 24h.

4.3.4 Cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo extrato de levedura (YE) e diferentes concentrações de sacarose e de fosfato de diamônio

As condições experimentais para o estudo cinético da linhagem CAT-1 em meio contendo YE e diferentes concentrações de sacarose (SAC, fonte de carbono), fosfato diamônio (DAP, fonte de nitrogênio) estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição dos meios utilizados no estudo cinético

	SAC (g/L)	DAP (g/L)	YE (g/L)
Tr11	52,2	2,9	10
Tr12	10	10	10
Tr13	155	0	10
Tr14	155	10	10

Para esse estudo, em cada micropoço foi inoculado 25 µL da suspensão de células, conforme item 4.3.1, e 25 µL de cada um dos reagentes: Solução de extrato de levedura, Solução de sacarose e Solução de fosfato de diamônio (DAP), para concentração final como descrito na Tabela 3. Os controles negativos, em duplicata, foram preparados sem a adição da solução de células e adicionando 25 µL de água destilada.

O cultivo foi realizado a 30°C com leitura de absorbância (densidade óptica – D.O.) em comprimento de onda 600 nm, a cada 30 min após leve agitação, durante 24h.

4.4 Avaliação do desempenho fermentativo da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo

4.4.1 Preparo do inóculo

Utilizando palito estéril, uma pequena quantidade de células de levedura, proveniente de cultivo em meio YPDágar, foi inoculada em 5 mL de meio YPDlíquido em tubos de vidro com tampa rosqueada. Os tubos foram incubados a 30°C em incubadora tipo BOD (Tecnal TE-391) por 24h, com agitação manual ocasional.

Antes das análises, as células foram recuperadas por centrifugação em minicentrífuga (Kasvi, 6400 rpm) por 30 segundos. O pellet obtido foi lavado uma vez com solução salina (0,85%) gelada. O pellet final foi ressuspenso em 1 mL de solução salina e este foi utilizado como inóculo.

4.4.2 Ensaio fermentativo

Para analisar a influência dos parâmetros, concentração de Carbono e de Nitrogênio, sobre o desempenho da linhagem CAT-1, foram conduzidos ensaios fermentativos utilizando diferentes concentrações de cada fonte, como apresentado na Tabela 4. Inicialmente foi elaborado um planejamento fatorial do tipo composto central rotacional envolvendo 2 variáveis independentes (concentração de Carbono e de Nitrogênio), variando a concentração de SAC de 10 a 300 g/L e de DAP de 0 a 20 g/L. Embora os experimentos tenham sido realizados mais de três vezes, alguns dos resultados obtidos foram não conclusivos devido a falta de reprodutibilidade dos valores. Assim, optou-se por manter apenas as condições apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições utilizadas nos ensaios de fermentação

Ensaio	[SAC] (g/L)	[DAP] (g/L)
Tr11	52,2	2,9
Tr12	10	10
Tr13	155	0
Tr14	155	10
Tr15	257,8	17,1
Tr16	300	10

O meio utilizado em cada ensaio foi preparado com extrato de levedura, 10 g/L, sacarose (fonte de Carbono) e fosfato de diamônio (DAP, fonte de Nitrogênio), nas concentrações descritas na Tabela 4. Para os experimentos foram utilizados Frascos Erlenmeyer (250mL) contendo 50 mL de cada meio e o inóculo foi adicionado de forma a obter uma concentração celular de 10^6 células por mL.

Os frascos (em triplicata) foram mantidos em incubadora tipo BOD (Tecnal TE- 391) na temperatura de 30°C por 24 h. Em seguida, o mosto fermentado foi analisado quanto ao desprendimento de CO₂, massa úmida (biomassa), viabilidade, contagem de células.

Após centrifugação (centrifuga NT 815 - Nova Técnica) a 1058 g, 10°C por 5 min, o pellet obtido foi descartado e o sobrenadante foi congelado para as análises posteriores de acidez total, açúcares redutores e teor alcoólico.

4.4.3 Análises físico-química e microbiológicas

O **desprendimento de CO₂** foi analisado após 24h de incubação por pesagem do frasco em balança analítica (BEL).

A **massa úmida (biomassa)** foi analisada no final de cada ensaio por pesagem após a centrifugação.

A **DO (densidade ótica)** foi medida por espectrofotômetro (Femto 700S) em 600 nm do sobrenadante.

Contagem de células e Viabilidade

A contagem de células e viabilidade celular foi avaliada por meio da contagem do número de células pelo método de coloração com azul de metileno em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico (LEE et al., 1981). As células viáveis não são coradas, enquanto que as células não viáveis ficam azul.

O resultado da viabilidade foi apresentado em percentagem (%) de células viáveis.

$$Viabilidade (\%) = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de células totais}} \times 100$$

Acidez total

A determinação da acidez total foi realizada pela técnica de neutralização, onde 20 mL da amostra foram transferidos para béquer (250 mL), adicionando 50 mL de água destilada e foi utilizado o pHmetro (Lucadema). A amostra foi titulada com hidróxido de sódio 0,1N, até atingir pH 8,2. O valor do volume gasto (Vg) foi utilizado para o cálculo da acidez total (AMERINE, 1974).

$$Acidez\ total = \frac{Vg \times N \times 60 \times 1000}{volume\ amostra}$$

Onde:

Acidez total = mg de ácido acético/L

Vg = volume da solução de NaOH gasto na titulação (mL)

N = normalidade da solução de NaOH, corrigida pelo fator de correção

60 = equivalente do ácido acético

Açúcares redutores totais (ART) e Açúcares redutores (AR)

A concentração de açúcares redutores totais foi determinada pelo método do ácido 3,5 – dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), após hidrólise ácida da sacarose. A concentração de ART foi obtida por comparação dos valores de absorbância a 540nm com uma curva padrão obtida com glicose.

Teor alcoólico

A análise do teor alcoólico foi realizada a partir da destilação por arraste de vapor de 25 mL das amostras centrifugadas em microdestilador (Tecnal TE-012). O

teor alcoólico foi determinado através da densidade alcoólica obtida com o auxílio de um densímetro digital (Anton Paar- DMA45).

4.4.4 Relação C/N total

A relação C/N das amostras no início de cada experimento foi realizada a partir da análise da composição do meio. Para isso, os meios Tr11; Tr12; Tr13; Tr15 e Tr 16 (Tabela 6) foram submetidos à análise no Departamento de Solos-ESALQ/USP (Anexo 1).

De acordo com o laudo obtido das análises, tem-se que: o **pH** foi determinado por leitura direta da amostra potenciometria; a Densidade (m/v); a concentração de **Fósforo** (P_2O_5) determinada por espectrofotometria utilizando solução de vanadomilbídica; a concentração de **Potássio** (K_2O) obtida por fotometria de chama; a concentração de **Enxofre** (S) pelo método gravimétrico do sulfato de bário; a concentração de **Cálcio** (Ca) e de **Magnésio** (Mg) por espectrofotometria de absorção atômica após extração com solução Nítrico-Perclórica seguiram a metodologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA (BRASIL, 2017). A concentração de **Nitrogênio total** foi obtida por digestão sulfúrica (Kjeldahl) (SILVA, 2009). O Resíduo Mineral e orgânico (RMO) a 110°C (Resíduo 110°C), Resíduo Mineral Total (RMT) (Sólidos Totais), **Carbono Total**, Resíduo Mineral (RMI) (Sólidos Totais Fixos Insolúveis), Resíduo Mineral Solúvel (RMS) (Sólidos Totais Voláteis) foram determinados por combustão em Mufla (ALCARDE, 2009).

4.4.5 Cálculos de rendimento e produtividade

A partir dos resultados obtidos na fermentação foi possível calcular o Rendimento Ideal/Teórico (RI) (Equação 1) e prático (RP) (Equação 2) da fermentação, assim como a produtividade (PF) (Equação 3).

$$RI \text{ g de etanol} = \frac{51,11 \times ART \text{ consumido na fermentação}}{100} \quad (\text{Eq 1})$$

$$RP \% = \frac{\text{g de etanol produzido no vinho}}{\text{g RI}} \times 100 \quad (\text{Eq 2})$$

$$PF \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1} = \frac{\text{concentração de etanol no vinho (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}} \quad (\text{Eq 3})$$

A produtividade do processo foi obtida considerando o teor alcoólico obtido pelo tempo de fermentação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O rendimento alcoólico foi calculado considerando o teor alcoólico e o total de açúcar consumido após o final da fermentação conforme a equação de GAY-Lussac: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2 + \text{Energia}$.

O fator 0,511 é a estequiometria da fermentação alcoólica, onde 100g de glicose produzem 51,11g de etanol.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise pelos métodos ANOVA e de superfície de resposta. As análises estatísticas foram realizadas com o programa PROTIMIZA Experimental Design e com o R.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desempenho da levedura *S. cerevisiae* foi estudado em meio contendo sacarose (SAC, $C_{12}H_{22}O_{11}$) como fonte de carbono e fosfato de diamônio (DAP, $(NH_4)_2HPO_4$) como fonte de nitrogênio, utilizando a linhagem CAT-1. A partir da composição do meio foi possível obter a relação C/N das amostras no início dos experimentos. Em diferentes condições de C e N foram estudadas a cinética de crescimento e o desempenho fermentativo em sistema descontínuo. Os resultados estão apresentados a seguir.

5.1 Caracterização físico-química dos meios

A composição de um meio para leveduras é de extrema importância para o desenvolvimento das células, pois os componentes do meio influenciam tanto o crescimento como o processo fermentativo. As células de levedura necessitam de um conjunto de nutrientes que são indispensáveis para o seu desenvolvimento como o C, N, P, K, Mg e S.

Os meios utilizados neste estudo, contendo extrato de levedura (YE), sacarose (SAC) e fosfato diamônio (DAP) foram analisados quanto a composição físico-química. Os resultados na íntegra estão apresentados em Anexo 1 e alguns desses resultados estão apresentados na Tabela 5. A relação C/N das amostras, no início de cada experimento, foi obtida a partir da relação entre Carbono total e Nitrogênio total.

O extrato de levedura (YE) é um concentrado da parte solúvel de células autolisadas de *S. cerevisiae*. Por fornecer vitaminas essenciais solúveis em água, aminoácidos, peptídeos e carboidratos para qualquer formulação de meio, o YE é adequado para uso como suplemento nutricional multifuncional em aplicações de cultura de células de mamíferos, fermentação microbiana e cultura de células de insetos (Anexo 2).

O Extrato de Levedura Bacto é um dos suplementos de fermentação mais completos e versáteis disponíveis. É um ingrediente importante para a dosagem microbiológica de vitaminas.

Tabela 5 - Análise físico-química dos meios utilizados

		Tr11	Tr 12	Tr13	Tr15	Tr16
[SAC]	g/L	52,2	10	155	257,8	300
[DAP]	g/L	2,9	10	0	17,1	10
[YE]	g/L	10	10	10	10	10
pH		5,7	6,1	6,0	6,0	6,0
Carbono total	g/L	23,53	9,55	88,59	66,34	104,88
Nitrogênio total	g/L	1,72	3,07	1,25	3,78	2,46
Fósforo (P ₂ O ₅)	g/L	1,69	5,57	0,25	7,56	4,94
Potássio (K ₂ O)	g/L	0,64	0,7	0,64	0,62	0,6
Cálcio (Ca)	g/L	0,24	0,22	0,23	0,23	0,23
Magnésio (Mg)	g/L	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
Enxofre total (SO ₄)	g/L	0,09	0,1	0,1	0,06	0,07
C/N*		13,68	3,11	70,87	17,55	42,63

* relação C/N calculado por Carbono total dividido por Nitrogênio total

Ao variar as concentrações de sacarose e fosfato diamônio do meio de cultivo, são alteradas algumas características (Tabela 5).

O pH dos meios estudados variou de 5,7 a 6,1, mostrando não haver nenhuma correlação com a concentração de Sac ou de DAP. Ceccato-Antonini (2010) destaca que os limites de tolerância ao pH para as leveduras estão situados entre pH 2,2 e 8,0, de acordo com diversas espécies. Porém, as leveduras preferem meios ácidos, com pH em torno de 4,5. Para que haja uma fermentação eficiente, Pelczar et al. (1996) sugere que o pH deve se encontrar em um valor adequado para as leveduras, em torno de 5 a 6, que é considerado o valor ideal para o crescimento da levedura. No entanto, para Cardoso (2006) o pH ideal para leveduras do gênero *S. cerevisiae* produzirem etanol, é em torno de 4,5.

Em relação aos nutrientes, os meios estudados, contendo YE, SAC e DAP, continham todos os elementos considerados importantes para o desenvolvimento de leveduras, quer seja crescimento, quer seja fermentação, como carbono, nitrogênio e o fósforo que são essenciais para várias funções realizadas pelas leveduras, além dos elementos como enxofre, magnésio, cálcio e potássio.

Nos processos biotecnológicos que utilizam a levedura *S. cerevisiae*, é imprescindível que o meio de cultura contenha, uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio, além de sais e vitaminas (NASCIMENTO; FONSECA, 2019). Os nutrientes atuam no metabolismo das leveduras ativando as enzimas. Quando a

quantidade de nutrientes não é suficiente, a reprodução da levedura e a fermentação ficam lentas, ou até mesmo pode ocorrer inibição da reprodução (KOTARSKA; CZUPRYŃSKI; KŁOSOWSKI, 2006). No entanto, as células de leveduras são capazes de ajustar seu crescimento e comportamento de acordo com os nutrientes disponíveis. As células ajustam a taxa de crescimento em resposta ao ambiente nutricional, alterando a duração do ciclo celular em até 10 vezes (BROACH, 2012).

Com relação ao nitrogênio, Martínez-Moreno et al. (2012) ressaltam que o nitrogênio assimilável é fundamental para o metabolismo da levedura, a disponibilidade deste elemento está diretamente relacionada a produção de biomassa durante a fase de crescimento e nos estágios iniciais da fermentação. Ainda, White (1954) destaca que o nitrogênio é um elemento essencial para a multiplicação e crescimento das leveduras, ele é constituinte de várias substâncias orgânicas como aminoácidos, vitaminas, proteínas, enzimas, purinas, piridinas, pigmentos respiratórios (citocromos) dentre outros.

O fósforo também é um dos elementos importantes para a fermentação, a função do fósforo está relacionada com a transferência de energia na célula, é um elemento indispensável na absorção dos carboidratos e, conseqüentemente, para a fermentação (AMORIM, 1985). O fósforo, na forma de P_2O_5 , é importante para a formação de etanol durante a fermentação; ele favorece a ação das leveduras, e aumenta o rendimento alcoólico da fermentação (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005). Outros elementos identificados como importantes são: enxofre, magnésio, cálcio, potássio, dentre outros, pois atuam como constituintes de proteínas e enzimas ou como catalisadores de reações durante a fermentação (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999).

Poucos estudos indicam quais são as concentrações ideais dos nutrientes. Amorim (2005) sugere que a concentração adequada de nitrogênio livre, para aumentar a eficiência da fermentação, deve ser de 100 a 300 mg/L de mosto. Com relação a relação C/N afetando a fermentação alcoólica não se encontram estudos.

No presente trabalho, os meios utilizados continham extrato de levedura, com 11% de nitrogênio, portanto todos os meios continham 1,1 g/L de N proveniente do YE, e o restante proveniente do DAP. Ao calcular a relação C/N dos meios, foi observada variação de 3,11 a 70,9 (Tabela 5).

5.2 Estudo cinético da linhagem CAT-1 em meio contendo YE, DAP e SAC

A cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo extrato de levedura (YE), sacarose (SAC) e fosfato de diamônio (DAP) em diferentes concentrações, foi conduzida conforme Tabela 3. Os resultados de D.O. estão apresentados na Figura 6.

Figura 6. Cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo extrato de levedura (YE), sacarose (SAC) e fosfato de diamônio (DAP) à 30°C: Tr11 - SAC (52,2 g/L) e DAP (2,9 g/L); Tr12 - SAC (10 g/L) e DAP (10 g/L); Tr13 - SAC (155 g/L) e DAP 0 g/L; Tr14 - SAC (155 g/L) e DAP (10 g/L)

A análise das curvas de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo YE, SAC e DAP mostram que a fase de latência (lag) teve duração de apenas 1 hora para todos os ensaios (Figura 6). Provavelmente, isso ocorreu devido a adaptação à qual as células de levedura foram submetidas, com o preparo de um pré-inóculo cultivado em meio contendo sacarose e extrato de levedura; assim, a levedura se adaptou mais rapidamente ao meio de cultivo.

A fase exponencial (log) foi observada de 1 a 5 h para o Tr12, de 1 a 6 h para o Tr11 e de 1 a 7 h para os ensaios Tr13 e Tr14. Também foi possível observar uma curva acentuada para a maioria dos ensaios.

A fase estacionária também ocorreu em períodos diferentes para cada ensaio. Convém destacar o ensaio Tr12 que apresentou uma curva ascendente, não finalizando a fase estacionária. Neste experimento foi possível observar a fase de declínio para os ensaios Tr11 e Tr14; essa fase é caracterizada pela ausência de multiplicação celular e a morte das leveduras. Isso indica que as concentrações de nutrientes para esses ensaios foram altas. Segundo Amorim (2005), a alta concentração de nutrientes pode levar a um alto teor alcoólico, que pode causar toxidez para a levedura, por ocasionar a desestabilização da membrana plasmática e inibir o crescimento.

Nos estudos de Vilanova; Pretorius; Henschke (2015) com produção de vinho, a levedura assimila o nitrogênio no início da fase de crescimento, e pode acumular aproximadamente 400 mg/L de nitrogênio em mostos ricos em nitrogênio, no entanto, a concentração limite para a fermentação foi estimada em cerca de 140 mg/L de nitrogênio. Portanto, o nitrogênio é um componente chave do mosto de uva, pois fornece um nutriente essencial para o crescimento da levedura, necessário para a fermentação alcoólica completa e para a produção de vinho com características de sabor desejáveis.

A suplementação de mosto de caldo de cana-de-açúcar concentrado (VHG) a 25 e 30°Brix, com 24 mM (3,2 g/L) de fosfato de diamônio (DAP), proporcionou um aumento significativo da produção de biomassa para a linhagem CAT-1 entre 45 e 55% e a linhagem PE-2 entre 34 e 42%, comparado ao mosto não suplementado (MONTEIRO et al., 2018). No mesmo estudo, a produtividade e a eficiência de fermentação foram afetadas pela suplementação do mosto com uréia mais do que com DAP.

Almeida et al. (2020) estudaram o efeito da suplementação de nitrogênio na produção de hidromel com a cepa de levedura *S. cerevisiae* JP14 isolada do pólen da abelha Jataí, em uma fermentação conduzida em mosto de mel a 25° Brix, suplementado com 0,3; 0,7 e 1,0 g/L de fosfato diamônio (DAP) e sulfato de amônio (AS). Os autores relatam que a suplementação com N aumentou a viabilidade celular nos primeiros 5 dias de fermentação a 20°C, e a suplementação, especialmente com DAP, aumentou o consumo de açúcar e a conversão de açúcar em etanol.

O efeito da concentração de nitrogênio assimilável no perfil cinético de fermentação foi analisado por Mendes-Ferreira; Mendes-Faia; Leão (2004)

utilizando a levedura *S. cerevisiae* PYCC 4072 em suco de uva definido com glicose (200g/L) e diferentes concentrações de nitrogênio cultivado em batelada (sistema descontínuo). Os autores observaram que em concentrações de nitrogênio (DAP) inferiores a 66 mg/L houve uma desaceleração de crescimento celular e uma diminuição de biomassa, no entanto, notou-se que a cepa de levedura aumentou a capacidade de quebrar açúcares devido a disponibilidade de nitrogênio no meio.

Ao avaliar a influência de fontes de N na expectativa de vida cronológica (CLS) da cepa de levedura *S. cerevisiae* PYCC 4072, Santos et al. (2016) verificaram que a suplementação com 1400 mg/L de glutamina como única fonte de N em meio com glicose a 2%, induziu o encurtamento de CLS, indicando que a concentração total de N ao invés da fonte de N é responsável pela diminuição da CLS da levedura, quando fontes de N preferidas estão em altas concentrações.

A análise das curvas de crescimento (Figura 6) com relação a concentração de carbono e nitrogênio em meio contendo extrato de levedura, indica algumas peculiaridades: o ensaio Tr11 continha 52,2 g/L de sacarose e 2,9 g/L de DAP, apresentou um bom crescimento, porém teve fase de declínio. O ensaio Tr12 continha 10 g/L de sacarose e 10 g/L de DAP, nessas condições ocorreu menor crescimento, devido a menor concentração de sacarose, mas não teve fase de declínio.

Os ensaios Tr13 e Tr14 continham a mesma concentração de sacarose (155g/L), porém o ensaio Tr13 não continha DAP e o ensaio Tr14 continha 10g/L, o ensaio Tr13 apresentou melhor curva de crescimento, mesmo sem a adição de DAP. Assim, esses resultados sugerem que a adição de DAP não contribuiu para o crescimento da levedura, Pode-se inferir que o extrato de levedura inibiu algum efeito do DAP ou o YE forneceu a quantidade suficiente de N na concentração utilizada no estudo (10 g/L) ou que contenha as formas preferenciais de N para a levedura. De acordo com o fabricante o YE contém 11% de nitrogênio (1,1 g/L em cada meio).

A partir das curvas de crescimento foram calculadas as velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e obtida a D.O._{máx}. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e Densidade ótica máxima (D.O.máx) da linhagem CAT-1 durante cinética de crescimento em meio contendo YE, DAP e SAC em diferentes concentrações*

Ensaio	[SAC] (g/L)	[DAP] (g/L)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	D.O. _{max}	Tempo** (h)
Tr11	52,2	2,9	0,369	1,101	10,0
Tr12	10	10	0,420	0,723	24,0
Tr13	155	0	0,403	1,258	14,5
Tr14	155	10	0,413	1,221	14,5

* Condições de cultivo: 30°C por 24h

** tempo em que foi obtida a D.O.máx

A velocidade máxima específica de crescimento para a linhagem CAT-1 nos meios analisados apresentou valores similares, exceto no meio Tr11. Os ensaios Tr12, Tr13 e Tr 14 apresentaram velocidade máxima específica de crescimento entre 0,403 a 0,420 h⁻¹. Estes ensaios tinham concentrações diferentes de sacarose (10g/L e 155g/L), mas o Tr12 e Tr14 tinham a mesma concentração de DAP (10g/L) (Tabela 3), o ensaio Tr13 não continha DAP e mesmo assim, apresentou $\mu_{\max}$ de 0,403 h⁻¹.

Esses resultados sugerem que a presença do DAP não é o fator responsável pelo crescimento da levedura. Isso está mais claro ao avaliar os resultados dos ensaios Tr13 e Tr14 com a mesma concentração de sacarose (155g/L) e concentrações diferentes de DAP (0 e 10g/L) e uma velocidade máxima específica similar.

Os valores de D.O._{máx} foram similares para os ensaios Tr13 e Tr14; o ensaio Tr13 teve uma D.O. em torno de 1,26 e o ensaio Tr14 1,22, sendo que a D.O. máxima foi obtida em 14,5 h. O ensaio Tr11 apresentou uma D.O máxima de 1,10 em 10 h, e o ensaio Tr12 teve uma D.O. máxima em torno de 0,723 em 24 h.

Avaliando esses resultados em termos de relação C/N tem-se que: no meio Tr12 a relação C/N era 3,11; no Tr11 era 13,7; para o meio Tr14 era 32,0 e para Tr13 era 70,9.

Ao avaliar o efeito da razão C/N para a produção de biomassa de *S. cerevisiae* em mosto de melaço, Huy et al. (2018) destacaram que a melhor relação C/N foi de 10/1 alcançando 6,68 g/L de biomassa. No entanto, Manikandan e Viruthagiri (2010) ressaltam que, a alta concentração de nitrogênio no meio de fermentação pode diminuir drasticamente a concentração de etanol. Ao realizar

uma fermentação com uma razão C/N de 3,5 foi obtido um rendimento de etanol muito baixo em torno de 0,55 g/L.

A produção de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) pela levedura *S. cerevisiae* W303-181, em meio contendo extrato de levedura (como fonte de nitrogênio), melaço de cana-de-açúcar e glicose (como fontes de carbono) em três diferentes relações C:N 7, 10 e 14, Danesi et al. (2006) mostraram que o uso de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura, na relação C:N de 10, proporcionou a maior atividade G6PDH ($P_{\text{máx}} = 5180 \text{ U / L}$), com aumento de três vezes se comparado ao meio de cultura original.

5.3 Estudo cinético da linhagem CAT-1 em meio base contendo YNB

O extrato de levedura é geralmente utilizado em meios de cultivo de microrganismos como fonte de fatores essenciais ao crescimento das células (GRANT; PRAMER, 1962). No presente trabalho foi utilizado uma fonte de nitrogênio (DAP) junto com o extrato de leveduras.

Para um entendimento mais amplo da influência da relação C/N no desenvolvimento de leveduras, foi realizado um estudo cinético sem a presença do extrato de leveduras.

A cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB, sacarose (5 a 200 g/L) e fosfato de diamônio (0 a 10 g/L) foi conduzida conforme planejamento apresentado na Tabela 2 (item 4.3.3). Os resultados de D.O. obtidos estão apresentados na Figura 7.

Figura 7. Cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB, fosfato de diamônio e sacarose, a 30°C: Tr01 - SAC (33,4 g/L) e DAP (1,5 g/L); Tr02 - SAC (171,6 g/L) e DAP (1,5 g/L); Tr03 - SAC (33,4 g/L) e DAP (8,5 g/L); Tr04 - SAC (171,6 g/L) e DAP (8,5 g/L); Tr05 - SAC (5 g/L) e DAP (5 g/L); Tr06 - SAC (200 g/L) e DAP (5 g/L); Tr07 - SAC (102,5 g/L) e sem DAP; Tr08 - SAC (102,5 g/L) e DAP (10 g/L); Tr09 - SAC (102,5 g/L) e DAP (5 g/L); Tr10 - SAC (102,5 g/L) e DAP (5 g/L).

Analisando o perfil cinético da linhagem CAT-1 (Figura 7) pode-se observar que, nas diferentes condições, a fase de latência (lag) ocorreu em menos de 2 horas. Na fase lag as células de levedura se adaptam as condições do meio, e realizam a síntese das enzimas necessárias ao metabolismo (HISS, 2001)

A próxima fase, conhecida como fase exponencial (log), foi observada de 2 a 10 h para a maioria dos ensaios, exceto para os ensaios Tr01, Tr03 e Tr05. A fase log nos ensaios Tr01 e Tr03 durou até 6 h, e no ensaio Tr05 durou até 3 h. Provavelmente, o período da fase exponencial nesses ensaios é devido à concentração menor de sacarose, sendo nos ensaios Tr01 e Tr03 de 33,4 g/L e, principalmente, no ensaio Tr05 que continha apenas 5 g/L de sacarose. Na fase log observa-se uma inclinação acentuada na curva de crescimento, isso pode ser atribuído as condições favoráveis ao metabolismo, onde ocorre a reprodução intensa das células (MULLER et al.; 2007).

A fase estacionária, ocorreu a partir das 10 h, porém para os ensaios Tr01 e Tr03 ocorreu a partir de 5,5 h, e o ensaio Tr05 a partir de 3 h. Esses ensaios atingiram a fase estacionária mais rápido devido a menor duração da fase exponencial. É possível observar que, nesse estudo, não houve fase de declínio. Essa fase apresenta uma elevada taxa de morte da levedura, e não há mais crescimento celular (LOPES et al.; 2015). A ausência dessa fase nesse estudo, indica que a levedura continuou a crescer, devido à quantidade de açúcar presente no meio ou, para os ensaios com concentração reduzida de açúcar, devido ao consumo de metabólitos produzidos durante a fase exponencial.

Convém analisar esses resultados pela perspectiva da concentração de nitrogênio, no presente estudo foi utilizado o fosfato de diamônio (DAP): os ensaios Tr01 e Tr03 tinham a mesma concentração de sacarose (33,4 g/L), porém, a concentração de DAP diferente, sendo 1,5 g/L e 8,5 g/L, respectivamente. As curvas de crescimento para esses dois ensaios apresentaram perfis muito semelhantes, com o Tr01 sendo 6% superior ao Tr03, em termos de D.O.. Provavelmente, nessa concentração de sacarose pode ser utilizada uma concentração menor de nitrogênio, e, o excesso de DAP interferiu negativamente na curva de crescimento do ensaio Tr03.

O ensaio Tr05 continha 5 g/L da sacarose e 5 g/L de DAP, nota-se que nesse ensaio, apesar de ter uma menor curva de crescimento em virtude da menor concentração de sacarose, percebe-se que este continua a crescer, o que pode ser atribuído ao consumo de metabólitos produzidos durante a fase exponencial.

Os ensaios Tr02 e Tr04 continham a mesma concentração de sacarose (171,6 g/L), mas concentrações diferentes de DAP, respectivamente, 1,5 g/L e 8,5 g/L. A análise dessas curvas de crescimento (Figura 7) indica que o ensaio Tr04 foi o que apresentou o melhor desempenho dentre todos os ensaios; quando se compara com o ensaio Tr02 que possuía a mesma concentração de sacarose, percebe-se que o DAP contribuiu para o melhor desempenho do ensaio Tr04, potencializando ganho de biomassa e a fase exponencial, uma vez que, o ensaio Tr02 continha menor concentração de DAP.

O ensaio Tr06 era o que apresentava a maior concentração de sacarose 200 g/L e somente 5g/L de DAP. No entanto, a curva de crescimento não diferiu dos outros ensaios, que continham 102,5 ou 171,6 g/L de SAC. Percebe-se que, embora o ensaio Tr06 tivesse a concentração mais alta de açúcar, esse não foi o

melhor desempenho, o que pode ser atribuído a menor concentração de DAP ou ao estresse provocado pela alta concentração de açúcar.

No caso dos ensaios Tr07, Tr08, Tr09 e Tr010 que continham 102,5 g/L de sacarose, e diferentes concentrações de DAP, sendo 0 g/L (Tr07), 10 g/L (Tr08) e 5 g/L (Tr09 e Tr10), as curvas de crescimento são similares sendo que o ensaio Tr08 teve o melhor desempenho, atingindo a D.O. máxima em menor tempo, o DAP potencializou a fase exponencial. Isso pode ser atribuído a concentração mais alta de DAP. Embora no ensaio Tr07 não tivesse DAP, o crescimento não foi diferente dos ensaios Tr09 e Tr10, no entanto, nota-se uma pequena diferença na fase exponencial. Comparando os meios Tr07 e Tr08 pode inferir que a presença de DAP potencializou a fase exponencial, embora a D.O.máx tenha atingido o mesmo valor. Entre Tr02 e Tr04 observa-se que a maior concentração de DAP potencializou o ganho de biomassa e a fase exponencial e entre Tr08 e Tr09 a menor concentração de DAP reduziu a fase exponencial e o ganho de biomassa.

A suplementação com DAP parece exercer efeito positivo quando se trabalha com maiores concentrações de açúcares, provavelmente devido a maior metabolização e multiplicação das leveduras, o que requer mais N.

5.3.1 Análise das velocidades máximas e D.O.máx

A velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) é o coeficiente angular da reta ajustada aos valores obtidos na fase exponencial do crescimento celular, pois nesta fase de crescimento a velocidade específica é constante e máxima, ou seja, $\mu_x = \mu_{\text{máx}}$ (HISS, 2001; STROPPIA et al., 2009).

A partir dos resultados apresentados na Figura 7 foi possível calcular os valores de μ_{max} . Na Tabela 7 estão apresentados estes valores e os valores de densidade ótica máxima (D.O.máx) observado na fase exponencial de cada ensaio.

Tabela 7 - Valores de Velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}$, h^{-1}) e densidade ótica máxima (D.O. máx) da linhagem CAT-1 cultivada em meio contendo YNB, fosfato de diamônio e sacarose, a 30°C

Ensaio	[SAC] (g/L)	[DAP] (g/L)	$\mu_{\max}$ (h^{-1})	D.O. max	Tempo (h) para D.O. máx
Tr01	33,4	1,5	0,329	0,902	9,5
Tr02	171,6	1,5	0,358	1,13	20,5
Tr03	33,4	8,5	0,351	0,855	9,0
Tr04	171,6	8,5	0,345	1,22	19,5
Tr05	5	5,0	0,261	0,424	23
Tr06	200	5,0	0,328	1,12	24
Tr07	102,5	0	0,330	1,08	16,5
Tr08	102,5	10	0,299	1,13	14
Tr09	102,5	5	0,299	1,07	14
Tr10	102,5	5	0,298	1,06	14

* $\mu_{\max}$: velocidade específica de crescimento máximo

Os ensaios Tr01, Tr02, Tr03, Tr04, Tr06 e Tr07 apresentaram os valores mais altos de velocidade específica máxima de crescimento, com valores variando entre 0,328 e 0,358 h^{-1} . Convém destacar que a maioria desses ensaios continham concentração de sacarose acima de 100 g/L; nos ensaios Tr01 e Tr03 embora tivesse uma concentração menor de sacarose (33,4 g/L), a concentração de DAP pode ter contribuído para uma maior velocidade específica, principalmente, no ensaio Tr03. O ensaio Tr05 foi o que apresentou menor velocidade específica máxima de crescimento (0,261 h^{-1}), porém este ensaio teve a concentração de sacarose menor. Os ensaios Tr08, Tr09 e Tr10 apresentam velocidade específica máxima de crescimento idêntica, com valores entre 0,298 e 0,299 h^{-1} , o que pode ser atribuído ao fato deles terem a mesma concentração de sacarose (155 g/L), embora no ensaio Tr08 tivesse 10 g/L de DAP e os outros 5 g/L.

Com relação a D.O. máxima a maioria dos ensaios atingiu acima de 1,0 após 10 h, indicando que houve crescimento. O ensaio Tr06 foi o que mais demorou para atingir a D.O. máxima, provavelmente porque neste ensaio tinha a maior concentração de sacarose (200 g/L). Os ensaios Tr01, Tr03 e Tr05 tiveram uma D.O. mais baixa variando de 0,423 a 0,902 entre 9 e 23 h. Entretanto, esses ensaios continham as menores concentrações de sacarose.

Almeida et al (2020), avaliando os efeitos da suplementação com fontes de nitrogênio fosfato de diamônio (DAP) e sulfato de amônio (AS) na fermentação em

mosto de mel a 25° Brix, com a linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP14 foi possível observar que ao final da fermentação os hidromel produzidos a partir da suplementação com DAP apresentaram menor turbidez que os demais.

A análise da Tabela 7 sugere que a velocidade máxima (h^{-1}) foi maior quando a concentração de sacarose era alta, a velocidade aumentou com uma concentração de sacarose acima dos 33 g/L.

Esses resultados indicam que o aumento da concentração de DAP teve uma contribuição positiva em aumento de biomassa e maior multiplicação celular (potencializando a fase exponencial de crescimento) quando o meio contém mais açúcares (meio Tr02 e Tr04 quando comparado com o Tr01 e Tr03). No caso dos meios Tr01 e Tr03, o aumento da concentração de DAP até prejudicou o crescimento.

Ao analisar os resultados de velocidade específica máxima em relação a concentração de sacarose (Figura 8 A) ou por concentração de DAP (Figura 8 B) não se observa contribuição do DAP, pois a velocidade específica máxima é um parâmetro pontual.

Figura 8. Valores de velocidade específica máxima (h⁻¹) por sacarose (A) ou (B) fosfato de diamônio, DAP, durante cultivo da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB a 30°C.

5.3.2 Análise estatística por Superfície de resposta

A análise estatística dos resultados apresentados na Figura 7 da apresenta o gráfico de Pareto (A) e os valores de D.O esperados por valores de D.O obtida no experimento (B) (Figura 9). Na Figura 9A pode-se observar que a sacarose (variável x_1) apresentou maior significância para o crescimento da levedura do que a fonte de nitrogênio (DAP) (variável x_2). O que sugere que a sacarose foi mais importante para o crescimento da levedura do que o DAP. Ainda, na Figura 9B observar-se que a D.O obtida nesse experimento está de acordo com a D.O esperada.

Figura 9. (A) Gráfico de Pareto e (B) valores de D.O. esperados por valores de D.O. experimentais

A análise estatística indica que o modelo quadrático explica 89% da variação dos resultados ($R^2 = 88,7$) e o modelo do DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) ajustado aos dados é:

$$\text{D.O.} = 1,01 + 0,20 x_1 - 0,10 x_1^2 + 0,07 x_2^2 + 0,03 x_1 x_2$$

A interação entre a concentração de Sac e de DAP está apresentada na Figura 10, como curva de contorno.

Figura 10. Curva de contorno para a D.O. em função da concentração de sacarose e de fosfato diamônio (DAP) durante cultivo da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB, a 30°C, elaborado no PROTIMIZA

A análise da Figura 10 indica que a D.O. aumenta com o aumento da concentração de sacarose, independente da concentração de DAP; no entanto, para valores de SAC acima de 125 g/L, a presença de DAP é relevante. Esse indicativo fica mais evidente quando são plotados os valores de D.O. por concentração de sacarose (Figura 11 A) ou D.O. por concentração de DAP (Figura 11 B).

Além disso, pode-se observar na Figura 11 B que a medida que aumenta a concentração de DAP a D.O não tem um aumento significativo, uma vez que, não há grande diferença na D.O entre o ensaio que não tinha DAP e os ensaios que continham DAP.

Figura 11. Valores de D.O. por concentração de (A) sacarose ou (B) fosfato de diamônio, DAP, durante cultivo da linhagem CAT-1 em meio contendo YNB a 30°C.

5.4 Desempenho fermentativo da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo

O desempenho de leveduras foi estudado em meio preparado com sacarose (SAC, $C_{12}H_{22}O_{11}$) como fonte de carbono e fosfato de diamônio (DAP, $(NH_4)_2HPO_4$) como fonte de nitrogênio, utilizando a linhagem CAT-1. Os resultados do desempenho fermentativo em sistema descontínuo, utilizando frascos sem agitação e crescimento em microplaca estão apresentados a seguir.

A partir dos valores apresentados na Tabela 7, foi calculada a relação C/N de todos os meios. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos durante cultivo da levedura para obtenção do desempenho fermentativo.

Tabela 8 – Valores obtidos durante cultivo* da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo

Ensaio	[SAC] (g/L)	[DAP] (g/L)	C/N**	Desprendi/o CO ₂ (g/L)	D.O	Cont. celular	Viab (%)	Acidez total (g/L)	EtOH (g/L)	Eficiência Teórica (%)
Tr11	52,2	2,9	13,68	29,01	12,0	$7,1 \cdot 10^7$	96,8	1,85	21,2	63,0
Tr12	10	10	3,11	9,85	3,41	$3,1 \cdot 10^7$	100	2,69	3,4	52,5
Tr13	155	0	70,87	52,13	14,0	$9,2 \cdot 10^7$	95,2	0,91	86,6	86,3
Tr14	155	10	32,04	46,85	11,9	$7,9 \cdot 10^7$	98,5	3,72	50,0	49,8
Tr15	257,8	17,1	17,55	38,79	9,24	$5,1 \cdot 10^7$	95,4	4,97	36,4	21,9
Tr16	300	10	42,63	39,02	10,34	$6,5 \cdot 10^7$	100	4,01	66,9	34,4

* Condições dos ensaios: meio contendo Sacarose (SAC), fosfato diamônio (DAP) e extrato de levedura (10g/L). Incubação em BOD a 30°C por 24h.

** Valores em destaque foram obtidos por cálculo.

***O meio utilizado neste trabalho continha sacarose como fonte de Carbono. Como um mol de sacarose apresenta 342 g/L, para ocorrer a hidrólise em açúcares redutores totais (ART).

Ao analisar a Tabela 8, pode-se perceber que o ensaio Tr13 que tinha uma concentração de sacarose de 155 g/L e sem DAP, apresentou o maior desprendimento de CO₂ em torno de 52,13g/L, indicando que houve maior fermentação. Os ensaios Tr11, Tr15 e Tr16 tinham uma relação C/N que variou de 13,6 a 42,6, e tiveram um desprendimento de CO₂ variando de 29,0 a 39,0 g/L, obtendo pouca diferença entre eles, apesar de terem concentrações de sacarose e DAP diferentes. O ensaio Tr12 foi o que obteve menor desprendimento de CO₂, porém, este ensaio tinha uma concentração de sacarose baixa (10g/L).

Em relação a densidade ótica (D.O), o ensaio Tr13 foi o que teve uma maior D.O (14), indicando que houve maior crescimento celular. Os ensaios Tr11, Tr15 e Tr16 variaram a D.O em torno de 9,24 e 12,0, não apresentaram grandes diferenças em relação ao ensaio Tr13. Já o ensaio Tr12 obteve a menor D.O (3,41).

A contagem de células variou de $3,1 \cdot 10^7$ a $9,2 \cdot 10^7$. O ensaio Tr13 foi o que apresentou o melhor crescimento ($9,2 \cdot 10^7$), e o ensaio Tr12 foi o que teve o menor crescimento, em virtude de sua menor concentração de sacarose.

A viabilidade dos ensaios foi alta variando de 95,2 a 100%. Os ensaios Tr12 e Tr16 foram os ensaios com maior viabilidade, chegando a 100%. Os demais ensaios tiveram uma viabilidade muito próxima, variando de 95,2 a 98,8%.

A acidez total variou em torno de 0,91 a 4,97 g/L, o ensaio Tr13 foi o que teve a menor acidez total sendo 0,91 g/L. O ensaio Tr15 teve a maior concentração de acidez total em torno de 4,97g/L. Seguindo pelo ensaio Tr16 que foi de 4,1 g/L. Os ensaios Tr11 e Tr12 variaram de 1,85 a 2,69 g/L de acidez total. A medida que se aumenta a concentração de DAP pode-se observar o aumento na acidez total.

A produção de etanol variou de 3,4 a 86,6 g/L. O ensaio Tr13 obteve o maior rendimento em torno de 86,6 g/L, seguido pelo ensaio Tr16 com 66,9 g/L. Os ensaios Tr11 e Tr15 tiveram um rendimento em etanol que variou de 21,2 e 36.4 g/L. O ensaio Tr12 foi o que teve o menor rendimento de etanol, o que pode ser atribuído a sua menor concentração de sacarose (10g/L).

A eficiência teórica foi de 86,3% para o ensaio Tr13, apresentando o melhor desempenho. Os demais ensaios variaram de 21,9 % a 63 %.

Ao avaliar a relação C/N, pode-se notar que o ensaio Tr13 que tinha uma relação C/N de 70,87 (sem DAP), apresentou o melhor desempenho para desprendimento de CO₂, D.O, contagem de células, produção de etanol, acidez total, produção de biomassa e eficiência teórica. Isso indica que a adição de DAP, não foi significativa para o processo fermentativo.

CONCLUSOES

Nos experimentos realizados com meio contendo extrato de levedura (YE), a presença do fosfato de diamônio (DAP) não resultou em diferença ou melhora tanto no crescimento como na fermentação. A adição de extrato de levedura ao meio contribuí para a inibição do efeito do DAP no crescimento, em razão de já ser uma fonte de N para a levedura.

Nos meios sem extrato de levedura, mas contendo meio base YNB (yeast nitrogen base) foi possível observar que o aumento da concentração de DAP teve efeito positivo ao crescimento, quando o meio apresenta maiores concentrações de sacarose.

REFERÊNCIAS

- AGRIMEC. A contribuição da cana-de-açúcar na economia brasileira, 2018. Disponível em <https://agrimec.com.br/a-contribuicao-da-cana-de-acucar-na-economia-brasileira/>. Acesso em 19/11/2020.
- AKRATOS, C.S.; TEKERLEKOPOULOU, A.G.; VASILIADOU, I.A.; VAYENAS, D.V. Olive Mill Waste: Recent advances for sustainable management. Elsevier Inc., 2017. Cap 8, p. 161-182. 2017.
- ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996.
- ALCARDE, J.C. **Manual de análise de Fertilizantes**- Piracicaba: FEALQ, 259p., 2009.
- ALMEIDA, E.L.M.; SILVA, G.M.; VASSALLI, I.A.; SILVA, M.S.; SANTANA, W.C.; SAILVA, P.H.A.; ELLER, M.R. Effects of nitrogen supplementation on *Saccharomyces cerevisiae* jp14 fermentation for mead production. **Food Science and Technology**, v. 40, n. June, p. 336–343, 2020.
- AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Wine and must analysis**. London: John Wiley & Sons. 121p. 1974.
- AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 448 p. 2005.
- AMORIM, H.V. **Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos**. In: Semana de Fermentação Alcoólica “Jaime Rocha de Almeida”, 4., Piracicaba, 1985. Anais. Piracicaba: ESALQ, 1985. p.144 – 148.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267- 1275, 2011.
- ANDRIETTA, M.G.S. et al. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.
- ANDRIETTA, M.G.S; STECKELBERG, C.E; ANDRIETTA. S.R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. **Multi Ciências: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, Campinas, v. 7, n. 7, p. 1-16, 2006.
- AQUINO, A.F.; BIDÔ, E.S.; GALVÃO, M.L.M.; OLIVEIRA, V.N. O Etanol da cana-de-açúcar: possibilidades energéticas da região de Ceará-Mirim-RN. **Holos**, v. 1, p. 105-125, 2014.
- AZHAR, S.H.M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S.A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J.A.; FAIK, A.A.M.; RODRIGUES, K.F. Yeast in sustainable bioetanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52- 61, 2017.
- BABRZADEH, F. et al. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, n. 6, p. 485–494, 2012.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, Biotecnologia Industrial, v. 3, p. 1–43, 2001.

BASSO, L.C.; ROSA, C.A. Sugar cane for potable and fuel ethanol. In: WALKER, G.M.; HUGHES, P.S. (Eds.) *Distilled Spirits-New Horizons: Energy, Environment and enlightenment*. Proceedings of the Worldwide Distilled Spirits Conference, Edinburgh, 2008. Nottingham University Press: Nottingham, p. 1-7. 2010.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, n.7, p.1155-1163, 2008.

BATISTOTE, M.; CRUZ, S.H; ERNANDES, J.R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine strains influenced by the complexity of the nitrogen source. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 2, p. 84-91, 2006.

BETITE, V.C.; MIRANDA JR, M.; OLIVEIRA, J.E.; ERNANDES, J.R. Very high gravity sucrose fermentation by Brazilian industrial yeast strains: Effect of nitrogen supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 2, p. 174–178, 2012.

BNDS, CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDS, p. 316. 2008.

BORGES, E.P.; LOPES, M.L.; BERNARDINO, C.; GODOY, A.; RÉ, F.E.; CHERUBIN, R.A.; PAULILLO, S.C.L.; AMORIM, H.V. The benefits of applied research: 37 years of discoveries, adaptations and solutions. **Sugar Industry**, n. 4, p. 209–216, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial; Murilo Carlos Muniz Veras (Org.) – Brasília : MAPA/ SDA/CGAL, 2017. 220 p.

BROACH, J.R. Nutritional control of growth and development in yeast. **YeastBook Gene Expression & Metabolism**, v. 192, p. 73–105, 2012.

BROWN, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLD, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 277-290, 2013.

BRUST, G.E. **Management strategies for organic vegetable fertility**. In: Biswas D, Micallef SA (eds) *Safety and practice for organic food*. Academic Press, London, pp 193–212. 2019.

CAMPOS, C.R.; SILVA, C.F.; DIAS, D.R.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; SCHWAN, R.F. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p.1871-1879, 2009.

CARDOSO, M.G. Produção de aguardente de cana. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 445 p.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Microbiologia da fermentação alcoólica**: A importância do monitoramento microbiológico em destilarias. São Carlos: EdUFSCar, 105p. 2010.

CERQUEIRA, D.P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. 2013. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, 2013.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. – v. 7 - Safra 2020/21 N.3 - Terceiro levantamento, Brasília, Dez 2020. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso: 20/03/2021

CRÉPIN, L.; NIDELET, T.; SANCHEZ, I.; DEQUIN, S.; CAMARASA, C. Sequential use of Nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of Nitrogen permeases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 22, 2012.

CRUZ, M.L.; RESENDE, M.M.; RIBEIRO, E.J. Evaluation of process conditions in the performance of yeast on alcoholic fermentation. **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 6, p. 846–855, 2018.

CRUZ, S.H. **Efeito da natureza da fonte de nitrogênio no fluxo metabólico do carbono em microrganismos: estudos enzimáticos e fisiológicos com leveduras Crabtree positivo e negativo**. 2002. 140 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. 2002.

CRUZ, S.H.; BASTITOTE, M.; ERNANDES, J.R. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of the nitrogen source on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 4, p. 349-355, 2003.

CRUZ, S.H.; CASSIO, F.; LEÃO, C.; ERNANDES, J.R. O efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no transporte de amônio em *Saccharomyces cerevisiae*. **Eclética Química**, v. 26, p. 157-173, 2001.

CRUZ, S.H.; CILLI, E.M.; ERNANDES, J.R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 108, p. 54-61, 2002.

DANESI, E.D.G.; MIGUEL, A.S.M.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; PESSOA, A. Effect of carbon:nitrogen ratio (C:N) and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 1, p. 96-103, 2006. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.03.054.

FLORES, C.L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non- conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, Madrid, v. 24, p. 507-529, 2000.

FRANCISCHETTI, G. **Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração de açúcar em sistema descontínuo alimentado**. 2017. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2017.

GINÉSY, M.; RUSANOVA-NAYDENOVA, D.; ROVA, U. Tuning of the carbon-to-nitrogen ratio for the production of L-Arginine by *Escherichia coli*. **Fermentation**, v. 3, n. 4, 2017.

GOBERT, A.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; SPARROW, C.; MORGE, C.; ALEXANDRE, H. Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. **Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 71–85, 2019.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOIUS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-567, 1996.

GRANT, C.L.; PRAMER, D. Minor element composition of yeast extract. **Journal of bacteriology**, v. 84, n. 4, p. 869, 1962.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, São Paulo: Editora Edgar Blucher, cap. 6, v. 2, p. 106- 120, 2001.

HOFMAN-BANG, J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 256–281, 1999. DOI: 10.1385/MB:12:1:35

KOTARSKA, K.; CZUPRYŃSKI, B.; KŁOSOWSKI, G. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 965–971, 2006.

JOHN, G.S.M.; GAYATHIRI, M.; ROSE, C.; MANDAL, A.B. Osmotic shock augments ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 2918. **Current Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 100-105, 2012.

LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v.11, p. 641-649, 1981.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, São Paulo: Editora Edgar Blucher, cap.1, v.3, p.01- 43, 2001.

LOPES, A.C.A.; PINTO, I.O.; SOUZA, C.M.; CANGUSSU, A.S.R.; OLIVEIRA, M.E.R. Cinética de crescimento de levedura em mosto de cagaita para produção de bebida fermentada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 06, 2015.

LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C.L.; CHERUBIN, R.A.; GODOY, A.; NETO, H.B.A.; AMORIM, H.V. Linhagens de leveduras personalizadas para produção de etanol: Seleção dirigida pelo processo. **Fermentec Tecnologias em Açúcar e álcool Ltda**. 1ª edição, Piracicaba. 2015.

LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C.L.; CHERUBIN, R.E.; LORENZI, M.S.; GIOMETRI, F.H.C.; BERNARDINO, C.D.; NETO, H.B.A.; AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

LOURENCETTI, N.M.S.; ÚBERE, F.D.; LACERDA, M.P.F.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; ZANELLI, C.F.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; GATTÁS, E.A.L. Phenotypic characterization of yeasts aiming at bioethanol production. **Yeast - Industrial Applications**, 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70042>.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582–595, 2008.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice-Hall, 624 p. 2008.

MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. In: BROACH, J.R.; STRATHERN, J.N.; JONES, E.W. (Ed). **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression**, New York: Cold Spring Harbor, v. 2, p. 283, 1992.

MANIKANDAN, K.; VIRUTHAGIRI, T. Optimization of C/N ratio of the medium and fermentation conditions of ethanol production from tapioca starch using co - culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 2, p. 947–955, 2010.

MARTÍNEZ-MORENO, R.; MORALES, P.; GONZALEZ, R.; MAS, A.; BELTRAN, G. Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 4, p. 477–485, 2012.

MATTANOVICH, D.; SAUER, M.; GASSER, B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 34, p. 2-5, 2014.

MENDES FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEÃO, C. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 540-545, 2004. DOI. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x>

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MONTEIRO, B.M.S. **Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**. 2016. 137 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2016.

MONTEIRO, B.; FERRAZ, P.; BARROCA, M.; CRUZ, S.H.; COLLINS, T.; LUCAS, C. Conditions promoting effective very high gravity sugarcane juice fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2018.

MOREIRA, B.L.D.; PARAZZI, C.; PAPIN, L.F.; LOPES, J.J.C. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* alcoólica. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1672–1677, 2013.

MULLER, J.L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 688–693, 2007.

NASCIMENTO, V.M., FONSECA, G.G. Effects of the carbon source and the interaction between carbon sources on the physiology of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, DOI: 10.1080/10826068.2019.1703192.1- 8 p, 2019.

NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI FILHO, W.G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP, 2005. 71 p.

NOVACANA. **Sobre o etanol**. 2018. Disponível <<https://www.novacana.com/etanol/sobre/>>. Acesso em 07 ago. 2018.

NOVACANA 2020 Disponível <<https://www.novacana.com/etanol/sobre/>>. Acesso em 30 mar 2021.

NOVIADI, R.; ZAIRIFUL, Z.; CANDRA, A. A. Improvement of carbon-to-nitrogen (C/N) ratio by making cassava leaf silage and its implications in digestibility in goat. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 15, n. 2, p. 127–132, 2018.

PAVLAK, M.C.M.; LIMA, T.L.A.; CARREIRO, S.C.; PAULILLO, S.C.L. Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. International Year of Chemistry 2011. **Química Nova**, Vol. 34, No. 1, 82-86, 2011.

PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Yeasts associated with plants, insects and soils. **Yeasts**, v. 1, p. 123-180, 1987.

RIBEIRO, C.A.F.; BLUMER, S.A.G.; HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira**. Tecnologia do álcool. **Apostila do Álcool**. 2º parte. Piracicaba, 1999.

SALLA, D.A.; FURLANETO, F.P.B.; CABELLO, C.; KANTHACK, R.A.D. Energetic study of ethanol production from the corn crops. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 9, p. 2017–2022, 2010.

SANTOS, A.M. **Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco**. 2008. 69 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2008.

SANTOS, E.F.S.; SCHAUTZ, L.C.A.; CARDOSO, C.A.L.; ERNANDES, J.R.; BATISTOTE, M. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. **Ciência e Natureza**, v.35, n.2, p.009- 01, 2013.

SANTOS J, LEITÃO-CORREIA F, SOUSA MJ, LEÃO C. Nitrogen and carbon source balance determines longevity, independently of fermentative or respiratory metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23033-23042, 2016. DOI:10.18632/oncotarget.8656

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, J.R.A.; GUSMÃO, N.B.; GOUVEIA, E.R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 75–80, 2010.

SANTOS, M.S.M.; CARDOSO, C.; SILVA, E.M.; BATISTOTE, M. Potential of saccharine substrates for ethanol production. **Orbital**, v. 10, n. 1, p. 14–21, 2018. DOI: 10.17807/orbital.v10i1.1013

SCHNEPER, L.; DUVEL, K.; BROACH, J.R. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, 624- 630. 2004.

SICARD, D.; LEGRAS, J.L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 229–236, 2011.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**-2. ed. rev. ampl. - Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p

STROPPIA, C.T.; ALVES, J.G.L.F.; FIGUEIREDO, A.L.F.; CASTRO, C.C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1978-1983, 2009.

SZWARC, A. O impacto do uso do etanol na qualidade do ar das grandes cidades. In: CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de cana de açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 185-193. 2010.

THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.7, p. 2046-2050, 1990.

União da Indústria de cana-de-açúcar- UNICA. **Etanol energia sustentável**. 2019. Disponível em:< <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/etanol/>>. Acesso em 18 fev. 2020.

USDA-NRCS- United States Department of Agriculture- Natural Resources Conservation Servic. **Carbon to Nitrogen Ratios in Cropping Systems**. p. 2, 2011.

VILANOVA, M.; PRETORIUS, I.S.; HENSCHKE, P.A. **Influence of diammonium phosphate addition to fermentation on wine biologicals**. 2015. In. PREEDY, V. Processing and Impact on Active Components in Food, Academic Press, 2015, p. 483-491. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00058-5>.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P.A. Assimilable nitrogen utilization and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.77, n. 1, p.145-157, 2007.

WHITE, J. **Yeast technology**. London, Chapman and Hall, 1954, 432 p.

ANEXOS

Anexo 1. Composição do meio base YNB

Technical Data

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids

M878

Yeast Nitrogen Base without Amino Acids is used for investigating carbon and nitrogen requirements of yeasts.

Composition**

Ingredients	Gms / Litre
Ammonium sulphate	5.000
Monopotassium phosphate	1.000
Magnesium sulphate	0.500
Sodium chloride	0.100
Calcium chloride	0.100
Boric acid	0.0005
Copper sulphate	0.00004
Potassium iodide	0.0001
Ferric chloride	0.0002
Manganese sulphate	0.0004
Sodium molybdate	0.0002
Zinc sulphate	0.0004
Biotin	0.000002
Calcium pantothenate	0.0004
Folic acid	0.000002
Inositol	0.002
Niacin	0.0004
p-Amino benzoic acid (PABA)	0.0002
Riboflavin (Vitamin B2)	0.0002
Pyridoxine hydrochloride	0.0004
Thiamine hydrochloride	0.0004
Final pH (at 25°C)	5.4±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

Directions

Anexo 2. Composição do extrato de levedura Bacto

Certificate of Analysis

Bacto™ Yeast Extract

Catalog Number: 212750
 Lot Number: 2186295

 Manufacturing Date: 2020-Feb-11
 Expiration Date: 2025-Feb-28
 Bulk Lot Number: 2195727

TEST	SPECIFICATION	RESULT	UNITS
Appearance (1% Solution) <small>Light-medium amber, clear, may have a very slight precipitate.</small>	Pass	Pass	
Appearance (2% Solution) <small>Medium amber, clear, may have a very slight precipitate.</small>	Pass	Pass	
Ash	0.0 - 15.0	10.3	%
Coagulable Protein <small>Not Present.</small>	Pass	Pass	
Cultural Response <small>Response for Neisseria meningitis (ATCC® 13090) is fair to good. Responses for Staphylococcus aureus (ATCC® 25923) and Streptococcus pneumoniae (ATCC® 6305) are good.</small>	Pass	Pass	
Dehydrated Appearance <small>Light to medium beige, to medium tan, free-flowing, homogeneous.</small>	Pass	Pass	
Loss on Drying	0.0 - 5.0	4.1	%
Nitrogen	9.0 - 12.0l	11.1	%
pH at 25°C	Check and Record	6.8	
Sodium Chloride	0.0 - 5.0	0.0	%
Solubility (1% solution) <small>Soluble in distilled or deionized water.</small>	Pass	Pass	
Solubility (2% solution) <small>Soluble in distilled or deionized water.</small>	Pass	Pass	

The test method for Nitrogen characteristic is: Kjeldahl.

The Batch Number on this certificate is synonymous with the Lot Number shown on the product label.

Cultural Response: A solution of 1% Yeast Extract plus 0.5% sodium chloride was prepared and the pH was adjusted to 7.2 +/- 0.2 using diluted NaOH. The medium was dispensed into tubes and sterilized. Tubes were inoculated with the test organisms and incubated at 35°C +/- 2°C for 18-48 hours.

Residual Solvents (CPMP/ICH/283/95): Typical analysis for Yeast Extracts indicates that there is less than 3880 ppm of cyclohexane. No other solvents were detected during analysis.

This product is animal free: There are no animal sourced ingredients used in the manufacture of this product. Advanced Bioprocessing is an ISO 9001:2015 registered facility. This product met Advanced Bioprocessing stringent quality standards at time of batch/lot release. Any test results reported on this certificate were obtained at time of release. This material is not for human or animal consumption.

Life Technologies Corporation
 50 NW 176TH ST Miami, FL 33169-5043 US

Fonte: Thermo Fischer. Disponível em

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/212750#/212750>. Acesso: 30/03/2021

Anexo 3. Análise físico-química dos meios utilizados

Sandra Helena da Cruz Caixa Postal 09 13.418-900 - Piracicaba - SP		Número: 0016994.1-N - O.S.: 10100 Data de Recebimento: 04/02/2020 Data de Finalização: 20/02/2020		Data de Emissão: 20/02/2020	
Proprietário:	Propriedade:	Material:			
Sandra Helena da Cruz	LAN II	Mat. Org. vinhaça

Nº LAB	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA
175	Amostra 1 - Sandra H. Cruz
176	Amostra 4 - Sandra H. Cruz
177	Amostra 5 - Sandra H. Cruz
178	Amostra 6 - Sandra H. Cruz
179	Amostra 7 - Sandra H. Cruz
180	Amostra Mel - Sandra H. Cruz

DETERMINAÇÕES	UNIDADES	AMOSTRAS							
		175	176	177	178	179	180		
pH		5,7	6,0	6,1	6,0	6,0	5,6		
Densidade	g/mL	0,97	1,06	0,98	1,08	1,03	1,05		
Resíduo Mineral + Orgânico (RMO) 110 °C	g/L	49,48	178,02	19,03	210,92	162,03	253,55		
Matéria Orgânica (M.O.)	g/L	42,36	119,41	17,19	188,78	159,46	247,14		
Resíduo Mineral Total (R. M. T)	g/L	7,19	58,77	1,90	22,19	2,63	6,53		
Carbono Total	g/L	23,53	66,34	9,55	104,88	88,59	137,30		
Resíduo Mineral Insolúvel (R.M.I)	g/L	0,07	0,16	0,06	0,05	0,06	0,12		
Resíduo Mineral Solúvel (R.M.S)	g/L	7,12	58,61	1,84	22,14	2,57	6,41		
Nitrogênio Total	g/L	1,72	3,78	3,07	2,46	1,25	0,84		
Fósforo (P2O5)	g/L	1,69	7,56	5,57	4,94	0,25	0,16		
Potássio (K2O)	g/L	0,64	0,62	0,70	0,60	0,64	1,90		
Cálcio (Ca)	g/L	0,24	0,23	0,22	0,23	0,23	0,46		
Magnésio (Mg)	g/L	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,27		
Enxofre (SO4) Total	g/L	0,09	0,06	0,10	0,07	0,10	0,20		

Métodos: pH leitura direta da amostra determinação potenciométrica; Densidade (m/v); Fósforo (P2O5) determinado por espectrofotômetro solução de vanadomolibdica; Potássio (K2O) por Fotometria de Chama; Enxofre (S) Gravimétrico do sulfato de bário; Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) por espectrofotometria de absorção atômica extraído com solução Nítrico-Perclórica; (Ref.: BRASIL, 2017. Manual de Métodos Oficiais para Fertilizantes Minerais, Orgânicos e Corretivos. MAPA). Nitrogênio total digestão sulfúrica (Kjeldahl) (Ref.: SILVA, Fábio Cesar. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. - Brasília, DF: Embrapa, 2009). Resíduo Mineral + Orgânico (RMO) 110°C (Resíduo 110°C), Resíduo Mineral Total (RMT) (Sólidos Totais), Carbono Total, Resíduo Mineral Insolúvel (RMI) (Sólidos Totais Fixos Insolúveis), Resíduo Mineral Solúvel (RMS) (Sólidos Totais Voláteis) por combustão em Mufla.(Ref.: ALCARDE, José Carlos. Manual de Análise de Fertilizantes - Piracicaba: FEALQ, 2009.)

Página 1 de 1

	SIGNATÁRIO AUTORIZADO

Av. Pádua Dias, 11 - Piracicaba-SP - CEP 13418-900 - Tel.: (19) 3417-2117 / 3417-2159 - iso.lab@usp.br - www.esalqsolos.com.br

Obs. As amostras 1, 4, 5, 6, 7 correspondem, respectivamente, a Tr11, Tr15, Tr12, Tr16 e Tr13