

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

**Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**

**Bruno Miguel dos Santos Monteiro**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba  
2016**

Bruno Miguel dos Santos Monteiro  
Licenciado em Engenharia Agrícola

**Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na  
fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciências. Área de concentração: Ciência e  
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba  
2016**

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

Monteiro, Bruno Miguel dos Santos

Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar / Bruno Miguel dos Santos Monteiro. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

137 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Glicerol 3. Reciclo 4. Ureia I. Título

CDD 663.13  
M775p

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

## DEDICATÓRIA

Todo este esforço dedicado aos meus Pais, Julieta e Acácio;  
À minha irmã Daniela;

*“Os homens são como as obras de arte: é preciso que se não entenda tudo delas duma só vez”*

*(Miguel Torga in Diários)*



## AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a minha mãe e ao meu pai por tornarem toda esta jornada possível, suportando-me de todas as maneiras possíveis dando-me confiança e carinho entre todas as outras coisas que tornam o nosso processo de formação enriquecedor, a Ana por estar comigo de todas as formas nesta fase final.

Agradeço a Professora Sandra Helena da Cruz por ter tornado este Doutorado possível.

Um agradecimento especial a Professora Doutora Cândida Lucas por me ter ajudado muito no meu Doutoramento com conhecimento e por me ter aberto as portas do laboratório da Universidade do Minho.

Agradeço a instituição Universidade Minho em especial ao Mário por toda a ajuda e paciência.

Agradeço também ao Moïse Cunha pela grande amizade.

Agradeço ao amigo Felipe Ribeiro e por me ter ajudado muito no Brasil com uma amizade muito grande.

Aos amigos Enzo e Danilo por boas conversas e sábios conselhos.

Agradeço a Ellen Karine Viegas e ao Márcio pela amizade criada dentro desta instituição e que me nos ajudamos mutuamente a superar as adversidades do trabalho sempre com uma bela gargalhada.

Gostaria de agradecer ao Diogo Patrini Cerqueira pela amizade e pelos almoços de Sábado e Domingo no Laboratório, pela ajuda neste trabalho, sem ele não teria sido possível.

Agradeço aos amigos do Coro Misto em especial ao Carlos Meireles.

Agradeço ao senhor Engenheiro Fernando Silva e a senhora Doutora Inês Silva sempre contribuindo com valiosos conselhos.

Agradeço aos amigos de Portugal e do Brasil que sempre me acompanharam em todas as fases da Vida.

Agradeço ao Professor André Ricardo Alcarde por me ter proporcionado este doutorado e principalmente por me ter feito crescer e me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço ao meu melhor amigo Luís Filipe Nascimento da Silva por também sempre me ter apoiado e por em conjunto com a Fátima Silva me terem dado um afilhado a quem também dedico.

Ao Mateus por optima companhia no dia a dia, e por me ter inculido o habito de tomar um "MATE".

Agradecimento especial á FAPESP (Agencia e Fomento á pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro do projecto.

Meu muito obrigado!

## EPÍGRAFE

*“Vê-se primeiro um mar de pedras.  
Vagas e vagas sideradas, hirtas e hostis, contidas na sua força desmedida pela mão  
inexorável dum Deus criador e dominador.  
Tudo parado e mudo.  
Apenas se move e se faz ouvir o coração no peito, inquieto, a anunciar o começo  
duma grande hora.  
De repente, rasga a crosta do silêncio uma voz de franqueza desembainhada:  
- Para cá do Marão, mandam os que cá estão!...  
Sente-se um calafrio. A vista alarga-se de ânsia e de assombro.  
Que penedo falou?  
Que terror respeitoso se apodera de nós?  
Mas de nada vale interrogar o grande oceano megalítico, porque o nume invisível  
ordena:  
- Entre!  
A gente entra, e já está no Reino Maravilhoso.”*

*Miguel Torga*





## SUMÁRIO

RESUMO-----	11
ABSTRACT-----	13
LISTA DE FIGURAS-----	15
LISTA DE TABELAS-----	19
1 INTRODUÇÃO-----	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	25
2.1 Características gerais de leveduras-----	25
2.2 Metabolismo do carbono em <i>S. cerevisiae</i> -----	28
2.2.1 Via glicolítica-----	28
2.2.2 Respiração-----	30
2.2.3 Fermentação-----	30
2.2.4 Regulação das opções metabólicas-----	32
2.3 Metabolismo do nitrogênio em leveduras-----	35
2.3.1 O metabolismo associado à assimilação de nitrogênio-----	36
2.3.2 Transportadores de nitrogênio e sua regulação-----	40
2.3.3 A repressão catabólica pelo nitrogênio-----	41
2.4 Regulação do metabolismo do carbono pelo nitrogênio-----	42
2.4.1 Via de sinalização TOR (Target of Rapamycin)-----	44
2.4.2 Regulação simultânea pelas fontes de nitrogênio e de carbono-----	49
2.4.3 Via de sinalização HOG (High Osmolarity Glycerol)-----	49
2.5 Fatores de stress nas leveduras-----	52
2.5.1 Stress pelo Etanol-----	53
2.5.2 Pressão Osmótica-----	54
2.6 Fermentação com alto teor alcoólico-----	55
2.6.1 Efeito da Suplementação Nitrogenada-----	56
2.6.2 Efeito da suplementação com Fosfato-----	57
3 MATERIAL E MÉTODOS-----	61
3.1 Microrganismo e preparo do inóculo-----	61
3.2 Preparo do mosto-----	61
3.3 Ensaios de Fermentação-----	61
3.4 Análises-----	62

3.4.1 Análise da viabilidade celular-----	62
3.4.2 Análises físico-químicas-----	62
3.5 Tratamento estatístico dos resultados-----	63
3.6 Cálculo do Rendimento e Produtividade-----	63
4 RESULTADOS -----	65
4.1 Estudos realizados com a linhagem PE-2-----	66
4.1.1 Mosto concentrado a 25 °Brix-----	66
4.1.2 Mosto concentrado a 30 °Brix-----	72
4.1.3 Mosto concentrado a 35 °Brix. -----	76
4.1.4 Rendimento fermentativo e produtividade em mosto concentrado a 25, 30 e 35°Brix-----	80
4.2 Estudos realizados com a linhagem CAT-1-----	84
4.2.1 Mosto concentrado a 25 °Brix-----	84
4.2.2 Mosto concentrado a 30 °Brix-----	88
4.2.3 Mosto concentrado a 35 °Brix-----	93
4.2.3 Rendimento fermentativo e produtividade em mosto concentrado a 25, 30 e 35° Brix-----	96
4.3 Estudos complementares de produção de glicerol durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto com 30 °Brix-----	101
5 CONCLUSÕES -----	105
REFERÊNCIAS-----	107

## RESUMO

### **Produção de etanol combustível: efeito da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**

O nitrogênio desempenha função essencial na fisiologia das leveduras e em fermentações com alta concentração de açúcares propicia maior rendimento, eficiência e produtividade, além de proteger as células de levedura dos estresses osmóticos provocados pelas altas concentrações de açúcar e de etanol. Com o objetivo de verificar a influência da suplementação nitrogenada nos parâmetros fermentativos, mostos contendo caldo de cana concentrado a 25, 30 ou 35° Brix e suplementados ou não com ureia (16 mM) ou fosfato de amônio (24 mM), foram fermentados a 30°C por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (linhagens PE-2 ou CAT-1) em 6 ciclos consecutivos de 24h. Ao final de cada ciclo, foram analisados: a massa úmida (biomassa) por pesagem após a centrifugação; a viabilidade celular pelo método de coloração com eritrosina e a concentração de etanol em densímetro digital (Anton Paar DMA 4500), após destilação das amostras por arraste de vapor em destilador Tecnal TE-012 e açúcar por cromatografia líquida (HPLC). A concentração de nitrogênio total utilizável foi determinada pelo método da ninidrina, utilizando glicina como padrão. Em mosto contendo 30°Brix, a linhagem CAT-1, produziu teores de etanol, em média, de 12,9, 17,1 e 14,4% (v/v), respectivamente, nos tratamentos controle (T1) ou suplementado com ureia (T2) ou fosfato (T3). Nesta condição, a linhagem PE-2, produziu 14,9 (T1), 15,8 (T2) e T3 15,8% (v/v) e a massa úmida da CAT-1 aumentou de 7% para 16%, na presença de fosfato. Na fermentação do mosto 35°Brix, pelas duas linhagens, a suplementação com fosfato (T3) propiciou maior produção de etanol, aumento de massa úmida e manutenção da viabilidade celular. A levedura CAT-1, no tratamento com 30° Brix, produziu mais glicerol no tratamento com fosfato de amônio sendo quase 1g de glicerol por cada 1g de biomassa produzida. A suplementação com ureia teve efeitos benéficos na fermentação VHG possibilitando uma produção maior de etanol, e uma produção menor de glicerol face às outras suplementações nitrogenadas.

Palavras-chave: Fermentação; *Saccharomyces cerevisiae*; Glicerol; etanol; Ureia



## ABSTRACT

### **Fuel ethanol production: effect of nitrogen supplementation in the fermentation of must of sugarcane juice with high concentrations of sugar**

Nitrogen plays an essential role in the physiology of yeast and fermentation of high concentration sugars. It provides higher yield, efficiency and productivity, as well as protects yeast cells from osmotic stress caused by high concentrations of sugar and ethanol. To evaluate the influence of nitrogen supplementation on fermentative parameters, must containing concentrated sugarcane juice to 25, 30 or 35°Brix and supplemented or not with 16 mM urea or 24 mM ammonium phosphate were fermented at 30°C by PE-2 or CAT-1 yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* into 6 consecutive cycles of 24h. At the end of each cycle, cell viability by staining with erythrosine method, wet mass (biomass) by weighing; and the ethanol concentration in digital densitometer, after samples distillation were analyzed. The concentration of total usable nitrogen was determined by the ninhydrin using glycine as standard. In 30°Brix wort, CAT-1 strain produced averaged 12.9, 17.1 and 14.4% (v/v) of ethanol concentration, respectively, in the (T1) control or with (T2) urea or (T3) phosphate supplemented treatments. In this condition, the PE-2 strain produced 14.9 (T1), 15.8 (T2) and T3 15.8% (v / v) and the wet weight of CAT-1 increased from 7% to 16%, in the presence of phosphate. In the fermentation of the must 35°Brix by the two strains, supplementation with phosphate (T3) led to increased ethanol production, increased wet weight and maintenance of cell viability. CAT-1 strain, in 30°Brix, produced more glycerol upon treatment with ammonium phosphate being about 1 g glycerol per 1 g of biomass produced. Supplementation with urea had beneficial effects on VHG fermentation enabling increased production of ethanol, and a lower production of glycerol against other nitrogen supplementation.

Keywords: Fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; Glycerol; Ethanol; Urea



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema representando os ciclos de vida haploide e diploide de *S. cerevisiae* .....26
- Figura 2 - Vias glicolítica e gluconeogénica de *S. cerevisiae*.....29
- Figura 3 - (A) Principais vias metabólicas de *S. cerevisiae* em que o glicerol está envolvido. (B) Glicerol 3P redox shuttle.....31
- Figura 4 - Vias associadas ao metabolismo da glutamina e do glutamato .....37
- Figura 5 - (A) Cascata de sinalização TOR em *S. cerevisiae*. (B) Modelo da forma como a via TOR sinaliza para a via da PKC.....46
- Figura 6 - TOR1/2 de *S. cerevisiae*, quer inibido pela rapamicina (RAP), ou não ativado por falta de uma boa fonte de nitrogênio impede a localização nuclear do ativador da transcrição Gln3 .....48
- Figura 7 - Cadeia de sinalização que provocam a ativação das hog .....50
- Figura 8 - Alguns dos fatores estressantes aos quais as leveduras são submetidas52
- Figura 9 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura PE-2 em mosto concentrado a 25° Brix a 30°C durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■). .....67
- Figura 10 - Viabilidade (A) e Massa Úmida (B) da levedura PE-2 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 25° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■).....71
- Figura 11 - Nitrogênio no meio da linhagem PE-2 durante fermentação em mosto concentrado a 25° Brix a 30°C, em 6 ciclos sucessivos suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■).....72
- Figura 12 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura PE-2 em mosto concentrado a 30° Brix a 30°C durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■). .....73
- Figura 13 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura PE-2 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 30° Brix, a 30°C



- suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■) ..... 75
- Figura 14 - Nitrogênio no meio da linhagem PE-2 durante fermentação em mosto concentrado a 30° Brix a 30°C, em 6 ciclos sucessivos suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■) ..... 76
- Figura 15 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura PE-2 em mosto concentrado a 35° Brix a 30°C durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■)..... 77
- Figura 16 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura PE-2 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 35° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■) ..... 79
- Figura 17 - Nitrogênio no meio da linhagem PE-2 durante fermentação de mosto concentrado a 35° Brix em 30°C, em 6 ciclos sucessivos, suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)..... 80
- Figura 18 - Rendimento e produtividade durante fermentação da linhagem PE-2 em mosto a 25, 30 e 35°Brix..... 83
- Figura 19 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura CAT-1 em mosto concentrado a 25° Brix a 30°C durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■)..... 85
- Figura 20 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura CAT-1 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 25° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■) ..... 87
- Figura 21- Nitrogênio no meio da linhagem CAT-1 durante fermentação em mosto concentrado a 25° Brix a 30°C, em 6 ciclos sucessivos suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■) ..... 88
- Figura 22 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura CAT-1 em mosto concentrado a 30° Brix a 30°C durante 24 horas em

6ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■). .....	90
Figura 23 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura CAT-1 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 30° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■).....	92
Figura 24 - Nitrogênio no meio da linhagem CAT-1 durante fermentação em mosto concentrado a 30° Brix a 30°C, em 6 ciclos sucessivos suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■).....	93
Figura 25 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura CAT-1 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 35° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■).....	94
Figura 26 - Desprendimento de CO2 observado durante fermentação da levedura CAT-1 em mosto concentrado a 35° Brix a 30°C durante 24 horas em 6ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■). .....	95
Figura 27 - Rendimento e produtividade durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 25, 30 e 35°Brix .....	100
Figura 28 - Produção de glicerol extracelular durante um ciclo fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto 30°Brix a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■) .....	103
Figura 29 - Razão entre biomassa (peso úmido) e glicerol produzidos pela linhagem CAT-1 em mosto 30° Brix a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■).....	104
Figura 30 - Melhores resultados obtidos entre todos os tratamentos durante fermentação das linhagens PE-2 e CAT-1 em mosto 25 ou 30 °Brix sem suplementação nitrogenada (controle) ou suplementado com fosfato de amônio (fa) ou ureia (ur) .....	127
Figura 31 - Cromatograma da quinta hora do tratamento control terceira repetição	127



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação de mosto a 25°Brix pela linhagem PE-2 a 30°C ao final de cada ciclo fermentativo de 24 h .....	68
Tabela 2 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação de mosto a 30°Brix pela linhagem PE-2 após 24 h de cada ciclo fermentativo .....	74
Tabela 3 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação da linhagem PE-2 em mosto a 35 °Brix, após 24 de cada ciclo fermentativo .....	78
Tabela 4 - Rendimento fermentativo e produtividade da linhagem PE-2 nos mostos a 25, 30 e 35°Brix sem ou com suplementação com ureia (16 mM) ou fosfato de amônio (24 mM), após 2, 4 e 6° ciclo fermentativo de 24h .....	81
Tabela 5 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação da linhagem CAT-1 em mosto concentrado a 25 °Brix nos 6 ciclos fermentativos, após 24 de cada ciclo .....	86
Tabela 6 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação da linhagem CAT-1 em mosto concentrado a 30 °Brix nos 6 ciclos fermentativos, após 24 de cada ciclo. Ensaio realizado em caldo de cana sem suplementação, ou suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato .....	91
Tabela 7 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 35 °Brix nos 6 ciclos fermentativos, após 24 de cada ciclo .....	96
Tabela 8 - Rendimento fermentativo da linhagem CAT-1 nos mostos concentrado a 25, 30 e 35°Brix, nos 2°, 4° e 6° ciclos fermentativos. Ensaio realizado em caldo de cana - mosto concentrado a 25, 30 e 35 °Brix - a 30 °C, sem suplementação, ou suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, durante 24, em 6 ciclos sucessivos. ....	99
Tabela S1 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 25 °Brix pela linhagem PE-2 em quatro ciclos fermentativos, durante as primeiras 8 h e após 24 h de cada ciclo, a 30°C .....	128
Tabela S2 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 30°Brix pela linhagem PE-2 durante as primeiras 8 h e após 24 h nos três ciclos fermentativos .....	129
Tabela S3 Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 30°Brix pela linhagem PE-2 durante as primeiras 8 h e após 24 h no 4° e 6° ciclos fermentativos .....	130

Tabela S4 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 35°Brix pela linhagem PE-2 durante as primeiras 8 h e após 24 h nos três primeiros ciclos fermentativo.....	131
Tabela S5 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 35°Brix pela linhagem PE-2 durante as primeiras 8 h e após 24 h no 4°, 5° e 6° ciclos fermentativos .....	132
Tabela S6 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto concentrado a 25 °Brix nos 1°, 2° e 3° ciclos fermentativos durante as primeiras 8 h e após 24 h de cada ciclo.....	133
Tabela S7 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto concentrado a 25 °Brix no 6° ciclo fermentativo durante as primeiras 8 h e após 24 h de cada ciclo.....	134
Tabela S8 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 30 °Brix a 30°C durante o 1°, 2° e 3° ciclo fermentativo.....	135
Tabela S9 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 30 °Brix a 30°C durante o 4°, 5° e 6° ciclo fermentativo.....	136
Tabela S10 - Desprendimento de CO <sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 35 °Brix a 30°C durante o 1° ciclo fermentativo .....	137

## 1 INTRODUÇÃO

A matriz energética de um país é um fator fundamental da respectiva economia, de forma que oscilações importantes dos preços da energia impactam directamente no desempenho econômico nacional com consequências ao nível macroeconômico. A economia do Brasil antes da década de 70, dependia inteiramente do petróleo; por isso, sofreu, como todos os outros países de matriz produtiva importante, com a primeira grande crise do petróleo em 1973. Esta derivou da dependência mundial da produção de petróleo pelos países da OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo), e da decisão destes em aumentar drasticamente o preço ao mesmo tempo em que diminuíram a produção (OLIVEIRA, 1991). O resultado desta 1ª grande crise energética/econômica sucedeu, entre outros aspectos, com o despontar de um processo inflacionário praticamente desconhecido, até aquela época, de uma vasta maioria das economias mundiais em tempo de paz, que perdurou até hoje.

Neste contexto, o Brasil desenhou e desenvolveu o projeto Proálcool (OLIVEIRA, 1991), com o objetivo de expansão da produção de etanol, aumento da renda interna, com melhoria de sua distribuição, aproveitamento das principais matérias-primas e implementação de destilarias de álcool etílico (AMORIM et al., 2011). A implantação das destilarias trouxe o desenvolvimento de um conjunto vasto de tecnologias e procedimentos industriais e agrícolas ímpares no resto do mundo. O Brasil se tornou, rapidamente, líder na produção mundial de etanol (AZEVEDO, 1997).

A participação das energias renováveis na matriz energética brasileira é de 39,4%, sendo os derivados de cana responsáveis por 15,7% deste; assim, a cana corresponde a 40% da matriz energética renovável. Por outro lado, na matriz energética mundial apenas 13,8% são provenientes de fontes renováveis (RESENHA ENERGÉTICA BRASILEIRA, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2015). A dependência dos combustíveis fósseis continua esmagadora. Os combustíveis fósseis incluem além do petróleo, o gás natural e o carvão, e são, no seu conjunto, responsáveis por 80% da produção de energia mundial. Estes combustíveis apresentam um crescimento, no consumo anual, da ordem de 2% (média dos últimos 20 anos), e de 4% nas economias emergentes (GOLDEMBERG, 2000). Este crescimento faz oscilar os preços da energia de uma forma nunca vista e com imensos impactos macroeconômicos. Assim, o desenvolvimento de uma fonte

de energia economicamente viável, que escape à volatilidade mundial dos preços da energia, e que alie a isso o fato de ser menos poluente, como é o caso do etanol, desperta um interesse muito grande em todo o mundo (UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2015). Neste sentido, as normativas européias apontam para implantação de 20% de etanol até 2020 (COMISSÃO DA COMUNIDADE EUROPÉIA - CCE, 2003).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar tendo produzido aproximadamente 28,4 bilhões de litros de álcool combustível na safra de 2014/15 e 35,5 milhões de toneladas de açúcar a partir de 654 milhões de toneladas de cana processadas, (UNICA, 2015); o estado de São Paulo é responsável por 48,5% da produção de etanol. A tendência mundial é utilizar esta fonte de energia em suas matrizes energéticas. Atualmente no Brasil, 87% dos veículos leves vendidos no país são Flex, isto é, têm motores capazes de utilizar aleatoriamente gasolina ou etanol ou mistura de ambos (UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2015).

A fermentação alcoólica por leveduras é a base da produção de bioetanol. A designação “bio” provém do duplo fator do substrato da fermentação ser vegetal e do processo fermentativo ser executado *in vivo* por microrganismos. A produção de bioetanol é baseada no consumo de açúcares provenientes da cana de açúcar no Brasil, de milho nos EUA, de beterraba e trigo na EU, e de beterraba, cana de açúcar e sorgo sacarino na Ásia (United States Agency for International Development - USAID, 2009).

O balanço energético do etanol oriundo da cana-de-açúcar é 8 para 1 (8 unidades de energia renovável produzida para cada 1 unidade de energia fóssil gasta), contra 1,34 para 1 do etanol oriundo do milho (FERES, 2010). Por seu lado, a cana de açúcar precisa ser processada imediatamente após a sua colheita, enquanto que o milho pode ser armazenado em grandes silos, o que permite a sua utilização durante todo o ano. Os processos têm assim especificidades regionais que derivam do clima e da matéria-prima utilizada como base fermentativa. Adicionam a isto, as especificidades que derivam das leveduras fermentativas em si. Uma parte do sucesso do projeto Proálcool deve-se a utilização de leveduras selecionadas responsáveis pelo alto desempenho fermentativo (produtividade e rendimento) das fermentações (BASSO et al., 2008). Durante mais de duas décadas, o processo se manteve estável no Brasil e sustentou a produção necessária para a implementação do etanol como combustível alternativo aos derivados diretos do petróleo (gasolina e

gasóleo) majoritariamente para consumo em veículos (MATSUOKA; JESUS; ARRUDA, 2009).

O aumento da procura, devido às medidas de obrigatoriedade de suplementação da gasolina com 27% de etanol e a previsão de que essa demanda aumente em um futuro próximo, devido a legislação que impõe um balanço ainda maior, fez com que aumentasse muito e se previsse um aumento ainda maior da extensão de produção de cana de açúcar no Brasil (UNICA, 2015). No entanto, a tecnologia não evoluiu, no mesmo ritmo, em aperfeiçoamento e inovação. As fermentações industriais continuam a ser realizadas basicamente da mesma maneira e com as mesmas leveduras que na década de 80 (TEIXEIRA, SALATI, 1954).

As pesquisas atuais visam melhorar a eficiência da fermentação (aprimorar o processo de conversão de biomassa em etanol combustível) e reduzir o custo de produção. O rendimento da fermentação é sensível a diversos fatores, uns estimulantes outros inibidores, como o excesso de temperatura, a ausência de vitaminas, variações no pH, falta de nutrientes minerais, entre outros (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996; WALKER, 1998). Desta forma, muitos destes fatores têm sido tentativamente trabalhados para o melhoramento do processo fermentativo. Adicionalmente, tendências dos mercados internacionais levaram a indústria sucroalcooleira brasileira a direcionar o caldo de cana para a cristalização da sacarose e produção de açúcar. O desvio da cana para a produção de açúcar gerou a necessidade de suplementar o caldo disponível com melaço para a fermentação, o que resultou num estresse adicional para a levedura, já que este faz aumentar drasticamente a tensão osmótica dos meios fermentativos (GIUDICI et al., 2005).

A verdadeira inovação consistiria em conseguir concentrar o processo mantendo a eficiência, ou seja, aumentar a concentração de açúcar nos fermentadores sem diminuir a viabilidade das leveduras e mantendo o rendimento de produção, dessa forma produzir mais etanol em menos tempo com o mesmo volume de fermentação. Uma fermentação deste tipo, com alta concentração de açúcar (*High Gravity*), e por consequência alta concentração de etanol, é uma tecnologia que pode potencializar a produtividade, o rendimento e a capacidade implantada das destilarias sem necessidade de grandes investimentos ou alterações processuais (BASSO et al., 2008). Este processo tem também vantagens ambientais (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011): permite reduzir o consumo de água e a produção de



vinhaça, e, devido à pressão osmótica, fermentações mais limpas com um grau de contaminação bacteriana menor e menor necessidade de utilização de antibióticos ou lavagens ácidas (LAOPAIBOON et al., 2009). A maior limitação da aplicação imediata desta tecnologia são as leveduras industriais disponíveis que perdem capacidade fermentativa e viabilidade em altas concentrações de açúcar. Atualmente, as fermentações ocorrem com mosto contendo de 18% a 25% de açúcar e o etanol produzido acumula em média de 11 a 12% (BASSO et al., 2008; BASSO; PAULILLO, 2003; PIDDOCKE et al., 2009; SOUZA-DIAS et al., 2015).

Outra variável relevante no processo produtivo brasileiro são os reciclos, isto é, a utilização em cada ciclo fermentativo sequencial da biomassa do ciclo anterior como inóculo. Este processo repete-se por muitas vezes, portanto as leveduras são utilizadas durante diversos ciclos fermentativos intercalados por uma lavagem ácida (pH 2) para desinfecção bacteriana. Todos estes fatores provocam redução de viabilidade celular e da taxa de propagação e, por consequência, redução do rendimento fermentativo (BASSO; PAULILLO, 2003).

Devido ao impacto desta fonte energética no país. Existe uma necessidade de compreender todo o processo e tentar torna-lo mais eficiente e rentável do ponto de vista energético/produtivo. A tecnologia de VHG (very high gravity) pode ser um caminho para tal melhoria; além da necessidade de entender o processo é primordial entender o comportamento das leveduras face às condições impostas.

Neste contexto, a presente tese visa estudar melhorias no processo fermentativo, mediante processos simples que permitem obter rendimento de fermentações de elevado teor alcoólico. Para este fim foram utilizadas as leveduras industriais comumente empregadas na indústria brasileira, PE-2 e CAT-1, e mostos contendo caldo de cana concentrado a 25, 30 ou 35°Brix, suplementados com ureia ou fosfato de amônio como fonte nitrogenada.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características gerais de leveduras

As leveduras são fungos ascomicetos ou basidiomicetos, unicelulares, não filamentosos, com formatos esféricos ou elípticos, podendo algumas formar hifas e outras pseudo-hifas. O tamanho de uma célula de levedura varia de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de largura e de 5 a 30  $\mu\text{m}$  de comprimento. As leveduras, sendo organismos eucariontes, possuem organização nuclear, além de apresentar parede externa constituída por polissacarídeos e proteínas (PELCZAR Jr; CHAN; KRIEG, 1997).

A levedura é um organismo que possui um metabolismo anaeróbico facultativo, ou seja, vive e se multiplica na presença e na ausência de oxigênio. As leveduras são organismos que crescem em ambientes de pH neutro ou ligeiramente ácido (PELCZAR Jr; CHAN; KRIEG, 1997). Alguns elementos são necessários para o seu crescimento e reprodução, tais como: água, fontes de carbono (açúcares, sais de ácidos orgânicos, ou mesmo etanol), nitrogênio, oxigênio e minerais (GUIMARÃES, 2005). As leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para obter a energia necessária para o seu metabolismo e para a sua multiplicação, sendo os hidratos de carbono os nutrientes de maior importância. Os açúcares simples como glicose, frutose e manose, são os hidratos de carbono mais assimilados pela grande maioria dos organismos; enquanto alguns hidratos de carbono como os oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados somente por algumas espécies (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011).

O termo leveduras se refere a um grupo de microrganismos, cujo principal, mais conhecido e estudado é a *Saccharomyces cerevisiae*; embora, este grupo seja bastante amplo e diversificado, muitas vezes, a palavra levedura é utilizada como sinônimo para *S. cerevisiae* (PRONK; STEENSMA; VAN DIJKEN, 1996)

As leveduras, tal como as bactérias, são microrganismos amplamente presentes na natureza; além disso, as leveduras são os microrganismos mais utilizados em processos de produção industrial que dependem de fermentações. A razão é que as espécies de levedura utilizadas não são potencialmente patogênicas, pelo menos para os indivíduos que não tem o sistema imunológico comprometido (BELO et al., 2009). Deste modo, *S. cerevisiae* e outras espécies de leveduras industriais são classificadas como GRAS – *Generally Recognized As Safe*

(PELCZAR Jr; CHAN; KRIEG, 1997; ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006), não requerendo cuidados especiais de proteção para os manipuladores.

No caso específico da produção de etanol, vários microrganismos foram avaliados (LAU et al., 2010). No entanto, industrialmente, a levedura *S. cerevisiae* permanece como a mais utilizada, devido ao fato desta ser bastante tolerante ao etanol, ao stress osmótico, ácido, e temperaturas moderadamente elevadas. Estas características são desejáveis para processos eficientes de produção de etanol (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

*S. cerevisiae* possui duas formas de reprodução, por gemulação (mitose) e por esporulação (envolvendo meiose e formação de esporos haploides) (ESPOSITO; KLAPHOLZ, 1981) (Figura 1).

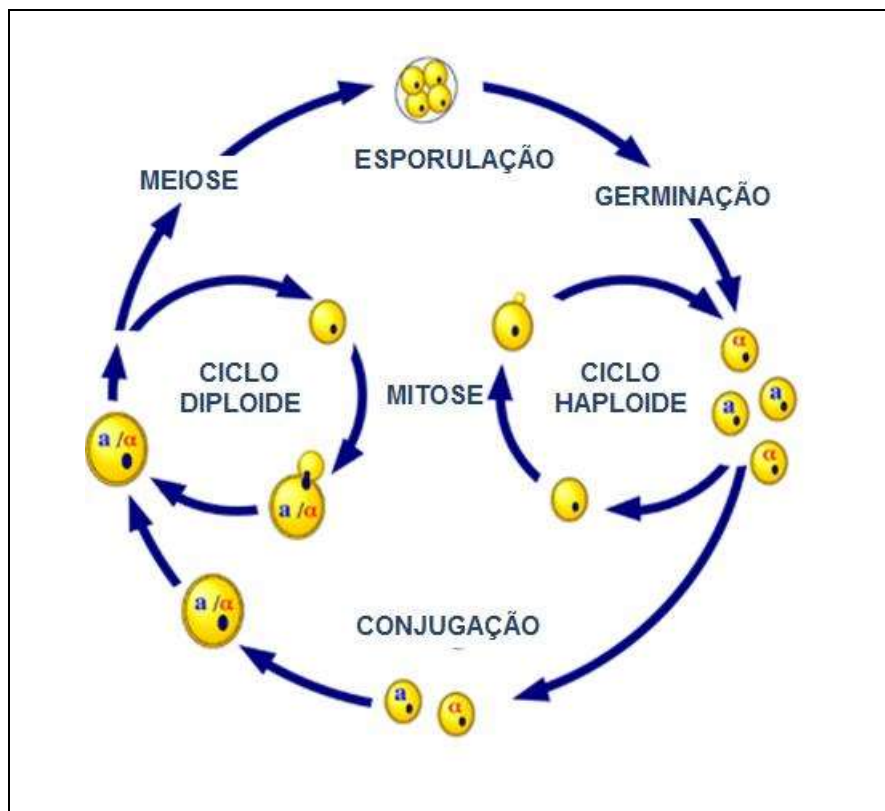


Figura - 1 Esquema representando os ciclos de vida haploide e diploide de *S. cerevisiae*

Fonte: Lucas C., acervo pessoal

No processo por esporulação, os esporos, uma vez liberados do asco, podem germinar, ou seja, multiplicar-se por mitose, mantendo-se em haploidia. Alternativamente, os esporos podem se conjugar formando uma nova célula diploide que pode se multiplicar novamente por mitoses sucessivas e criar uma linhagem diploide estável. *S. cerevisiae* é uma levedura que pode ser homo ou heterotática, ou

seja, os esporos de cada tétrade são iguais dois a dois, sendo denominados *alfa* e dois *a* – conhecidos por *mating types*. Os esporos só conjugam heterotalicamente, um *alfa* com um *a*. Deste modo, qualquer linhagem haploide pode se manter em haploidia estável desde que não entre em contato com outra linhagem. Nas leveduras homotáticas, as células haploides podem se conjugar sem restrições entre si, a haplofase é sempre instável e transitória (PHAFF; MILLER; MRAK, 1978). A esporulação de *S. cerevisiae* acontece em reação à privação de nutrientes, quer da fonte de carbono quer de nitrogênio, ou desidratação extrema (NEIMAN, 2005).

Durante os processos fermentativos a levedura se reproduz por gemulação independentemente do seu estado de ploidia. A gemulação é um processo totalmente mitótico, com a peculiaridade de existir uma grande assimetria da distribuição das fibras do fuso acromático, e a célula “filha” nasce muito menor que aquela onde foi iniciada a mitose – a “mãe”. A nova levedura surge assim como uma gêmula, ou pequeno broto, que se destaca da célula originária (“mãe”) ainda muito menor que esta e só aumenta de tamanho depois de independente. Cada gemulação deixa uma cicatriz na parede celular da célula “mãe” a partir da qual é possível saber o número de gemulações sofridas por cada célula. Uma levedura pode produzir mais de 24 células “filhas” ao longo da vida (STEFFEN; KENNEDY; KAEBERLEIN, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2011). O número de cicatrizes está associado com o processo de envelhecimento celular, já que a capacidade de formar novas gêmulas vai diminuindo com a idade da célula, sendo conhecido como envelhecimento replicativo (STEINKRAUS; KAEBERLEIN; KENNEDY, 2008).

A capacidade de manutenção por gemulação, idêntica em leveduras haploides ou diploides, é uma grande vantagem a nível laboratorial, já que permite produzir híbridos estáveis a partir de *mating types* geneticamente distintos. A diversidade de fenótipos que se observa em *S. cerevisiae* isoladas da natureza (WALKER, 1998) tem, possivelmente, na sua origem, processos biológicos de fusão celular do mesmo tipo. A seleção natural permitiu que muitos destes híbridos espontâneos acabassem por estabilizar formando novas estirpes ou variedades.

## 2.2 Metabolismo do carbono em *S. cerevisiae*

O metabolismo das leveduras como o de qualquer organismo, depende de nutrientes básicos como água, nitrogênio, oxigênio, alguns minerais e vitaminas e, acima de tudo, uma fonte de carbono, que permitem alimentação, crescimento e reprodução.

A fonte de carbono primordial para *S. cerevisiae* é a glicose, que é assimilada pela célula através de um ou vários dos transportadores da família HXT (PALMA et al., 2012), fosfatada a glucose 6-fosfato e segue para a cadeia de reações enzimáticas, a via glicolítica, até a formação de piruvato.

### 2.2.1 Via glicolítica

A glicólise ou via glicolítica é a principal via para a conversão da glicose (composto de 6 átomos de carbono) em 2 moléculas de piruvato (3 carbonos). Isto ocorre em 10 reações consecutivas, para produção de energia na forma de ATP, que está ligada a formação de intermediários que reduzem energeticamente a forma de NADH para vias biossintéticas (CAMPOS, 1998; SANTANGELO, 2006).

O primeiro passo consiste na fosforilação no carbono 6 da glicose, formando glucose-6-fosfato (G-6P), em uma reação irreversível e catalisada pela enzima hexoquinase (Figura 2); o grupo fosfato é proveniente de uma molécula de ATP. Posteriormente a fosforilação, ocorre uma isomerização da G-6P a frutose-6-fosfato (F-6P), numa reação reversível e catalisada pela enzima fosfoglicoisomerase. A seguir, a F-6P é fosforilada no carbono 1 por uma fosfofrutoquinase formando a frutose-1,6-difosfato (F-1,6 P) (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006)

A partir da etapa seguinte, as reações ocorrerão sempre em dobro, porque a molécula de frutose-1,6-difosfato será decomposta em duas trioses uma aldose e uma cetose, a gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxiacetona fosfato. Apenas a aldose pode ser degradada de forma direta nas etapas seguintes da glicólise. Já a dihidroxiacetona fosfato, pode ser convertida pela triose fosfato isomerase em gliceraldeído-3-fosfato para assim entrar nas etapas subsequentes da glicólise. Porém, quando não convertida, esta pode entrar como intermediário da síntese do glicerol, sendo necessário para a oxidação do NADH a  $\text{NAD}^+$  e para a formação do glicerol-3-fosfato. A dihidroxiacetona fosfato também é um intermediário para produção de fosfolípidos.

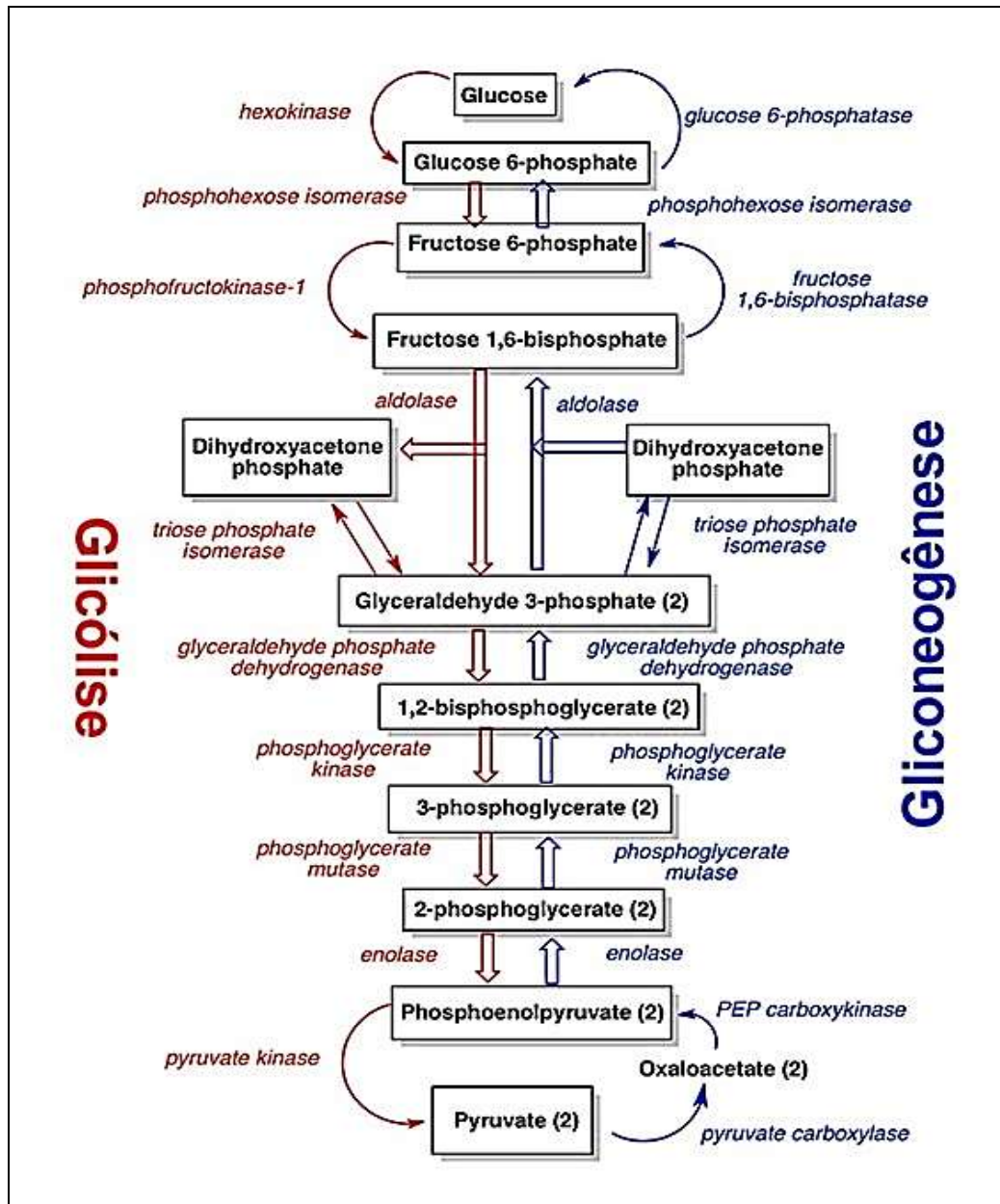


Figura 2 - Vias glicolítica e gluconeogénica de *S. cerevisiae*  
 Fonte: www.biochemden.com

A fase de síntese de ATP, propriamente dita, inicia-se com a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-fosfoglicerato, catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Nesta reação, o grupo aldeído é desidrogenado a um anidrido de ácido carboxílico; o  $\text{NAD}^+$  é o receptor de elétrons e a redução deste ocorre pela transferência enzimática de um hidrogênio do grupo aldeído para formar o NADH. A enzima fosfogliceratoquinase transfere o grupo fosfato 1,3-difosfatoglicerato, para o ADP originando ATP e 3-fosfoglicerato. Este é convertido a 2-fosfoglicerato pela fosfogliceratomutase em que o grupo fosfato é transferido do C-3 para o C-2 do glicerato. Após esta mudança de posição do grupo fosfato, ocorre

uma desidratação, catalisada pela enolase, em que uma molécula de água é removida do 2-fosfoglicerato para liberar o fosfoenolpiruvato. Finalmente, um grupo fosfato é transferido do fosfoenolpiruvato para o ADP, sob a ação da enzima piruvato quinase, originando 1 ATP e uma molécula de ácido pirúvico ou piruvato (NELSON; COX, 2000).

As vias metabólicas, em *S. cerevisiae*, originadas do piruvato, são as reações que conduzem ao ciclo do ácido cítrico (TCA), à fermentação ou a formação do oxaloacetato (PRONK; STEENSMA; VAN DIJKEN, 1996).

### 2.2.2 Respiração

Quando o O<sub>2</sub> é abundante, *S. cerevisiae* canaliza a maior parte do piruvato para a formação de acetyl-CoA pelo complexo multienzimático da piruvato desidrogenase. Esta reação liga o metabolismo da glicose ao ciclo do ácido cítrico (TCA) e subsequentemente, à fosforilação oxidativa mitocondrial.

O ciclo do ácido cítrico (TCA) é considerado uma via anfibólica, uma vez que combina as funções catabólicas e anabólicas. Alguns dos compostos deste resultam na produção de intermediários da síntese dos aminoácidos e nucleotídeos (CAMPOS, 1998).

O reabastecimento dos compostos no TCA, como o oxaloacetato e o  $\alpha$ -cetoglutarato, ocorrem por: (i) fixação do CO<sub>2</sub> a piruvato pela ação das enzimas piruvato carboxilase (dependente de ATP); PYC1p ou PYC2p, respetivamente, e a fosfoenol piruvato carboxilase (PCK1p), e (ii) ciclo do glioxalato, relevante quando as leveduras crescem em duas fontes de carbono, como acetato e etanol (CAMPOS, 1998).

No processo total, a Acetil-CoA é oxidada a CO<sub>2</sub>, NADH e FADH<sub>2</sub>, gerando um potencial eletroquímico associado à matriz mitocondrial, que alimenta a ATP sintetase. A respiração leva essencialmente à produção de biomassa em vez de etanol, ou seja, alimenta a multiplicação celular (CONRAD et al., 2014).

Durante a respiração são produzidas 34 moléculas de ATP, ao contrário da fermentação que produz apenas duas moléculas de ATP (NELSON; COX, 2000).

### 2.2.3 Fermentação

Em condições de anaerobiose ou baixas concentrações de O<sub>2</sub>, o piruvato é fermentado, isto é, reduzido a etanol e CO<sub>2</sub>. Como sub-produto de fermentação é produzido glicerol (através de uma bifurcação metabólica ao nível do gliceraldeído 3-

fosfato – Figura 3A). As reações enzimáticas associadas à produção de glicerol permitem à célula compensar a produção de equivalentes reduzidos anexas às reações de produção de etanol, regulando, simultaneamente, o potencial redox mitocondrial através do glicerol 3-fosfato *shuttle* (Figura 3B) e alimentando as vias de síntese de lipídeos. Além disso, o glicerol desempenha múltiplos papéis intracelulares, entre os quais o de osmolito, sendo acumulado intracelularmente em situações de estress osmótico (HOHMANN, 2002).

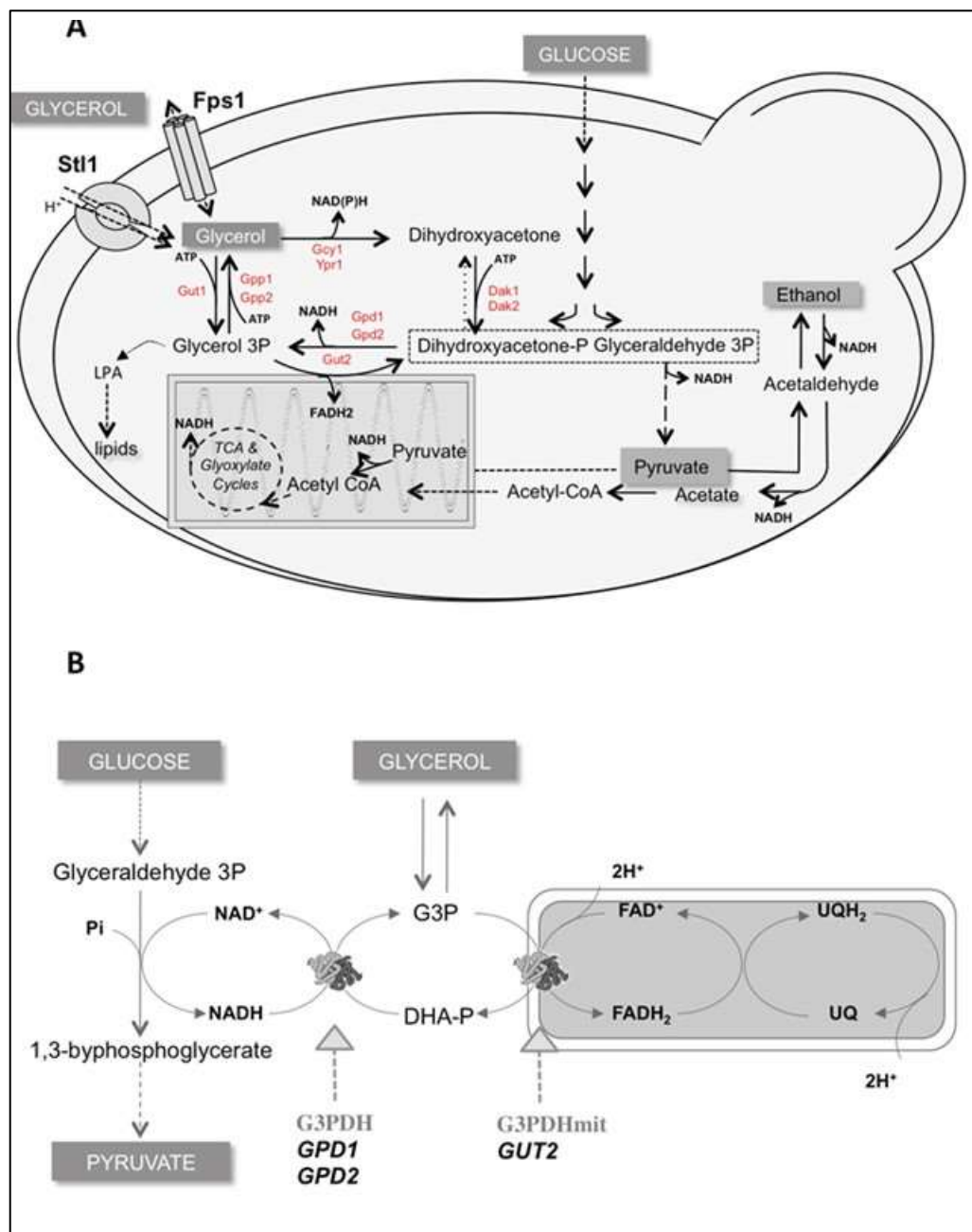


Figura 3 - (A) Principais vias metabólicas de *S. cerevisiae* em que o glicerol está envolvido. (B) Glicerol 3P redox *shuttle*

Fonte: Imagens cedidas por C. Lucas



### 2.2.4 Regulação das opções metabólicas

Além da disponibilidade do  $O_2$ , deve ser considerado o importante papel da glicose na regulação das opções metabólicas. A presença de glicose, acima de 0,3%, tem efeito repressor sobre os genes que codificam as enzimas que permitem a utilização de fontes de carbono alternativas, bem como a própria produção de glicose pela via gluconeogênica (Figura 2) (THEVELEIN, BEULLENS, 1985). Este fenômeno, denominado de repressão catabólica ou repressão pela glicose, está bem elucidado e ocorre quando valores de glicose estão acima do valor crítico, onde é reprimida a expressão dos genes que codificam as enzimas do TCA, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais (SCHURE et al., 1998).

Quando a concentração de glicose é inferior a 0,3%, a repressão catabólica deixa de ocorrer e observa-se uma substituição massiva do contingente de enzimas (umas inativadas e conduzidas para desmantelamento no lisossoma, outras produzidas *de novo*). Esta substituição permite que a célula seja capaz de internalizar e consumir fontes de carbono alternativas à glucose, e, isto culmina na síntese de glicose 6-fosfato mediante a ação de enzimas gluconeogênicas que invertem o fluxo glicolítico (Figura 2). Nesta circunstância, a fermentação é totalmente substituída por respiração. Esta transição é conhecida por transição diáuxica porque numa cultura em sistema *batch* ela ocorre naturalmente quando a glicose atinge valores muito baixos e, a seguir, a ela segue para uma 2ª fase de crescimento, geralmente curta em que a célula consome o etanol e o glicerol produzidos durante a 1ª fase de crescimento (crescimento diáuxico) (HAGMAN. PISKUR, 2015).

#### *Efeito Pasteur*

A levedura *S. cerevisiae* cresce tanto na presença como na ausência de  $O_2$ , ou seja, é um microrganismo anaeróbico facultativo. Em níveis muito baixos de  $O_2$ , os açúcares são fermentados enquanto que na presença abundante de  $O_2$  a *S. cerevisiae* fermenta e respira simultaneamente (FEREA et al., 1999). A fermentação e a respiração são majoritariamente regulados por fatores ambientais, principalmente pela disponibilidade de glicose e oxigênio. O efeito Pasteur, pode ser definido como a supressão da fermentação pelo oxigênio. Este efeito só é observado quando a concentração de glicose é baixa ou em outras condições limitadas de nutrientes. O efeito Pasteur é observado apenas em condições experimentais

particulares, por exemplo, fermentações controladas quando uma concentração muito baixa de açúcar limita a taxa de crescimento (ROGERS. STEWART, 1974) e em *S. cerevisiae* em repouso, quando o açúcar é utilizado na ausência de uma fonte de nitrogênio (NILSSON, 2001).

De acordo com Lagunas (1979), a fermentação é o caminho principal do catabolismo do açúcar quando a *S. cerevisiae* é inoculada em meios sintéticos com três tipos de açúcares. Resultados similares foram obtidos em meio complexo. A contribuição da respiração ao catabolismo observado é uma consequência do efeito de repressão das enzimas respiratórias por açúcares (DIAZ-RUIZ. RILGOULET. DEVIN, 2011).

Células de *S. cerevisiae* mostraram alterações importantes no catabolismo dos açúcares após o esgotamento de uma fonte nitrogenada, o que explica o porquê do efeito Pasteur ser observado em células em repouso, enquanto ele não é observado em células em crescimento. A falta de amônio, aparentemente, produz uma diminuição rápida na taxa de fermentação de 50% do seu nível original, possivelmente, como uma consequência do efeito de amônio sobre a atividade de fosfofrutoquinase (LAGUNAS et al., 1982). Além disso, ocorre uma inativação progressiva dos sistemas de transporte de açúcar, o que reduz a taxa de glicólise, para menos de 10% do nível observado em células em crescimento. A consequente diminuição na concentração de piruvato afetou principalmente a taxa de fermentação, que quase desapareceu, enquanto a respiração permaneceu constante. Isto é, provavelmente, devido a vantagem da piruvato desidrogenase sobre a piruvato descarboxilase numa competição por piruvato (PRONK. STEENSMA. VAN DIJKEN, 1996). Como consequência destas alterações, a contribuição da respiração para o catabolismo, que era pequeno em células em crescimento, torna muito importante durante a privação de amônio (LAGUNAS et al., 1982). Em células em repouso a ausência de oxigênio pode prevenir a formação da grande proporção de ATP formado na respiração, como consequência vários mecanismos regulatórios seriam ligados produzindo um aumento observado na taxa da glicólise (MATOBA, 2006).

#### *Efeito Crabtree*

O efeito Crabtree define-se como a capacidade de uma levedura produzir etanol mesmo em condições de aerobiose (que tendencialmente poderia potenciar a

respiração em detrimento da fermentação), e na presença de grandes quantidades e glicose (que poderiam exercer repressão catabólica sobre as correspondentes enzimas para favorecer a produção e biomassa em detrimento da produção de etanol). Assim, em leveduras Crabtree positivas como *S. cerevisiae* (Figura 4), independentemente da disponibilidade de oxigênio, a fermentação é a forma principal do catabolismo do açúcar. Para explicar isto, o NADH gerado durante a glicólise é majoritariamente oxidado pela produção de etanol em vez de o ser pela respiração. A glicólise reprime a produção de enzimas da respiração ou inativa-as, influenciando negativamente nos transportadores de açúcar. Este fenômeno é um exemplo de repressão catabólica (WALKER, 1998).

A fermentação será responsável pelo maior consumo de glicose, em culturas de batelada. Quando os níveis de glucose diminuem, as células vão, gradualmente, se desreprimindo, o que resulta numa indução da síntese das enzimas respiratórias. Isto resulta em um consumo acumulado de etanol, quando as células entram na segunda fase de crescimento, conhecido como diauxia. Como consequência, muitas enzimas são desreprimidas para usar um substrato alternativo (por exemplo, o etanol). O crescimento diauxico, neste caso, é uma reação de oxidação incompleta, e subsequentemente oxidação e utilização do etanol. A repressão da glucose também está envolvida no controle do consumo de açúcar e outras enzimas relacionadas com o metabolismo do açúcar, que pode ser descrito como uma parte do sistema regulatório global. Por outro lado, a inativação catabólica é mais rápida que a repressão e pensa-se que é devida à desativação pela glucose de um limitado número de enzimas chave, como a frutose 1-6-bifosfatase. A inativação ocorre primeiramente pela fosforilação da enzima seguido por uma degradação vacuolar lenta da enzima (WALKER, 1998).

O efeito Crabtree, apesar de muito estudado, ainda não tem o seu mecanismo totalmente elucidado. Comparando as diferenças fisiológicas e as transcricionais de três cepas de *S. cerevisiae* que cresceram em galactose e glicose, foram encontradas diferenças quando as cepas foram colocadas para crescer em batelada no meio com galactose (MARTINEZ et al., 2014). As leveduras apresentaram uma leve incidência do efeito Crabtree e um fenótipo misto de respiratório e fermentativo, enquanto as mesmas cepas quando colocadas em situação semelhante, com a glucose como fonte de carbono, apresentaram um comportamento muito mais fermentativo e uma taxa de crescimento maior. O Gcn4 (General Control Non-

derepressible) é um activador de transcrição que é induzido no esfoameamento de aminoácidos. As linhagens com a deleção do *GCN4* mostraram um crescimento muito maior que as estirpes referência (MARTINEZ et al., 2014).

A repressão da respiração pela glicose e pela sacarose pode parecer contraprodutivo, porém, apesar da respiração ser um processo mais eficiente do ponto de vista de geração de energia, a fermentação oferece a vantagem da produção de etanol, que dificulta o crescimento de outros organismos. Além de que concentrações de glicose, e, possivelmente, intermediários glicolíticos, regulam a expressão de vários transportadores e alguns genes glicolíticos. Assim, a rota principal da repressão assegura que os açúcares sejam metabolizados antes do consumo de carboidratos alternativos, como a maltose e a galactose (MENESES. HENSCHKE. JIRANEK, 2002). A glicose também diminui o consumo da frutose porque ambos os açúcares são captados pelo mesmo transportador, que têm uma maior afinidade pela glicose do que pela frutose (BERTHELIS et al., 2004. GONÇALVES et al., 2000. SOUSA et al., 2004).

Em grande parte das aplicações industriais, a concentração inicial de glicose e/ou de sacarose no meio de crescimento, está muito acima das concentrações limite para induzir o mecanismo de repressão pela glicose (20-40 mM) que deveria ser activado nestas condições. Este é um dos efeitos adversos no desempenho da levedura mais conhecidos em fermentações industriais (WHEALS et al., 1999), que na grande maioria são feitos numa mistura complexa de diferentes açúcares fermentescíveis (YOON. MUKERJEA. ROBYT, 2003). Outro ponto importante é que a repressão catabólica pela glicose e sacarose também ativa a rota Ras/cAMP/PKA, que leva a um decréscimo da resistência ao stress por parte das leveduras (ATTFIELD 1997. BAUER. PRETORIUS, 2000. PEDRUZZI et al., 2003).

### **2.3 Metabolismo do nitrogênio em leveduras**

O acúmulo de alguns metabolitos ao longo da fermentação e as deficiências nutricionais do mosto são considerados as razões principais para fermentações vagorosas e lentas. Um dos compostos que facilmente se torna limitante numa dessas circunstâncias é o nitrogênio. A presença de nitrogênio assimilável no mosto varia conforme a matéria prima fornecida, e esta característica influencia totalmente o desempenho fermentativo (PALMA et al., 2012). Desse modo, a produção de

etanol pode ser melhorada pela suplementação com uma fonte nitrogenada (JERONIMO et al., 2008. O'CONNOR-COX et al., 1991. THOMAS. INGLEDEW 1990). Tem sido proposto que a maior limitação nas fermentações em carência de nitrogênio é a inativação dos transportadores ativos de sacarose (BADOTTI et al., 2008), associados ao impedimento da síntese proteica (BELY. SALMON. BARRE, 1994. MAURICIO. SALMON, 1992. SALMON, 1989. SALMON et al., 1993).

O nitrogênio é um composto essencial e pode ser proveniente de diferentes fontes. De um modo geral, as células possuem permeases específicas para transportar as fontes de nitrogênio para o interior da célula, onde posteriormente vão ser metabolizadas para a produção de amônio (MAGASANIK. KAISER, 2002). A regulação do metabolismo da levedura pelo nitrogênio (repressão catabólica por nitrogênio) é um mecanismo que permite à célula reduzir, ou não sintetizar, enzimas e permeases para a utilização de fontes de compostos não preferenciais, quando outra fonte de nitrogênio está disponível (MAGASANIK, 1992).

As fontes preferenciais de nitrogênio para a levedura *S. cerevisiae* são a glutamina e a asparagina, bem como, genericamente, aminoácidos e peptídeos. Entre as fontes de nitrogênio não preferenciais encontra-se a prolina e a ureia (MAGASANIK, 1992). Os critérios utilizados para a escolha da fonte nitrogenada, em fermentações e outros processos industriais, são a taxa de crescimento que a fonte nitrogenada pode suportar e a forma de repressão que a(s) fonte(s) correspondente(s) exerce(m) no metabolismo (MAGASANIK. KAISER, 2002). A glutamina, como fonte preferencial, suporta uma taxa de crescimento superior às demais, que são muito inferiores. Por esta razão, geralmente, escolhe-se uma fonte nitrogenada que não reprima o metabolismo de outras formas de assimilação (MAGASANIK. KAISER, 2002). Além do próprio metabolismo de nitrogênio, a regulação metabólica a ele associada se estende ao consumo da fonte de carbono, já que quando o nitrogênio se torna o fator limitante, o consumo de glicose diminui (TOMAS-COBOS. VIANA. SANZ, 2005. SCHMELZLE et al., 2004).

### **2.3.1 O metabolismo associado à assimilação de nitrogênio**

A principal via de assimilação do nitrogênio é a via da glutamina, embora todas as vias de assimilação de fontes de nitrogênio, não preferenciais, em algum momento, se cruzam com o metabolismo principal da formação de glutamato e de glutamina (MAGASANIK. KAISER, 2002). O grupo amina do ácido glutâmico

corresponde a aproximadamente 85% da fonte de nitrogênio, e o grupo amida da glutamina é responsável por 15% (Figura 5). Estas reações permitem a síntese de glutamato a partir de  $\alpha$ -cetogluturato e de amônia, e a síntese de glutamina a partir de glutamato e de amônia. Para que estes compostos se formem são necessários alguns conjuntos de enzimas. estas reações principais também permitem que a glutamina seja a única fonte de nitrogênio, pois esta pode ser convertida a glutamato. O mesmo pode ocorrer com o glutamato que pode ser convertido em glutamina (COOPER et al., 1992). Quando a levedura tem uma fonte de amônia abundante, seja pela conversão de uma fonte de amônia não preferencial, ou por amônia propriamente dita, a glutamato-desidrogenase Gdh1 NADP<sup>+</sup>-dependente é responsável pela síntese de  $\alpha$ -cetogluturato, intermediário do ciclo do ácido cítrico que gera glutamato (Figura 7) (GRENSON et al., 1974). Como comentado anteriormente, o glutamato pode se combinar com a amônia para formar glutamina (Figura 7), reação catalisada pela glutamina sintetase Gln1 (MITCHELL. MAGASANIK, 1983). Por seu lado, a entrada de amônia na célula é realizada via três permeases codificadas pelos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3*. A alta afinidade das permeases Mep1 e Mep2 parece desempenhar um papel importante na retenção da amônia gerada pela degradação da arginina e da ureia (MARINI et al., 1997).

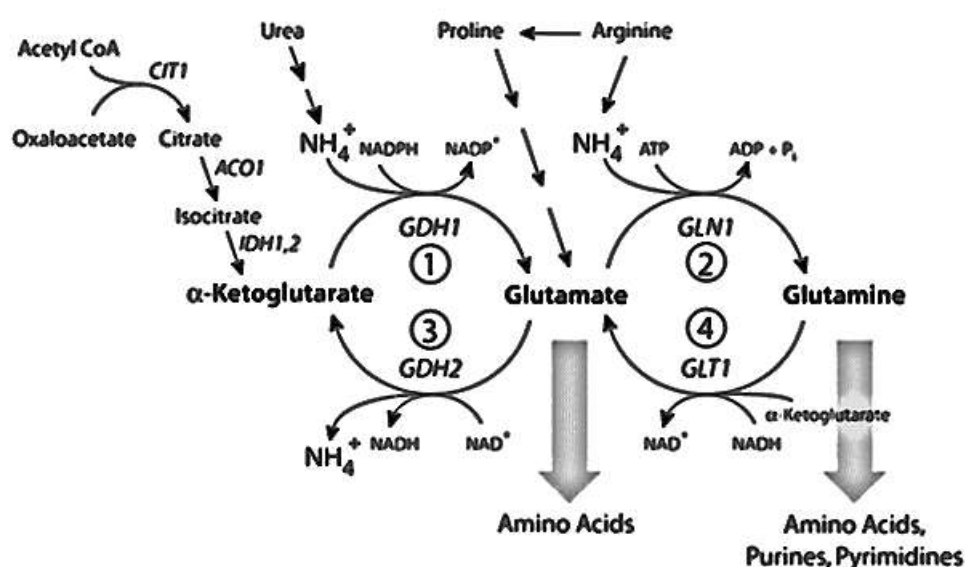


Figura 4 - Vias associadas ao metabolismo da glutamina e do glutamato  
Fonte: MAGASANIK; KAISER, 2002

Quando o glutamato é a única fonte de nitrogênio, o  $\text{NAD}^+$  associado à glutamato-desidrogenase Gdh2, é responsável pelo desprendimento do grupo amônia para a síntese da glutamina a partir do glutamato (MITCHELL. MAGASANIK, 1984). A glutamina sintetase é a única forma de sintetizar glutamina. As células sem esta enzima necessitam de uma suplementação em glutamina para crescer. Por outro lado, a perda do gene *GDH1* apenas reduz para metade a taxa de crescimento em amônio. A capacidade de mutantes *gdh1* $\Delta$  crescerem em amônio é devida à existência da glutamato sintetase Glt1, que cataboliza a reação entre o  $\alpha$ -cetoglutarato, a glutamina e o NADH para originar duas moléculas de glutamato e um  $\text{NAD}^+$  (COGONI et al., 1995).

As reações conduzidas pelas enzimas codificadas pelos genes *GLN1* e *GLT1* são responsáveis pela síntese do glutamato proveniente do  $\alpha$ -cetoglutarato e do amônio. A Gdh2 é responsável por disponibilizar a amônia necessária para a síntese da glutamina proveniente do glutamato, isto acontece quando o glutamato é a única fonte de nitrogênio do meio. A reação de glutamato com  $\text{NAD}^+$  origina  $\text{NH}_4^+$ , NADH, um hidrogênio e uma molécula de  $\alpha$ -cetoglutarato, esta reação é mediada pela proteína Gdh2. Não é necessário que as leveduras cresçam em meios contendo amônia como a fonte de nitrogênio, mas é essencial para a síntese da glutamina quando a fonte nitrogenada do meio é glutamato ou compostos nitrogenados que sejam precursores do glutamato (MILLER. MAGASANIK, 1990. LJUNGDAHL. DAIGNAN-FORNIER, 2012). As proteínas Gdh1 e Gdh2 catalisam as últimas reações de conversão das fontes não preferenciais do glutamato a glutamina, que por sua vez fornecem o nitrogênio para a célula. Consequentemente, é necessário um aumento da atividade/quantidade destas enzimas para compensar as baixas concentrações celulares dos respectivos substratos nas células que crescem em meios com fontes não preferenciais de nitrogênio (MILLER. MAGASANIK, 1990). Além disso, a Gdh2 regula a expressão da glutamina desidrogenase, e a Gln1 regula a expressão da glutamina sintetase (COGONI et al., 1995).

Em alguns casos, as enzimas responsáveis pela utilização destas fontes são induzidas por algumas fontes de nitrogênio presentes no meio. Por exemplo, a expressão de alguns genes que codificam as enzimas necessárias para a utilização da arginina ou de prolina são induzidas pela presença destas duas fontes presentes no meio. A forte ativação da arginina depende dos ativadores Arg80p e Arg81p, enquanto que a ativação da prolina depende do Put3p (WIAME. GRENSON. ARST

Jr, 1985). Embora os genes que codificam as enzimas necessárias para a utilização destes compostos nitrogenados possam ser ativados independentemente de Gln3p e Nil1p, estes fatores de transcrição têm um efeito no grau de expressão destas enzimas devido à exclusão do indutor (STANBROUGH. MAGASANIK, 1995).

Glutamina, asparagina, e amônio são boas fontes de nitrogênio, suportando ótimo crescimento de leveduras (WIAME. GRENSON. ARST Jr, 1985). A adição de  $\text{NH}_4^+$  nos meios de cultivo de leveduras menos favorável desencadeia a repressão catabólica por nitrogênio de várias enzimas e permeases responsáveis pela utilização de fontes secundárias de nitrogênio (WIAME. GRENSON. ARST Jr, 1985). A glutamina, a asparagina, e a bactopectona estimulam a regulação pelo nitrogênio. A glutamina e a asparagina são eficientemente transportadas para a célula pelas permeases Gnp1 e Agp1 (SCHREVE. SIN. GARRETT, 1998). A glutamina, uma vez dentro da célula, pode ser convertida a glutamato pela glutamato sintetase, por glutaminases ou por glutamino transaminases (COGONI et al., 1995). Uma asparaginase intracelular é responsável pela hidrólise da asparagina a uma mistura de amônio e aspartato, uma excelente fonte de glutamato (SINCLAIR. WARNER. BONTHRON, 1994). A combinação de glutamato e amônio fornece uma ótima fonte de glutamina, como demonstrado pela mistura de glutamato e amônio que levaram ao bloqueio da transcrição do Gap1 de forma tão eficiente quanto a glutamina (STANBROUGH. MAGASANIK, 1995). Finalmente, a proteína hidrolisada na bactopectona serve como uma excelente fonte tanto de glutamina como de glutamato.

O sinal citoplasmático gerado pela presença de uma fonte preferencial de nitrogênio no meio é mediado pela Gln3p, um ativador da transcrição de genes sob repressão pelo nitrogênio, e da Ure2p, uma glutatona peroxidase que atua como um regulador da transcrição de genes sob repressão pelo nitrogênio (revisto em WINDERICKX et al., 2003). Em concordância, a deleção de *URE2* tem efeito na completa expressão dos genes sujeitos à ativação do Gln3p no meio contendo uma fonte preferida de nitrogênio (COURCHESNE. MAGASANIK, 1988). Os grupos amino do glutamato e amida da glutamina podem ser usados para biossíntese na ausência de outras fontes de nitrogênio. Aparentemente a presença de uma fonte preferencial de nitrogênio no meio leva a um aumento da concentração intracelular de glutamina. O nível da glutamato desidrogenase  $\text{NAD}^+$ -dependente Gdh2, é mais alto em mutantes *ure2* $\Delta$  independentemente da fonte de nitrogênio no meio de



crescimento: seis vezes maior que em células *wild type* crescidas em meio com glutamato como fonte de nitrogênio, e cem vezes mais elevado que em células *wild type* crescidas em meio com amônia ou glutamina como fonte de nitrogênio (COURCHESNE. MAGASANIK 1988).

Várias vias metabólicas levam à síntese de glutamato e da glutamina, sendo mediadas por (i) isoformas de glutamato desidrogenase, as Gdh1 e Gdh3, que convertem o glutamato em  $\alpha$ -cetoglutarato e amônia. (ii) pela atividade conjunta das glutamina e glutamato sintetases Gln1 e Glt1, e ainda (iii) pela Gdh2 acima mencionada. Tanto a glutamato desidrogenase (Gdh2) como a glutamina sintetase (Gln1) usam o glutamato como substrato. A amônia gerada pelas Gdh1 e Gdh3 é utilizada pela glutamina sintetase (Gln1) para formar glutamina a partir do glutamato. A glutamina é usada para a síntese de aminoácidos e nucleotídeos, assim como, para síntese de proteínas.

As concentrações de amônia, glutamato e glutamina orquestram esta via. A glutamina sintetase pode ser inativada pela presença de glutamina, mas mais importante, os seus níveis são sensíveis à regulação pela Gln3, que também controla níveis de expressão da glutamato desidrogenase Gdh2. Por outro lado, a proteína Ure2 bloqueia esta ativação em resposta a glutamina e bloqueia a transcrição do gene *GDH2* (COSCHIGANO. MAGASANIK, 1991). Além das proteínas Gln3 e Ure2, a Gat1 é outro ativador transcricional cuja atividade e localização depende da regulação pela Ure2 de acordo com a fonte de nitrogênio disponível (ROWEN. ESIOBU. MAGASANIK, 1997), ao contrário do GLN3, que se expressa independentemente da fonte nitrogenada.

### **2.3.2 Transportadores de nitrogênio e sua regulação**

Estudos genéticos e sequenciamento sistemático de genomas têm mostrado que a levedura *S. cerevisiae* possui muitos transportadores transmembranares (WIAME. GRENSON. ARST, 1985). Além disso, o mesmo substrato pode ser transportado por vários sistemas de transporte com diferentes propriedades cinéticas, regulação e especificidade. A primeira evidência da multiplicidade das permeases em leveduras vem de estudos genéticos de permeases de aminoácidos (WIAME, GRENSON. ARST, 1985). Um exemplo é o transporte de  $\gamma$ -aminobutirato (GABA), um aminoácido que serve como fonte única de nitrogênio. A entrada na célula de GABA é mediada pela permease geral de aminoácidos (Gap1), pela

permease da prolina (Put4), e por uma permease GABA específica e indutível, Uga4 (ANDRE et al., 1993. GRENSON et al., 1987). Os transportadores de aminoácidos conhecidos incluem além destas permeases, a Can1, permease de arginina, a Dal4, permease de alantoína e Dal5, permease de alantoato e ureidosuccinato. No seu conjunto, *S. cerevisiae* codifica 24 genes de transportadores de poliaminas (superfamília de transportadores APC) responsáveis pelo transporte de aminoácidos e outras aminas (CAIN. KAISER, 2011).

Na ausência de aminoácidos, como quando a célula está a crescer em amônio, a Gap1 está ativa na membrana plasmática, mas quando o meio contém aminoácidos, a proteína é ubiquitinada e endereçada para o endossoma e vacúolo (CAIN. KAISER, 2011). A regulação da Gap1 é na realidade extremamente complexa, o que acabou por revelar que esta proteína atua também como sensor de aminoácidos ((CAIN. KAISER, 2011). A expressão e a atividade das permeases responsáveis pela entrada de arginina ou da prolina na célula também estão sujeitas a regulação do nitrogênio (LASKO. BRANDRISS, 1981. ROBERG. ROWLEY. KAISER, 1997. STANBROUG. MAGASANIK, 1995. WIAME. GRENSON. ARST Jr, 1985). De um modo geral, a presença de uma fonte preferencial de nitrogênio reduz a atividade destas permeases, reduzindo conseqüentemente a indução de vias de utilização de nitrogênio específicas (COOPER et al., 1992. CAIN. KAISER, 2011).

### **2.3.3 A repressão catabólica pelo nitrogênio**

Na presença de excesso de nitrogênio não acontece a transcrição dos genes que codificam as proteínas necessárias para o transporte e assimilação de fontes secundárias de nitrogênio. Tal como discutido, esse sistema de controle da transcrição é denominado repressão catabólica pelo nitrogênio. Por outro lado, quando uma fonte primária de nitrogênio chega ao seu limite, e somente as fontes de menor qualidade estão disponíveis, os genes, até então, reprimidos são transcritos (COOPER, 2002).

A primeira abordagem ao mecanismo subjacente a este processo leva aos genes responsáveis pela biossíntese das pirimidinas, em particular da uracila. O ureidosuccinato é o produto da aspartato transcarbamilase Ura2 e o primeiro intermediário da síntese de novo de uracila. Trata-se de um composto que partilha com o alantoato, uma fonte de nitrogênio pobre, o transportador Dal5. O gene *DAL5* depende da ativação por Gln3, que por sua vez é sensível à repressão por Ure2

quando na presença de uma fonte de nitrogênio rica como a amônio ou a glutamina. Em mutantes *ura2Δ* cultivados dessa forma, a entrada de fontes de nitrogênio pobres não acontece devido à ausência da permease Dal5, o que impede a célula – mutante auxotrófico para uracila - de usar o ureidosuccinato (DRILLIEN. LACROUTE, 1972. DRILLEN. AIGLE. LACROUTE, 1973. GRENSON et al., 1974. LACROUTE, 1968. TUROSCY. COOPER, 1987). Este é o mecanismo de repressão catabólica pelo nitrogênio desencadeado pela presença de amônio ou de glutamina. Segundo Courchesne e Magasanik (1988) mutações no *GLN3* foram epistáticas para *ure2Δ*, fazendo com que Ure2 fosse reconhecido como um regulador negativo da função do Gln3, ou da expressão dos genes da repressão catabólica pelo nitrogênio.

Em resumo, quando o nitrogênio está em excesso, a Ure2 inibe a ação da Gln3 e da Gat1 impedindo que estas duas proteínas entrem no núcleo. Entretanto, quando uma fonte de nitrogênio pobre é fornecida, ou uma fonte boa de nitrogênio é limitada, a Ure2 é impedida de funcionar. Uma vez que a Ure2 não pode inibir a ação da Gln3 e do Gat1, estas moléculas entram no núcleo e ligam-se aos promotores contendo elementos GATA, ativando a síntese de fatores de transcrição GATA (COOPER, 2002).

## **2.4 Regulação do metabolismo do carbono pelo nitrogênio**

Existe uma ideia generalizada de que a razão principal subjacente a fermentações que param (ou diminuem a intensidade), quando há limitação de nitrogênio, é a inibição do consumo de açúcar resultante de uma forte redução da atividade de transportadores, desencadeada pela interrupção da síntese de novas proteínas e degradação das existentes. O transporte do açúcar através da membrana plasmática é mediado por um sistema complexo de 18 permeases altamente reguladas conhecidas pela designação HXT (Hexose Transporter). Estas permeases têm afinidade muito variável pela glicose. Por exemplo, os genes *HXT2* e *HXT4* são induzidos e reprimidos por, respectivamente, altos e baixos níveis de glicose, e as permeases correspondentes têm uma afinidade moderada pela glicose (BUZIOI et al., 2008. LIANG. GABER, 1996. REIFENBERGER. FREIDEL. CIRIACY, 1995. REIFENBERGER. BOLES. CIRIACY, 1997. ÖZCAN. JOHNSTON, 1995. YE et al., 2001). O gene *HXT5* também codifica um transportador com moderada afinidade pela glicose, que não é transcrito durante o crescimento da levedura em meios com alta concentração de açúcar, mas a sua transcrição é ativada em

condições de taxa de crescimento baixas, bem como em condições de baixa concentração de nitrogênio. Em condições específicas, estas permeases são ubiquitinadas e endereçadas para degradação (KRAMPE et al., 1998. KRUCKEBERG et al., 1999. van SUYLEKOM et al., 2007), como é o caso das Hxt6p e Hxt7p que são internalizadas em condições de escassez de nitrogênio mesmo na presença de uma fonte de carbono (KRAMPE. BOLES, 2002).

A atividade do transporte das hexoses foi considerada como fator limitante do fluxo glicolítico e concomitante atividade fermentativa. No entanto, as razões subjacentes à variação da cinética do consumo de açúcar que leva a interrupção ou atenuação de uma fermentação não são claras. A expressão e a atividade das enzimas de consumo da glicose e da frutose em *S. cerevisiae* são consideradas essenciais para o desempenho fermentativo na indústria do etanol. Contudo, a dinâmica do consumo da glicose durante as diferentes fases da fermentação depende não só da disponibilidade de glicose, mas também de nitrogênio, e esta é pouco estudada. Palma et al. (2012) mostraram que a capacidade de transporte da glicose é máxima nas fases iniciais da fermentação, quando a concentração de nitrogênio não limita o crescimento, tanto em meio rico como em meio com limitação de nitrogênio. Nessas condições, o transporte de glicose é essencialmente suportado pela Hxt1p (MAIER et al., 2002. REIFENBERGER et al., 1997). Sabe-se que na presença de elevadas concentrações de glicose no início da fermentação (valores acima de  $100 \text{ g L}^{-1}$ ), a transcrição do gene *HXT1* é induzida e coordenada pela atividade da Snf3p/Rgt2p-Rgt1p, e pela via HOG (PEREZ et al., 2005. TOMAS-COBOS. VIANA. SANZ, 2004).

A via TOR (Target of Rapamycin) (item 2.4.1), que controla o crescimento e o metabolismo em resposta à disponibilidade de nutrientes, tem um papel ativo na expressão do gene *HXT1* (SCHMELZLE et al., 2004. TOMAS-COBOS. VIANA. SANZ, 2005). A adição de amônio a uma fermentação com limitação de nitrogênio, contendo concentrações de açúcar indutoras do *HXT1*, não variou o consumo de glicose, o que é consistente com a falta de variação no nível de transcrição deste gene. Por outro lado, o transportador Hxt3 permaneceu funcional apesar da glicose disponível no meio (ÖZCAN. JOHNSTON, 1995), bem como concentrações de etanol até valores máximos de 10% (v/v), ou durante fermentações lentas (MENDES-FERREIRA et al., 2007). Convém notar que a resposta transcricional das células de mesma linhagem, cultivadas em condições de diferente disponibilidade de

nitrogênio, apresentaram uma expressão elevada do gene *HXT3* nas fases tardias, presumivelmente, associada à resposta a altas concentrações de etanol (KARPEL. PLACE. BISON, 2008. MENDES-FERREIRA et al., 2007). A expressão do *HXT3* não é impedida pela glicose, ou por limitações de nitrogênio, de modo que a Hxt3 desempenha um papel muito importante nas fermentações independentemente das condições iniciais. Isso é particularmente importante durante o período de latência depois de uma suplementação com amônio. Neste caso, a cinética do consumo de glicose revela que a afinidade do Hxt3p permanece igual embora a capacidade de transporte aumente, sugerindo que novas proteínas transportadoras sejam sintetizadas (MENDES-FERREIRA et al., 2007).

Apesar da falta de nitrogênio causar uma redução da capacidade de consumo da glicose em cerca de 80% da capacidade inicial, os restantes 20% foram presumivelmente mantidos essencialmente pela atividade do Hxt3p (PALMA et al., 2012). Após uma suplementação com amônio, a recuperação de fermentações lentas, por falta de nitrogênio, pode ser atingida pelo aumento da capacidade de consumo de glicose, presumivelmente relacionado com a síntese *de novo* de transportadores (PALMA et al., 2012). Esta hipótese foi sugerida pela ativação da transcrição de *HXT2* durante o período de latência de crescimento e, subsequentemente pela co-expressão dos genes codificadores de Hxt3p, Hxt4p, Hxt6p e Hxt7p que acompanham ativamente a recuperação da fermentação (REIFENBERGER et al., 1995).

#### **2.4.1 Via de sinalização TOR (Target of Rapamycin)**

As vias de sinalização são vias por onde a disponibilidade de nutrientes no ambiente gera sinais que são traduzidos e transmitidos sob a forma de abundância e localização de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica (HOFFMAN-BANG, 1999). A via TOR (Target of Rapamycin) é uma dessas vias. A rapamicina que dá o nome à via (também conhecida por *sirolimus*), é uma droga com propriedades imunossupressoras e de anti-proliferação celular, que partilha um receptor com a calcineurina, o FKBP12 (FK-binding protein 12), que por sua vez tem afinidade para se ligar as proteínas Tor.

A via TOR é liderada nos Eucariontes superiores por uma quinase mTor e em *S. cerevisiae* por duas, as Tor1 e Tor2 parcialmente redundantes. Nos dois tipos de células, as quinases Tor são responsáveis por controlar a expressão de proteínas

essenciais aos processos vitais para a sobrevivência da célula: tradução/síntese proteica, biogênese de ribossomas e organização da cromatina, ciclo celular, morte/autofagia e envelhecimento (revisto em DE VIRGILIO, 2012). Além disso, a via TOR (Figura 6) estabelece *crosstalk* com numerosas vias de transdução de sinal, nomeadamente, a via da PKC, ou da integridade celular responsável pela manutenção da parede celular, a via Ras/cAMP, que, em conjunto com a PKA, respondem à fonte de carbono controlando a proliferação/ciclo celular, a morte celular programada entre outros processos, ou mesmo a via da GCN2 que controla a iniciação da tradução e, de acordo, com a escassez ou abundância de aminoácidos, bem como o envelhecimento cronológico (revisto em DE VIRGILIO, 2012).

O extenso grau de *crosstalk* faz com que haja muitas respostas comuns à ativação de várias vias (DE VIRGILIO, 2012, ROBERG et al., 1997). Além disso, as Tor1 e Tor2 são parcialmente redundantes, podendo independentemente uma da outra, canalizar respostas comuns (ZHENG et al., 1995). Em vista das suas funções e do grau de *crosstalk* da via, as TOR quinases são proteínas potentes, cuja perturbação tem efeitos pleiotrópicos sobre a célula.

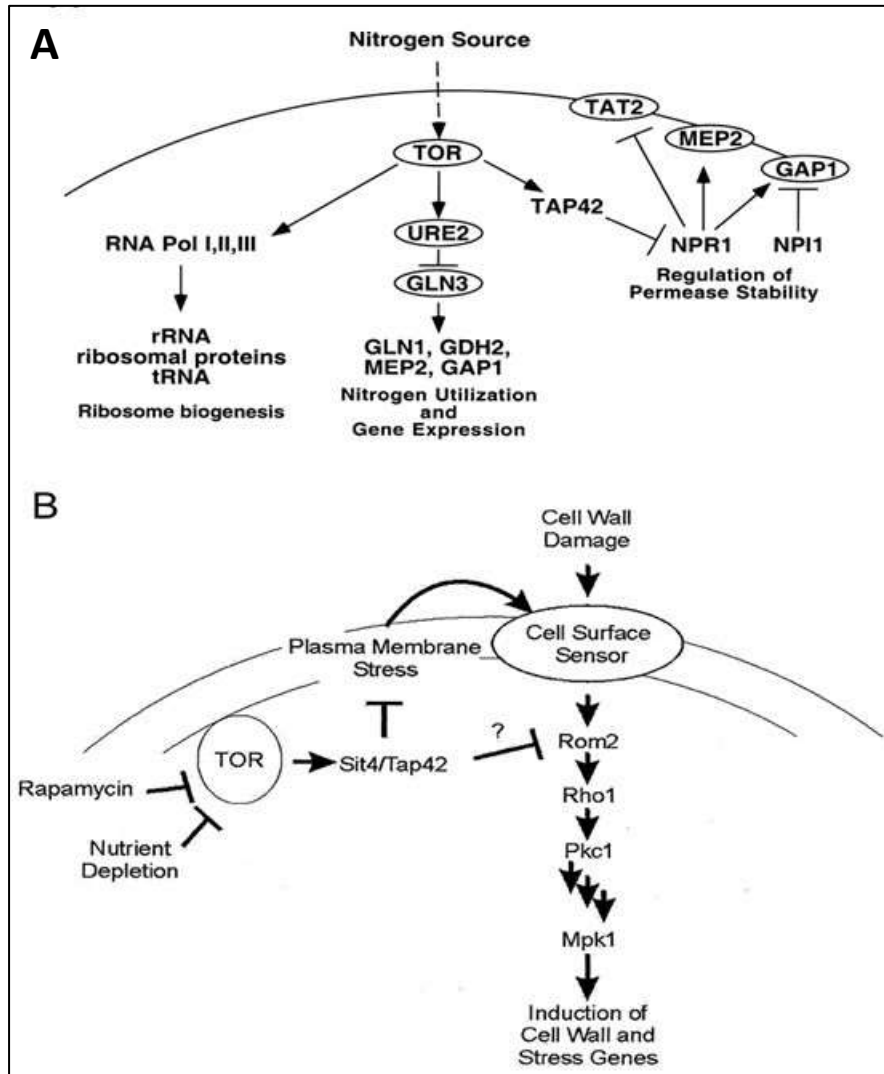


Figura 5 - (A) Cascata de sinalização TOR em *S. cerevisiae*. (B) Modelo da forma como a via TOR sinaliza para a via da PKC

Fonte: TORRES et al. (2002)

Fonte: CARDENAS et al. (1999)

Entre os fatores que controlam a transcrição sob o controle da via TOR, o Dal80 é um regulador negativo de vários genes e comum a múltiplas vias de assimilação de nitrogênio (revisto em WINDERICKX et al., 2003). O gene *DAL80* é altamente sensível a repressão catabólica pelo nitrogênio quando as células crescem em meio com pouca glutamina. No entanto, a adição de rapamicina (inibidor específico das Tor1/2) (Figura 7) rapidamente induz e aumenta a sua expressão (COOPER, 2002), o que sugere que na presença de excesso de nitrogênio as proteínas Tor são ativadas. Como resultado desta ativação, a síntese de proteínas é estimulada, enquanto a degradação proteica e a expressão dos genes sensíveis à repressão catabólica de nitrogênio são inibidas. Dessa forma, na

presença de rapamicina, como na presença de uma fonte pobre em nitrogênio, as proteínas Tor são inativadas, resultando na inabilidade de estimular a síntese proteica, na indução da degradação proteica, e no aumento na sensibilidade da expressão dos genes responsáveis pela repressão catabólica do nitrogênio. Adicionalmente, a inativação das Tor1/2 também resulta na localização nuclear do regulador Gln3, que em condições de excesso de nitrogênio se localiza no citoplasma (COOPER, 2002). A fosforilação do Gln3 perdida, ou simplesmente não ocorrendo (HARDWICK et al., 1999), resulta na impossibilidade deste regulador entrar no núcleo e ativar a transcrição mediada por GATA (BERTRAM et al., 2000). GATA corresponde precisamente à sequência nucleotídica do DNA que as letras representam e encontra-se em promotores reconhecidos por fatores de transcrição com motivos *dedo de zinco* ricos em cisteínas (p. ex.,  $Zn^{2+}$  (C-X<sub>2</sub>-C-N-C-X<sub>2</sub>-C)) (OMICHIINSKI et al., 1993).

A função da Ure2 é regular a localização e habilidade da Gln3 e controlar a transcrição. Desta forma, a Ure2 funciona como regulador negativo da expressão do gene *GLN3*, que codifica um ativador transcricional, sendo a sua expressão gênica sensível à repressão pelo nitrogênio (revisto em WINDERICKX et al., 2003). A Ure2 forma um complexo no citoplasma com a Gln3 e com o Gat1 (outro ativador transcricional dependente de nitrogênio) (revisto em WINDERICKX et al., 2003), o que impossibilita a entrada no núcleo da Gln3 ou da Gat1 (HARDWICK et al., 1999).

A localização citoplasmática do Ure2 deriva da falta de um sinal de localização nuclear funcional. Quando um sinal heterólogo, para localização nuclear, foi adicionado ao seu N-terminal, a Ure2 entrou no núcleo, ligou-se ao Gln3 e o complexo Gln3-Ure2 funcionou como repressor da transcrição (BERTRAM et al., 2000).



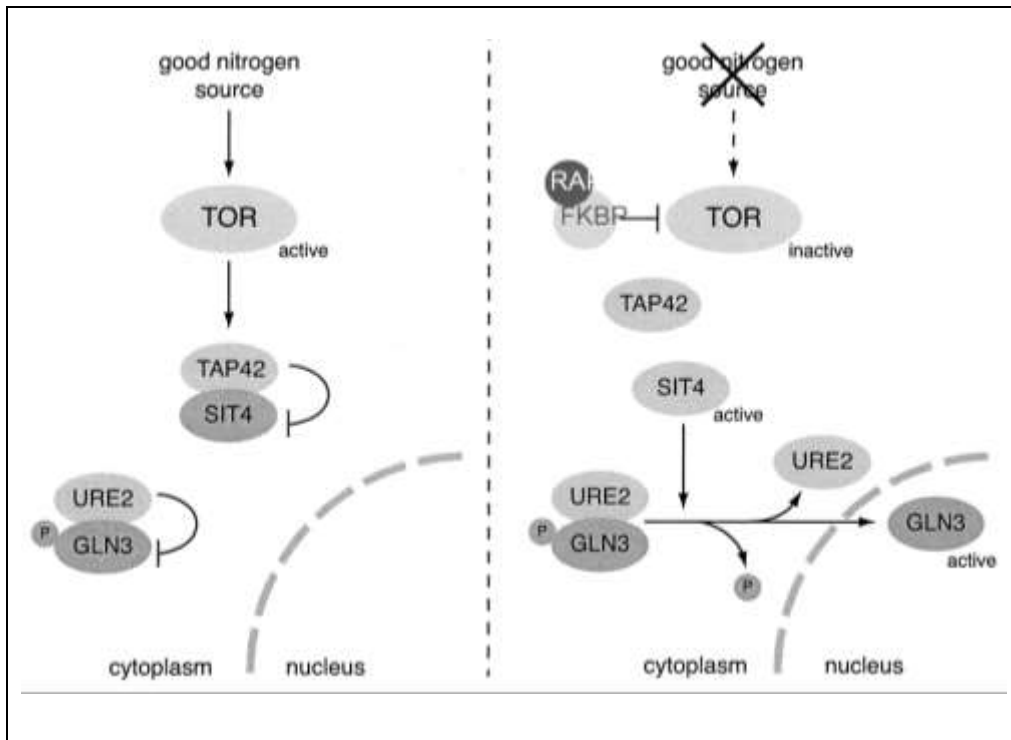


Figura 6 - TOR1/2 de *S. cerevisiae*, quer inibido pela rapamicina (RAP), ou não ativado por falta de uma boa fonte de nitrogênio impede a localização nuclear do ativador da transcrição Gln3

Fonte: CRESPO; HALL (2002)

A Ure2 facilita a fosforilação da Gln3 e da Gat1, ou estabiliza as formas fosforiladas destas proteínas (BERTRAM et al., 2000). Na verdade, a formação dos complexos Gln3-Ure2 e Gat1-Ure2 é apontada como o fator determinante no impedimento da migração, ou seja, a fosforilação facilita a formação do complexo Ure2-Gln3 que não pode ser transportado para dentro do núcleo (BECK. HALL, 1999). Consistente com estas observações, a deleção do *URE2* gera um forte fenótipo para vários genes, cuja expressão se torna muito menos sensível a repressão catabólica por nitrogênio (COFFMAN et al., 1996). Este tipo de mecanismo, que envolve o controle da entrada e saída de proteínas reguladoras do núcleo através da sua fosforilação, ou desfosforilação, é comum a outras vias de transdução de sinal. Em concordância com o modelo acima, a super-expressão do *URE2* resulta na exclusão do núcleo da Gln3 e da Gat1, assim como a perda da expressão do gene leva à sensibilidade acrescida para a repressão do catabolismo pelo nitrogênio. Os produtos dos genes *GLN3* e *URE2* são necessários para uma transcrição apropriada de vários genes de rotas de assimilação de nitrogênio secundárias. A ativação da transcrição do *GLN3* quando as fontes principais estão indisponíveis, e a transcrição do *URE2* aparenta ser reprimida quando as fontes

alternativas de nitrogênio não são necessárias, como acontece com a prolina como fonte de nitrogênio (COX et al., 2000. CUNNINGHAM. ANDHARE. COOPER, 2000. KULKARNI et al., 2001).

#### **2.4.2 Regulação simultânea pelas fontes de nitrogênio e de carbono**

A regulação simultânea da multiplicação das leveduras pelas fontes de nitrogênio e carbono é extremamente complexa e está longe de ser completamente conhecida. Inclui com certeza uma elevada redundância, ou *crosstalk*, com as vias que controlam especificamente cada uma destas fontes de nutrientes (nomeadamente GCN, PKA, Snf3/Rgt2, RAS/cAMP) e um apertadíssimo controle do ciclo celular (nomeadamente via TOR) quando de transições (mais ou menos bruscas) entre abundância e privação (revisto em WINDERICKX et al., 2003). No seu conjunto, e em última análise, a regulação do crescimento durante uma fermentação depende do que se designa como via FGM (Fermentable Growth Medium-induced pathway) (revisto em WINDERICKX et al., 2003. CONRAD et al., 2014). Esta via corresponde a um processo de integração de sinais de outras vias que permite a rápida transição de metabolismo acima referida. A via é liderada no início por *transceptors*, ou seja, transportadores que além de transportarem um substrato, funcionam também como sensores/receptores da disponibilidade extracelular do mesmo, que são extraordinariamente induzidos pela ausência do nutriente que transportam/sentem (CONRAD et al., 2014), ao contrário dos outros transportadores, como a Gap1, que são reprimidos e endereçados para desmantelamento no vacúolo em células em ausência de nitrogênio. A ativação da via FGM não é mediada por cAMP diretamente, mas requer a atividade da quinase dependente de cAMP Tpk1, 2 ou 3, e opera através do efector Sch9 (CRAUWELS et al., 1997. revisto em WINDERICKX et al., 2003).

#### **2.4.3 Via de sinalização HOG (High Osmolarity Glycerol)**

A via de sinalização HOG (High Osmolarity Glycerol) responde a estímulos de aumento de stress osmótico através da ativação da síntese e acumulação intracelular do único osmolito de *S. cerevisiae*, o glicerol. É uma cascata de MAP quinases (revisto em WINDERICKX et al., 2003), cujo alvo é a MAPKKK Hog1, que, à semelhança do mecanismo acima descrito para a Gln3, entra no núcleo quando é fosforilada. Uma vez dentro do núcleo, a Hog1 funciona como estimuladora da

síntese de fatores de transcrição específicos para promotores contendo elementos de resposta STRE, desta forma induzindo a síntese de proteínas de resposta a stress (Figura 8).

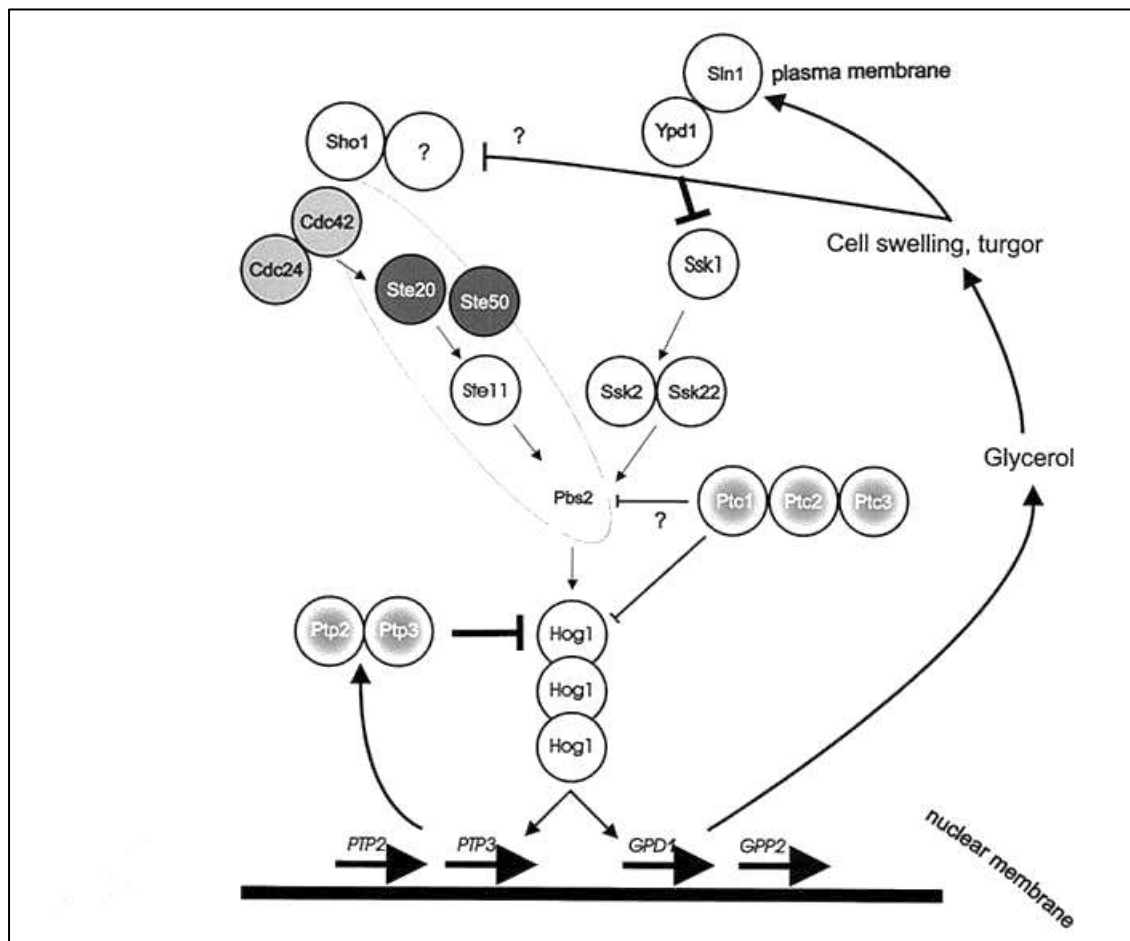


Figura 7 - Cadeia de sinalização que provocam a ativação das hog  
Fonte: HOHMANN, 2002

Nas leveduras, a Hog1 é ativada pelo stress hiper-osmótico causado por elevadas concentrações de solutos (nutrientes como o açúcar ou sal), ou etanol. Em qualquer dos casos, este tipo de stress promove o abaixamento da atividade da água ( $a_w$ ), ou seja, da água livre para a utilização na solubilização de compostos dentro e fora da célula, sendo por isso equivalente à desidratação. Além disso, o etanol também atua como agente caotrópico (COLLINS, 1997). As condições de fermentação industrial constituem uma combinação de agentes estressantes, que aliam o efeito de abaixamento da  $a_w$  causado pela elevadíssima concentração de nutrientes e o peso das colunas de mosto fermentativo, ao efeito caotrópico das concentrações crescentes de etanol e ao baixo pH das lavagens com ácido sulfúrico entre ciclos fermentativos.

Os elementos de resposta ao stress ativados pela via HOG, também são ativados por outras vias de sinalização que respondem a outro tipo de sinais de stress: stress oxidativo, choque térmico, sorbato ou benzoato em concentrações  $\geq 5$  mM, baixo pH (2,8), e ainda por etanol ( $\geq 7,5\%$  v/v) (VOM DAHL et al., 2001. PRICK et al., 2006). Como exemplo deste extenso *crosstalk*, mutantes *hog1* $\Delta$  em condições de stress etanólico, por carência de nitrogênio e sujeitos a choque térmico apresentaram uma redução na atividade da catalase T (Ctt1), uma enzima de resposta ao stress oxidativo (PRICK et al., 2006). Em sentido oposto, a via HOG também pode ser ativada pela deficiência de nitrogênio (TOMAS-COBOS. VIANA. SANZ, 2005).

A deficiência de nitrogênio é um dos estímulos de autofagia em leveduras como em mamíferos. A autofagia é o processo responsável pela degradação das proteínas e outros componentes celulares nos vacúolos, e é induzida quando existe carência de nutrientes no ambiente extracelular. Na levedura, um defeito na autofagia resulta em perda de viabilidade durante a carência de nutrientes, já que a degradação proteica fornece um mínimo de nutrientes necessários para a sobrevivência das células em privação (KIRISAKO et al., 1999). O gene Hog1 de *S. cerevisiae* tem um ortólogo funcional em mamíferos, o p38<sup>MAPK</sup> reconhecidamente envolvido na regulação da autofagia, que nestas células pode ser induzido em resposta aos estresses hiper-osmótico e oxidativo, ou pela deficiência de aminoácidos, ou ainda, pela presença de glucagon (VOM DAHL et al., 2001).

O gene *HOG1* em *S. cerevisiae* não está descrito como sendo necessário para a indução da autofagia (HOHMANN, 2002). Apesar disso, a diminuição da capacidade autofágica observada no mutante *hog1* $\Delta$  sugere que a Hog1 é necessária para o normal desenvolvimento do processo em situações de stress osmótico (VOM DAHL et al., 2001). A Atg8 é uma proteína que está ancorada na membrana plasmática, envolvida na formação das vesículas autofágicas e que sofre ela própria degradação por autofagia em condições de abundância de fonte de nitrogênio. Ensaio no mutante *hog1* $\Delta$  super exprimindo GFP-Atg8 (PRICK et al., 2006), sugerem que a autofagia é dependente da osmolaridade extracelular e que este efeito não é dependente da falta de nutrientes. Pode-se especular que em leveduras, a MAPKKK Hog1 sirva para ajudar as células a sobreviverem e manterem a autofagia durante o stress osmótico (SCOTT et al., 2000).

## 2.5 Fatores de stress nas leveduras

As leveduras respondem aos efeitos deletérios do estresse desenvolvendo rapidamente respostas moleculares com o intuito de reparar danos e de se proteger contra exposições adicionais ou mesmo outras formas de estresse (ESTRUCH, 2000. MENSONIDES et al., 2002). Variados efeitos estressantes (Figura 9) afetam negativamente as leveduras, sendo os mais visíveis a redução da viabilidade, o aumento da quantidade intracelular de glicerol, e a diminuição da quantidade intracelular do glicogênio e da trealose. Juntamente com a redução da viabilidade ocorre uma redução na produção de biomassa. A trealose e o glicogênio representam 25% do peso seco da levedura (LILLE. PRINGLE, 1980) e a variação destes dois compostos estão associados a tolerância a diversos tipos de estresse (BASSO et al., 2008. WIEMKEN, 1990). Concentrações elevadas de glicerol são observadas em condições de estresse osmótico (BRUMM. HEBEDA, 1988. MYERS. LAWLOR . ATTFIELD, 1997), sugerindo que o aumento na formação do mesmo pode refletir condições gerais de estresse durante a fermentação (ALVES, 1994). O glicerol, produto que mais se forma na fermentação, desvia de 5 a 8% do açúcar metabolizado para sua formação (ALVES, 1994. OURA, 1977).



Figura 8 - Alguns dos fatores estressantes aos quais as leveduras são submetidas  
Fonte: BAI et al., 2008

### 2.5.1 Stress pelo Etanol

A tolerância ao etanol pelas leveduras, especialmente pela *S. cerevisiae*, é limitada. esta limitação é verificada pela redução no crescimento e a pela diminuição na viabilidade celular (PIPER, 1995). O etanol tem como principal impacto a fluidez da membrana citoplasmática, pois atua alterando a polaridade da mesma. O efeito é o seguinte: o etanol e os outros álcoois de cadeia curta se instalam no meio da bicamada fosfolipídica mais propriamente na parte hidrofóbica, onde se instalam nos espaços que resultam das interações entre ácidos graxos insaturados e proteínas, que acaba por restringir o movimento dos ácidos graxos nas cadeias e causam um aparente decréscimo na fluidez da membrana (BANAT et al., 1998. INGRAM. 1976). O etanol quando se insere na região hidrofóbica, aumenta a polaridade e perturba a troca livre das moléculas polares, enfraquecendo, portanto, as interações que ocorrem e por consequência altera o posicionamento das proteínas na bicamada fosfolipídica (INGRAM. BUTKE, 1984 apud SALGUEIRO et al., 1988). Esta alteração na integridade da membrana por parte do etanol e de outros agentes caotrópicos, altera a capacidade da levedura em manter o gradiente de concentração de compostos variados através da membrana citoplasmática, sendo afetados os correspondentes sistemas de transporte (INGRAM. BUTKE, 1984 apud SALGUEIRO et al., 1988). Desta forma, é natural que ocorra uma inibição da taxa máxima de captação de glicose em consequência das mudanças do ambiente lipídico da membrana citoplasmática (LEÃO. VAN UDEN, 1982). O etanol também tem um efeito inibitório no fluxo de outros compostos, como aminoácidos, efeito este que é potenciado pelo aumento da temperatura.

Além dos referidos efeitos, algumas enzimas e proteínas da membrana que não os transportadores acima referidos, têm a sua função reduzida devido ao aumento das concentrações de etanol no meio fermentativo. Exemplos dessas enzimas são algumas álcool desidrogenase, e hexoquinases, e a ATPase membranar (Pma1) (BAI et al., 2008. PIPER, 1995). A Pma1 é uma bomba de prótons, e esta proteína tem como função básica criar um gradiente eletroquímico indispensável à sobrevivência da célula (DUFOR. GOFFEAU, 1980). O etanol, numa concentração baixa ativa esta proteína, já em concentrações de 8 a 10% (p/v) inibe a sua atividade (ROSA. SÁ CORREIA, 1992). A 11,6%, Cartwright et al. (1986) mostrou que o etanol inibiu a ATPase da membrana da levedura *S. cerevisiae*.

O efeito caotrópico do etanol acima mencionado actua também e principalmente sobre a porção lipídica da membrana, muito em particular sobre os fosfolipídios. Estes variam com a idade da célula, e também com a regulação fisiológica, nomeadamente pelo modo de alimentação, acúmulo de etanol dentro da célula, temperatura e pressão osmótica (BANAT et al., 1998). Ingram (1976) relatou a importância da fração lipídica da membrana citoplasmática em se adaptar as variações ambientais e tolerar as concentrações de etanol.

Apesar das décadas de aplicação biotecnológica, a forma como o etanol actua na célula ainda não bem estudada e não é conhecida, principalmente a nível genético (BAI et al., 2008). A base do mecanismo de atuação do etanol ao inibir a fermentação é difícil de explicar, pois é um agente desnaturante de lípidos e proteínas e não deveria por isso ter especificidade de acção (PASCUAL et al., 1988).

### **2.5.2 Pressão Osmótica**

O estresse causado pela pressão osmótica é um fenómeno que afeta desde organismos unicelulares até ao ser humano. A membrana citoplasmática é altamente afetada por este fator de stress. Pressões osmóticas tendem a desestabilizar a homeostase celular dos organismos (JOHN et al., 2012). A primeira consequência quando a célula fica exposta a condições de elevado estresse osmótico é a perda de água pela migração do interior da célula para o exterior, fazendo com que a membrana citoplasmática sofra turgor (MAGER et al., 2002). Este fator de estresse age de forma sinérgica com o etanol, aumentando o poder tóxico do mesmo e como consequência reduz a viabilidade da célula. Isto causa uma interrupção do crescimento da célula. A pressão osmótica é a força com a qual um solvente se desloca de um meio menos concentrado para outro mais concentrado, através de uma membrana semipermeável. Pressão osmótica elevada do meio pode aumentar a toxicidade do ácido láctico que inibe o crescimento de *S. cerevisiae* (NGANG. LETOURNEUA. VILLA, 1989).

Em fermentações usando mosto com até 31% de sólidos dissolvidos, o efeito inibitório da elevada pressão osmótica e do alto teor de etanol produzido sobre a viabilidade da levedura pode ser superado pela suplementação do meio com nitrogênio, ergosterol e ácido oleico (CASEY. MAGNUS. INGLEDEW, 1984).

Apesar do exposto, as células possuem a capacidade de osmorregulação que é o controle ativo do balanço hídrico e da homeostase celular que são cruciais à vida. Em *S. cerevisiae*, o sistema osmorregulatório é bem compreendido. A célula responde ao estresse hiper-osmótico primeiramente reprimindo seu crescimento, depois ocorre o acúmulo de glicerol no interior celular com o objetivo de recuperar o turgor. Isso ocorre pela prevenção do fluxo do glicerol e pelo aumento da síntese do mesmo através da ativação de uma rota sinalizadora conhecida como rota HOG (high-osmolarity glicerol). O glicerol desempenha o papel central na adaptação celular ao estresse osmótico (MAGER et al., 2002).

## **2.6 Fermentação com alto teor alcoólico**

Os processos industriais de produção de etanol com altas concentrações apresentam importantes vantagens ressaltadas no âmbito energético, econômico e ambiental. No Brasil, o processo industrial utiliza o caldo de cana e o melaço, resíduo da produção de açúcar, que podem ser combinados e submetidos à fermentação por processo contínuo ou descontínuo, sendo o mais utilizado o descontínuo alimentado. Os processos reutilizam as células de um ciclo para outro (BASSO et al., 2008).

Visando aumentar a eficiência do processo, na década de 80, alguns estudos de fermentação foram iniciados utilizando mostos contendo de 18-22% (p/v) de açúcar, de onde eram obtidos vinhos com uma concentração de etanol de 10-12% (v/v) (PULIGUNDLA et al., 2011). Na década seguinte, as pesquisas indicaram que as leveduras poderiam suportar concentrações mais elevadas de etanol no meio. a hipótese seria utilizar mostos ainda mais concentrados, que originariam vinhos com uma concentração de álcool superior a 15% (v/v). Vinhos com este teor alcoólico reduz os custos porque cerca de 30% dos custos do processo de produção situam-se na etapa de destilação. Assim, o processo utilizaria menos vapor e, por consequência, menos água, além de produzir menos vinhaça, apesar de esta ser mais concentrada (PULIGUNDLA et al., 2011).

Outra vantagem da utilização desta tecnologia é o fato de que como o caldo teria uma concentração superior de etanol, este teria um efeito repressor nas bactérias provocado por essa concentração, e com isto permitiria reduzir a utilização de antibióticos (THOMAS. HYNES. INGLEDEW, 1996). No entanto, a utilização de



leveduras para fermentações de alta concentração é limitada, pois estas linhagens de leveduras não suportam os estresses inerentes a este processo fermentativo (BASSO et al., 2003). Sendo assim, são necessárias leveduras com tolerância a elevada concentração de etanol, a variações de temperatura, à pressão osmótica, entre outros fatores.

### 2.6.1 Efeito da Suplementação Nitrogenada

Durante o processo de fermentação alcoólica, as células de levedura requerem alguns nutrientes para seu desenvolvimento, que influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular, e por consequência na conversão do açúcar em álcool (BASSO et al, 1996). É o caso do nitrogênio, um elemento essencial para a multiplicação e crescimento das células. Este nutriente é um constituinte de vários compostos orgânicos encontrados nas leveduras. Do nitrogênio encontrado nas leveduras, 70% estão na forma de proteína, 8 a 10% em purinas, e cerca de 4% em piridinas. O restante encontra-se em outros compostos solúveis (TORTORA. FUNKE. CASE, 2011).

Basso et al. (1996) realçou a importância da adição de nitrogênio extracelular para ocorrer uma contínua produção de novas células e a levedura poder obter este elemento dos aminoácidos, sais de amônio, amidas e nitratos. A forma como este nutriente se encontra disponível no meio é de importância vital para que a célula consiga a sua utilização. A forma mais favorável para esse aproveitamento é a forma amoniacal. Na sua ausência outras fontes são utilizadas, como a forma amídica (uréia) ou amínica (na forma de aminoácidos).

Cruz et al. (2003) e Batistote et al. (2006) sugerem que linhagens industriais de *S. cerevisiae* foram fortemente afetadas pela complexidade estrutural da fonte de nitrogênio durante a fermentação de diferentes tipos de açúcar, sendo que as leveduras apresentaram um desempenho fermentativo superior quando a fonte nitrogenada possuía nitrogênio na forma mais complexa, como os hidrolisados enzimáticos de proteínas. A adição de uma fonte de nitrogênio, como os sais de amônio, proporciona concentrações mais elevadas de etanol nos meios VHG (SRICHUWONG et al., 2009. SRIKANTA et al., 2006). Suplementando o meio VHG com uréia (0,96 g L<sup>-1</sup>) e reduzindo a temperatura para 25°C, Theerarattananon et al. (2008) observaram que a ureia equilibra a deficiência de nitrogênio durante a fermentação, e prolonga a fase logarítmica de *S. cerevisiae*, resultando em um

rendimento maior de etanol. Assim, conhecendo a necessidade que a célula tem de nitrogênio fica claro que para a produção de álcool combustível é necessário a suplementação com fontes de nitrogênio, principalmente sabendo que os mostos de todos os cereais, incluindo milho e trigo, são deficientes em nitrogênio assimilável (INGLEDEW, 2005). O mesmo autor sugere que esta mesma deficiência é a causa da maioria das fermentações lentas e das que são interrompidas precocemente de mostos oriundos de matérias-primas amiláceas ou sacarinas.

### **2.6.2 Efeito da suplementação com Fósforo**

O fósforo é um dos componentes estruturais de várias macromoléculas como, os ácidos nucleicos, fosfolipídios, ATP (adenosina trifosfato) (HONIG, 1960), e por isso faz parte da composição de todos os seres vivos. Além disso, o fósforo é um elemento de elevada importância pela sua participação em diversas rotas metabólicas, tanto no ciclo de Calvin como na glicólise. Depois do nitrogênio, o fósforo é o segundo macronutriente mais importante e que mais limita o crescimento dos vegetais (HONIG, 1960).

A cana-de-açúcar enquanto planta tem sido exaustivamente estudada tanto por agrônomos, fisiologistas, tecnólogos, químicos entre outros. No entanto, no que diz respeito à fermentação do seu caldo, o que mais interessa são os elementos que a planta enquanto matéria-prima traz para o processo industrial, e a forma como a sua composição de acordo com as condições climáticas e agronômicas pode influenciar o processo fermentativo (CESAR et al., 1987). A cana-de-açúcar apresenta uma concentração de 0,2% de fósforo em peso seco de massa vegetal total e o fósforo encontra-se na forma mineral e orgânica, sendo que grande parte está na forma solúvel (DELGADO. CESAR, 1977; CESAR et al., 1987). O fósforo encontra-se 95% no colmo e este fica solúvel no processo de extração. Os fosfatos orgânicos podem ser divididos em grupos conforme a sua forma: fosfatos de inositol, fosfatos de hexoses, nucleotídeos (compostos complexos de ácido fosfórico com carboidratos e bases purínicas ou pirimidínicas), fosfo-proteínas (ácido fosfórico combinado com hidroxiaminoácidos) e fosfolipídeos (HONIG, 1960).

De acordo com Amorim (1985), o fósforo que a levedura absorve tem como função primordial a transferência de energia. As necessidades de fosfato das células são supridas pelo consumo de fosfato inorgânico do meio. O fosfato consumido

pode ser utilizado para incorporação da maior parte dos constituintes da célula, como sendo fosfolípidos, ácidos nucleicos e proteínas, e é também necessário para muitas reações de trans-fosforilação em intermediários no metabolismo. A concentração de fosfato livre é geralmente mantida a níveis baixos. Somente quando as células mudam do metabolismo fermentativo para o metabolismo respiratório seguindo um pulso glicolítico, é que existe uma flutuação dinâmica do fosfato da célula (VISSER et al. 2004).

O fosfato na levedura é armazenado na forma de polifosfatos. Estes são polímeros de forma linear de ortofosfato anidro. Uma grande concentração de polifosfatos é acumulada e o seu rendimento na hidrólise é a mesma quantidade de energia livre como a hidrólise do ATP a ADP e  $P_i$  ambas são fontes importantes de fosfato e energia para a célula (WALKER, 1998).

Existem duas formas de absorção do fosfato pela célula, quando ocorre uma fosfatase ácida, pela ação das fosfatases ácidas codificadas pelos genes *PHO5*, *PHO11* e *PHO12* o íon fosfato entra na célula com a utilização de  $H^+$ , utilizando de uma proteína codificada pelo *PHO84*. Um conceito de transdução de sinal é a utilização de transportadores de nutrientes e proteínas intimamente relacionados como sensores dos nutrientes. O mecanismo destes “transceptores” não está esclarecido. O transceptor Pho84, na levedura, transporta fosfato e promove uma rápida ativação da rota PKA (proteína kinase A). Popova et al. (2010) identificou que compostos contendo fosfato, agem como agonistas sinalizadores de não transporte de Pho84. Isto significa que a sinalização não necessita do transporte completo do substrato. Para o agonista não transportador glicerol-3-fosfato (G3P), é transportada por dois outros transportadores, Git1 e Pho91, sem desencadear a sinalização. G3P é um inibidor competitivo do transporte através de Pho84, indicando a interação direta com o seu local de ligação do grupo fosfato (POPOVA et al., 2010). Assim sendo, existe a outra forma de absorção de fosfato em que o íon fosforo entra na célula pela ação da Pho89 e um íon  $Na^+$ . Esse fosfato entra no retículo endoplasmático se ligando e originando glicerol-3-fosfato por ação da DL-glicerol-3-fosfatase. O gene responsável por este mecanismo é *HOR2* (POPOVA et al., 2010). O ácido fosfonoacético foi identificado pelos autores, como um inibidor competitivo de transporte sem função agonista para sinalização. Isto indica que a ligação de um composto para o local de ligação do fosfato de Pho84 não é suficiente para desencadear a sinalização. Aparentemente, a sinalização requer uma mudança

conformacional específica que pode ser parte de, mas não necessita acessibilidade, o ciclo completo de transporte. Utilizando o método de acessibilidade de cisteína substituído (SCAM) foi identificado Phe (160) na DTM IV e Val (392) na DTM VIII como resíduos expostos com a sua cadeia lateral para o local de ligação do fosfato de Pho84. A inibição de sinalização e de transporte tanto por modificação covalente de Pho84 (F160C) ou Pho84 (V392C) mostrou que o mesmo local de ligação é utilizado para o transporte de fosfato e de sinalização com fosfato e Gly3P (POPOVA et al., 2010).

### **2.6.3 Fermentações com alta concentração de açúcar (VHG – Very High Gravity)**

Tal como referido acima, uma fermentação com alta concentração de açúcar (*Very High Gravity* - VHG), e por consequência alta concentração de etanol, é uma tecnologia que pode potenciar a produtividade, o rendimento e a capacidade implantada das destilarias sem necessidade de grandes investimentos ou alterações processuais (BASSO et al., 2008). Uma fermentação VHG presume mudar as concentrações de caldo de cana dos atuais 18% a 25% para 30 ou 35%, esperando a obtenção de mais etanol que os atuais 11 a 12% (BASSO et al., 2008. BASSO. PAULILLO, 2003. PIDDOCKE et al., 2009. SOUZA-DIAS et al., 2015). A fermentação de melaço de cana em condições VHG (477 g L<sup>-1</sup>) propiciou a obtenção de 14,8% de etanol (v/v) (THOMAS et al., 1996).

Como foi referido acima, a suplementação do meio VHG com uréia (0,96 g L<sup>-1</sup>) a 25°C, permitiu equilibrar o mosto em relação à necessidade de nitrogênio durante a fermentação, e prolongou a fase logarítmica de multiplicação de *S. cerevisiae*, resultando em maior rendimento em etanol (THEERARATTANANOON et al., 2008). Por seu lado, a adição de 20 mM de fosfato de diamônio melhorou a produção de etanol (THOMAS et al., 1996). Neste mesmo estudo, a fermentação do caldo de cana enriquecido com melaço com (34-35% p/v) de açúcares a 30°C produziu 15,8% (v/v) de etanol em 48h. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da suplementação nitrogenada nos parâmetros fermentativos de mostos com alta concentração de açúcares, 30 e 35°Brix em caldo de cana concentrado, utilizando linhagens de levedura utilizadas em processos industriais, PE-2 e CAT-1.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas da Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, ESALQ/USP.

A metodologia utilizada neste trabalho visou se aproximar o máximo possível do processo utilizado nas indústrias brasileiras, assim todas as etapas realizadas foram similares ao processo industrial, para tal as fermentações não foram realizadas em total assepsia pelo, os ciclos foram realizados com as células provenientes do ciclo anterior, e a alimentação das fermentações foi gradativa.

#### **3.1 Microrganismo e preparo do inóculo**

As leveduras PE-2 e CAT-1 foram gentilmente fornecidas pela empresa LNF Latino Americana. A hidratação foi realizada incubando 3 g de levedura em 20 mL de H<sub>2</sub>O a 30°C por 15 min. Após centrifugação a 850g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e as células no sedimento foram utilizadas como inóculo.

#### **3.2 Preparo do mosto**

A cana-de-açúcar usada foi a variedade SP83-2487 proveniente do departamento de Agroindústria e Nutrição da ESALQ. O caldo foi extraído em moenda de um terno, filtrado em algodão para retirada de bagacilhos e concentrado até 32°Brix (fase I) ou 37°Brix (fase II) por evaporação mediante aquecimento. Após resfriamento, o material foi filtrado novamente em algodão para remoção dos resíduos formados pelo aquecimento do caldo (borras) e esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm por 30 min. As amostras foram armazenadas a 10 °C para posterior utilização. No momento do ensaio, o caldo concentrado foi diluído com água destilada para a obtenção do mosto a 25°, 30° ou 35° Brix.

#### **3.3 Ensaio de Fermentação**

O mosto de fermentação, caldo de cana concentrado, (100 mL) foi adicionado a 5 mL água destilada ou de solução nutriente de nitrogênio, para obter a concentração final de 0,96 g L<sup>-1</sup> (16 mM) de uréia ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO) ou 3,218 g/L (24mM) de fosfato de amônio dibásico ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Esta mistura foi realizada em tubos de centrífuga de 150 mL em triplicata. Ao inóculo inicial foram adicionados 20 mL de hora a hora até a obtenção dos 100 mL. O inóculo foi adicionado de forma a obter uma concentração celular de 10<sup>8</sup> células/mL de mosto. Os tubos foram incubados a

30°C, sob agitação orbital a 60 rpm, durante 24 h. A fermentação foi monitorada periodicamente, mediante pesagens em balança modelo B-TEC-4100, para o acompanhamento do desprendimento de CO<sub>2</sub>. No fim de cada ciclo fermentativo de 24 h, os tubos foram centrifugados a 850g por 10 min em centrífuga Damon/IEC PR-6000 e o sobrenadante foi armazenado a -4°C para as análises posteriores. As células no sedimento foram re-utilizadas como inóculo para o ciclo fermentativo seguinte. Para cada condição de cultura foram realizados 6 ciclos consecutivos, a massa úmida foi o remanescente pesado depois de retirado o sobrenadante da centrifugação.

### **3.4 Análises**

#### **3.4.1 Análise da viabilidade celular**

A viabilidade celular da levedura foi determinada no início de cada ciclo de fermentação pelo método da coloração com eritrosina (CALDAS, 1998). Este método é o mais utilizado em usinas de açúcar e álcool e baseia-se na coloração das células com as proteínas inativas ou em fase de inativação com o vermelho de eritrosina, deixando as células viáveis incolores. Para isto, 100 µL de amostra foram diluídos em 900 µL de água destilada e adicionados 150 µL de corante vermelho de eritrosina. Após homogeneização, 10 µL da mistura foram transferidos para Câmara de Neubauer e, com auxílio do microscópio ótico, foram realizadas as contagens das células viáveis e inviáveis. O resultado da viabilidade celular foi apresentado em porcentagem em relação à população total de células.

#### **3.4.2 Análises físico-químicas**

(i) A concentração de etanol do vinho foi quantificada por densitometria em densímetro digital Anton Paar 4500, após destilação das amostras por arraste de vapor em destilador Tecnal TE-012.

(ii) A concentração de açúcares totais do caldo foi determinada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por cromatografia de troca iônica, num cromatógrafo DIONEX (modelo DX300; Sunnydale, CA, USA) equipado com coluna CarboPack PA-1, e utilizando como fase móvel NaOH (100 mmol/L) e fluxo de 0,9 mL/min. As amostras, para injeção no cromatógrafo, foram diluídas e filtradas com um filtro com membrana de 0,22 µm (Millipore SLFG025LS).

(iii) A concentração de nitrogênio assimilável (NA) do caldo e do vinho foi determinada colorimetricamente pelo método da ninidrina (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 1987, adaptado por ABERNATHY; PEDDING; STARCHER, 2009), utilizando glicina como padrão.

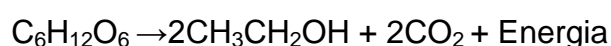
(iv) Para quantificar o glicerol no meio fermentativo, 1,5 mL de meio foram centrifugados a 5204 g durante 2 min para separar a massa celular, e 750 µL do sobrenadante foram tratados com 2% (v/v) de ácido perclórico por 30 min, com o objetivo de desnaturar qualquer proteína presente no meio. A seguir, a mistura foi centrifugada a 15294 g a 4°C durante 10 min e todas as amostras foram filtradas em filtros 0,2 µm (Millipore). A quantificação foi realizada por cromatografia líquida (HPLC), em cromatógrafo Gilson equipado com uma coluna Merck Polysphere AO KC Cat. nº 51270, a 50°C e usando como fase móvel ácido sulfúrico a 0,05 N com um fluxo de 0,5 mL/min (LAGES; LUCAS 1995, 1997).

### 3.5 Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey, dentro de um delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições por bloco com grau de significância de 5% (PIMENTEL-GOMES; GARCIA, 2002). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa Statistica (Statistica-StatSoft).

### 3.6 Cálculo do Rendimento e Produtividade

O consumo de nitrogênio foi estimado pela diferença entre a concentração no tempo inicial e tempo final de cada ciclo fermentativo. Nesse mesmo ponto experimental, o rendimento da produção etanol foi calculado considerando o teor alcoólico e o total de açúcar consumido após o final da fermentação conforme a equação clássica de Gay-Lussac (MCWILLIAMS; PETERSON, 1957):



De acordo com esta equação, 180 g de glicose deveriam originar 92 g de etanol, ou seja, um rendimento de 51,1g ou 64,75mL etanol por 100g de glucose consumida (CHEN; CHOU, 1993):

$$\textit{Recuperação de etanol (teórica)} = \textit{total de açúcar fermentável} \times 0,64$$



Desta forma, a eficiência da fermentação será estimada de acordo com:

$$\text{Eficiência da fermentação} = \frac{\text{Recuperação de etanol real (mL)}}{\text{Recuperação de etanol teórica (mL)}} \times 100$$

A produtividade em etanol apresentada consiste assim na percentagem de etanol produzido em relação ao tempo de duração do ciclo fermentativo (CHEN; CHOU, 1993):

$$\text{Produtividade} = \text{Eficiência da fermentação (\%)} / \text{duração do ciclo (h)}$$

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo desta tese foi estudar a suplementação nitrogenada do mosto de caldo de cana para obtenção de uma fermentação do tipo *Very High Gravity*, de grande interesse a nível industrial. Para isto, optou-se por tentar reproduzir, o mais próximo possível, as condições industriais, utilizando (i) as linhagens industriais mais empregadas na indústria sucro-alcooleira no Brasil, PE-2 e CAT-1; (ii) o inóculo preparado com a levedura liofilizada de origem comercial; (iii) 6 ciclos consecutivos com reutilização da biomassa de um ciclo fermentativo para inocular o seguinte, e (iv) o caldo de cana concentrado termicamente, sem adição de melaço. O mosto assim obtido continha aproximadamente 25, 30 ou 35 °Brix em termos de concentração de sólidos solúveis, ou 257 g L<sup>-1</sup>, 306 g L<sup>-1</sup> e 367 g L<sup>-1</sup> em valores médios de açúcar presente nos mostos iniciais, respectivamente.

A suplementação nitrogenada foi realizada com a repetição de ciclos fermentativos na presença de 16 mM de ureia ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO) (JONES; INGLEDEW, 1994a). Esta concentração de ureia permitiu aumentar a produção de etanol em ±3% a partir de mosto cervejeiro concentrado a 36,5%, diminuindo para metade o tempo necessário para a exaustão da fonte de carbono a 30°C (JONES; INGLEDEW, 1994a). Em alternativa, foi usada outra fonte de nitrogênio, o fosfato de amônio, a uma concentração superior, 24mM, à semelhança do que foi feito com sulfato de amônio por (ARRIZON; GSCHAEDLER, 2007).

As fermentações foram monitorizadas por análises cromatográficas para determinar o consumo de sacarose indiretamente através do consumo de glicose e a produção de etanol. Ao final de cada ciclo fermentativo foram avaliadas (i) a viabilidade celular, (ii) a massa úmida (biomassa), (iii) a concentração de etanol e (iv) a concentração de nitrogênio total assimilável. As análises da concentração de açúcar (v) foram realizadas ao final do 2º, 4º e 6º ciclo fermentativo. Além destas, a produção de glicerol foi quantificada ao longo do 1º ciclo da fermentação com a linhagem CAT-1 a 30 °Brix, como medida indireta da capacidade da levedura em resistir ao elevado stress osmótico a que as células são submetidas durante as fermentações em mosto VHG. Os resultados estão apresentados para cada linhagem e cada grau Brix separadamente.

## **4.1 Estudos realizados com a linhagem PE-2**

### **4.1.1 Mosto concentrado a 25 °Brix**

O desprendimento de CO<sub>2</sub> durante a fermentação em mosto a 25 °Brix pela linhagem PE-2 em cada ciclo fermentativo está apresentado na Figura 10 (Tabela suplementar S1 - Anexo). As fermentações foram feitas em paralelo sem e com suplementação azotada, usando as concentrações acima referidas de fosfato de amônio ou ureia. A medição da taxa de CO<sub>2</sub> liberada durante a fermentação dá um valor indireto da produção de etanol. Durante o 1º ciclo fermentativo a PE-2 não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os três mostos até 6 h de cultivo (Figura 9; Tabela S1). As diferenças começaram a ser evidentes a partir das 8 h (Tabela S1) e, ao fim de 24 h (Figura 9), o mosto suplementado com ureia apresentou taxa de liberação de CO<sub>2</sub> mais elevada, indicando maior produção de etanol. A diferença estatística observada entre os tratamentos confirma este resultado, já que foram obtidos 11,3% (v/v) de etanol no tratamento com fosfato de amônio, 10,7% (v/v) no tratamento com ureia, comparativamente a 9,88% (v/v) obtido no tratamento controle (Tabela 1).

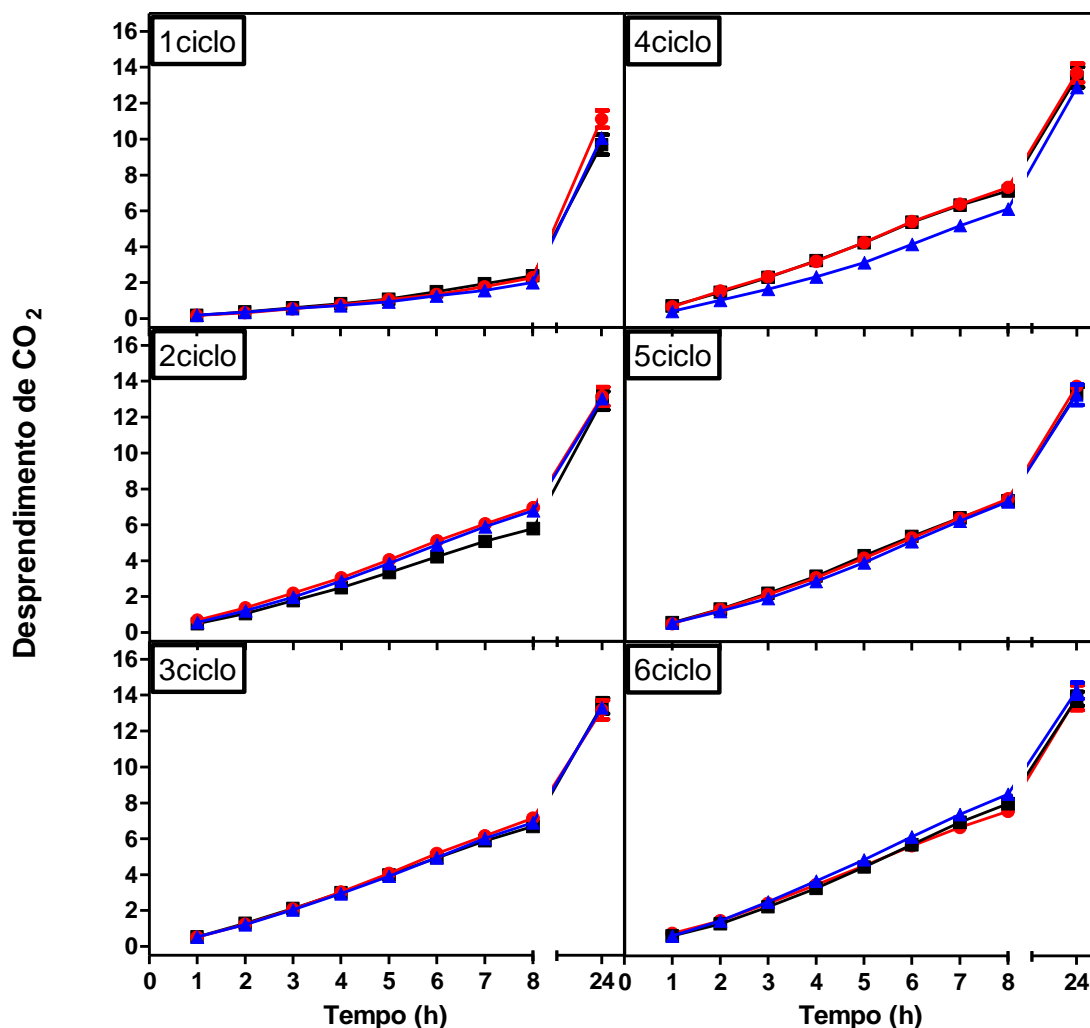


Figura 9 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura PE-2 em mosto concentrado a 25° Brix a 30°C durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■).

Ao contrário, no 2º ciclo as diferenças entre os mostos suplementados e o controle observam-se mais cedo, a partir de 3 h de fermentação (Tabela S1). A diferença de mais de 1 g de peso das culturas corresponde a um desprendimento de mais de 15% de CO<sub>2</sub>. Esta concentração corresponde a 14,3% (v/v) de etanol produzido no mosto suplementado com ureia no final de 24 h (Tabela 1). O comportamento da fermentação nos demais ciclos em mosto concentrado a 25 °Brix foi semelhante em qualquer das duas formas de suplementação nitrogenada (Figura 9; Tabela S1).

Tabela 1 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação de mosto a 25°Brix pela linhagem PE-2 a 30°C ao final de cada ciclo fermentativo de 24 h

<b>Ciclo fermentativo</b>	<b>Controle<sup>1</sup></b>	<b>Ureia<sup>2</sup></b>	<b>Fosfato<sup>2</sup></b>
1	9,88 cC	11,27 aB	10,69 bB
2	13,79 bB	14,29 aA	13,92 abA
3	14,43 aA	14,22 abA	13,94 bA
4	14,45 aA	14,10 aA	14,29 aA
5	14,40 aA	14,12 abA	13,89 bA
6	14,43 aA	13,94 bA	14,16 abA

1 mosto sem suplementação 2 mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo (5% significancia) Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (5% significancia)

Apesar disso, no 4º ciclo observa-se uma taxa de desprendimento de CO<sub>2</sub> menor estatisticamente significativa no mosto suplementado com fosfato de amônio. Apesar disso, a quantidade de etanol produzida não diminuiu concomitantemente (Tabela 1). Este comportamento aparentemente atípico, porque não segue a diretamente a equação de Gay-Lussac, poderá ter sido causado pela diminuição da viabilidade celular observada após o 3º ciclo - 51,9% em comparação com 56,1% e 55,1% dos mostos em ureia e controle respectivamente (Figura 10A).

Os resultados obtidos ao longo do tempo em cada ciclo fermentativo até às 24 h mostram um grande incremento quantitativo após as 8 h de fermentação (Figura 9). Neste trabalho não foi analisado o tempo necessário para exaurir a fonte de carbono (JONES; INGLEDEW, 1994). É possível que nas diferentes condições, a concentração máxima de etanol descrita na Tabela 1, tenha demorado tempos diferentes a ser atingida. Isso poderá ter implicações na viabilidade da cultura que permaneça horas na situação de estresse extremo que constitui a mistura fermentativa contendo elevada concentração de etanol.

Em todos os tratamentos foi observada subsequentemente ao 4º ciclo uma recuperação transitória de viabilidade, menos acentuada no controle. Existem duas hipóteses que podem explicar este fato: (1) perante condições tão adversas a levedura terá sofrido mutações que lhe permitem um desempenho melhor, ou, (2) poderia existir, no inóculo inicial, mais do que uma linhagem, sendo uma mais resistente que a outra.

Os valores de massa úmida obtida no final de cada ciclo fermentativo não seguem o mesmo padrão de evolução ao longo dos ciclos fermentativos (Figura 10B). A massa úmida aumenta apesar da viabilidade celular diminuir (Figura 10B). Isto indica que houve multiplicação celular em cada ciclo, mas também há morte celular, pelo que a massa úmida é constituída por uma elevada quantidade de biomassa morta, maior para os ciclos mais avançados. Isso é particularmente verdade para os mostos suplementados, tal como já tinha sido sugerido na literatura (LAOPAIBOON et al., 2009).

A variação da viabilidade celular no decorrer dos ciclos pode estar ligada às características dos mostos, como foi observado por LAOPAIBOON et al. (2009), para quem a suplementação com uma fonte de nitrogênio diminuiu a perda de viabilidade auxiliando na produção de biomassa. O aumento da biomassa observado em todas as fermentações suplementadas pode estar relacionado com as vias de regulação do fosfato. Na presença de altas concentrações de fosfato de amônio os transportadores Pho87 e Pho90 promovem o transporte de baixa afinidade de fosfato para o interior da célula, fazendo aumentar a concentração intracelular de P (CONRAD, 2014). Este aumento faz desencadear a ativação do complexo Pho85, que fosforila o ativador Pho4 que desta forma permanece no citosol e não promove ativação da transcrição. Outra consequência é a ativação da ciclina Cln3 que auxilia o início da fase G1 promovendo a multiplicação celular. Pelo contrário, na ausência de abundância do fosfato de amônio, que se verifica no meio suplementado com ureia, e mais ainda no controle, a quantidade de P intracelular será pequena sendo a proteína transportadora de P funcional a Pho84 (CONRAD, 2014). Consequentemente os níveis de inositol pirofosfato aumentam, o complexo Pho85 é inibido, e com isto a ciclina Cln3 é desfosforilada e a fase G1 suspensa não havendo divisão celular. Deste modo, a quantidade de biomassa produzida deverá ser menor.

As necessidades de fosfato de amônio das células são supridas pelo consumo de fosfato de amônio inorgânico do meio (LJUNGDAHL et al., 2012). O fosfato de amônio consumido pode ser utilizado para incorporação da maior parte dos constituintes da célula, como sendo fosfolípidos, ácidos nucleicos e proteínas, e é também necessário para muitas reações de trans-fosforilação em intermediários no metabolismo (BERTRAM et al., 2000). A concentração de fosfato de amônio livre é geralmente mantida a níveis baixos. Somente quando as células mudam do metabolismo fermentativo para o metabolismo respiratório em resposta à quantidade

de glicose presente no meio é que existe uma flutuação dinâmica do fosfato de amônio da célula (CONRAD, 2014). Simultaneamente, produziu-se mais biomassa e menos etanol (Tabela 1 e Figura 10).

Kaffman et al. (1998) afirmam que a levedura *S. cerevisiae* na presença de fosfato de amônio extracelular ativam o complexo Pho80-Pho85 e fosforila a transcrição do fator Pho4, resultando na sua exportação do núcleo. Como verificado pelo resultado da biomassa (Figura 10) existe uma síntese intensa de aminoácidos, assim e sabendo de antemão que os nucleótidos de purina são moléculas abundantes, a sua síntese leva a um consumo significativo de fosfato de amônio (PINSON et al., 2009). Para cada nucleotídeo de purina (ATP, GTP, dATP e dGTP) sintetizado na célula, requer a assimilação de 10 átomos de carbono assimilados do meio extracelular. Metade dos carbonos que constituem o nucleotídeo da purina são derivados de 5-fosforibosil- $\alpha$ (PRPP), uma forma ativa da ribose-5-fosfato de amônio, que é derivada da glicólise, portanto deriva das fontes carbono (LUNT; VAN DER HEIDEN, 2011).

No caso em estudo, a viabilidade descrita ao logo dos ciclos para cada tipo de mosto diminui visivelmente. Quando se compara a diferença entre o T0 e o T6 em cada condição, verifica-se que a suplementação com fosfato de amônio promove uma redução de 71,9% para 52,4%, comparada com o mosto controle que só reduziu no mesmo período de 70,6% para 50,0%. No entanto, a biomassa total em cada mosto, quantificada pela massa úmida, aumentou muito de T0 para T6, muito em particular no caso da suplementação com fosfato de amônio (Figura 10 B). Este aumento de quantidade de biomassa total (Figura 10 B) com concomitante aumento da fracção morta (Figura 10 A) faz com que os valores de biomassa viva presentes em T0 e em T6 sofram uma variação de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta \text{viabilidade} = [\text{viabilidade } (\%)_{T6} \times \text{massa úmida } (\% \text{ p/v})_{T6}] - [\text{viabilidade } (\%)_{T0} \times \text{massa úmida } (\% \text{ p/v})_{T0}]$$

Essa variação foi maior no caso do mosto tratado com fosfato de amônio do que no mosto controle, 4,96 e 1,80 % (p/v), respectivamente. Este valor pode indicar que no T6 apesar da diminuição da viabilidade (Figura 10 A) há mais células vivas a produzir etanol quando há fosfato de amônio no meio.

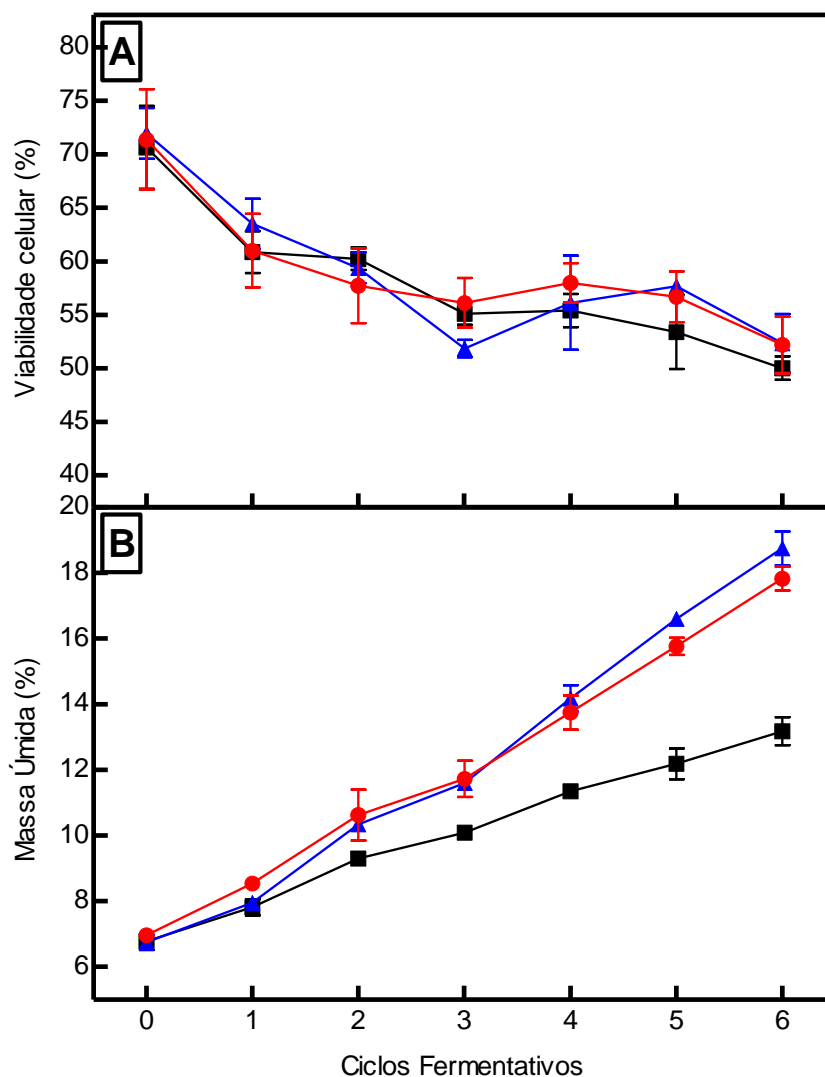


Figura 10 -Viabilidade (A) e Massa Úmida (B) da levedura PE-2 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 25° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

A análise da quantidade de nitrogênio presente no final de cada ciclo fermentativo foi feita espectrofotometricamente por coloração por ninidrina que apenas se liga a nitrogênio amoniacal (CALDAS, 1998). Desta forma, o método só mede uma parte do nitrogênio disponível em cada mosto. Muito em particular no caso dos mostos suplementados com ureia, o método fica muito aquém de medir a totalidade de nitrogênio presente já que não a detecta. Os resultados na Figura 12 são por isso apenas indicativos. Verificou-se que durante o 1º ciclo o consumo da fonte de nitrogênio foi quase total em todos os mostos. Nos ciclos subsequentes, observa-se um decréscimo do consumo traduzido por um excedente de nitrogênio,



mais acentuado nos mostos suplementados. A razão subjacente à ausência de consumo poderá ter a ver com a presença de biomassa morta – que aumenta em cada ciclo e é detectada, essa sim, pelo método utilizado – e que pode constituir uma fonte de nutrientes nitrogenados, contribuindo para uma possível repressão do consumo de nitrogénio molecular.

No global, a produção de etanol a 25 °Brix, não sofreu melhorias significativas pela suplementação nitrogenada, apesar deste ser consumido em cada ciclo. A única diferença observada foi um ligeiro aumento na produção de etanol nos primeiros 2 ciclos fermentativos (Tabela 1).

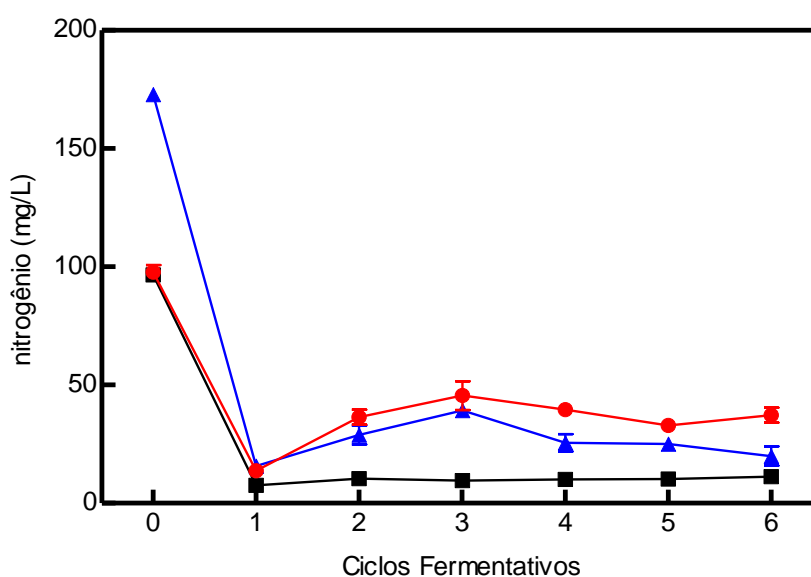


Figura 11 - Nitrogênio no meio da linhagem PE-2 durante fermentação em mosto concentrado a 25° Brix a 30°C, em 6 ciclos sucessivos suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

#### 4.1.2 Mosto concentrado a 30 °Brix

A linhagem PE-2 foi cultivada em mosto a 30 °Brix reproduzindo as condições acima utilizadas. O etanol produzido nos 6 ciclos analisados está apresentado na Tabela 2. Os valores do correspondente desprendimento de CO<sub>2</sub> encontram-se na Figura 13 e Tabelas S2 e S4. Estes valores, ao contrário dos cultivos em 25 °Brix que só apresentavam diferenças estatisticamente significativas até ao 4º ciclo (Tabela S1), são significativamente diferentes até ao fim do 6º ciclo (Tabelas S3), à exceção do 5º ciclo, razão pela qual os resultados correspondentes não estão incluídos nas tabelas.

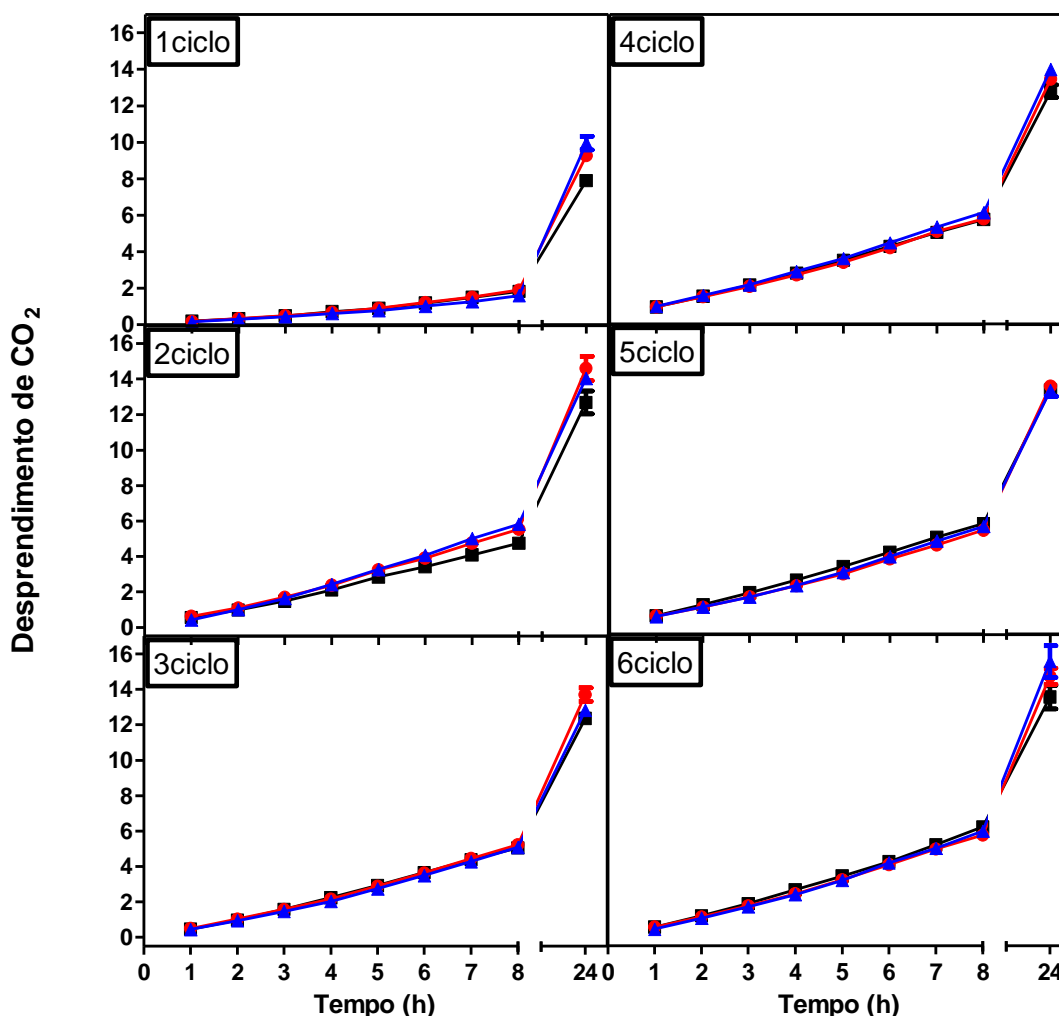


Figura 12 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura PE-2 em mosto concentrado a 30° Brix a 30°C durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■).

O etanol produzido nos tratamentos com suplementação nitrogenada foi superior (Tabela 2) ao mosto controle, não sendo possível distinguir entre a influência das duas fontes nitrogenadas nesta produção. Ao contrário do que foi observado a 25 °Brix, neste caso, a suplementação nitrogenada induziu um maior desprendimento de CO<sub>2</sub> concomitante a uma maior produção de etanol em relação ao mosto controle. No entanto, a comparação dos dados correspondentes à suplementação com ureia ou fosfato de amônio entre si, já apresenta alguma discrepância entre a quantidade de CO<sub>2</sub> desprendido e a quantidade de etanol produzido. Um exemplo disso são os resultados do fim do ciclo 4 – ver Tabelas 2 e S3.

Nos ciclos fermentativos 3 e 4 (Tabelas S2 e S3) o comportamento foi semelhante nos diferentes tratamentos, não havendo diferença nas 8 primeiras h de

fermentação. No final das 24 h a suplementação com ureia e com fosfato de amônio apresentaram um desprendimento de CO<sub>2</sub> estatisticamente superior. A produção de etanol foi concomitante com o desprendimento de CO<sub>2</sub> (Tabela 2). No 6º ciclo fermentativo (Tabela S3) não existe diferença entre os vários tratamentos durante as 8 primeiras horas, mas no final das 24 h de fermentação o mosto com fosfato de amônio apresentou maior desprendimento de CO<sub>2</sub>. Em resumo, os resultados obtidos ao longo do tempo em cada ciclo fermentativo até às 24 h mostram na Figura 12, tal como já se tinha observado para as culturas em 25 °Brix (Figura 9), um grande incremento quantitativo após as 8 h de fermentação que como discutida acima poderá ter implicações na viabilidade da cultura.

Tabela 2 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação de mosto a 30°Brix pela linhagem PE-2 após 24 h de cada ciclo fermentativo

Ciclo	Controle <sup>1</sup>	Ureia <sup>2</sup>	Fosfato <sup>2</sup>
1	8,02 bE	9,72 aD	9,55 aD
2	12,34 bD	14,63 aC	14,67 aB
3	13,22 cC	14,29 aC	13,80 bC
4	14,14 bB	15,22 aB	14,44 bB
5	14,97 bA	15,32 abAB	15,78 aA
6	14,99 bA	15,82 aA	15,84 aA

1 mosto sem suplementação 2 mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo (5% significancia) Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (5% significancia)

Tal como foi feito para os mostos a 25 °Brix, quando se comparou a diferença entre o T0 e o T6 em cada condição de cultivo, verificou-se que a suplementação com fosfato de amônio promoveu uma redução da viabilidade de 71,3% para 44,5%, comparada com o mosto controle que só reduziu no mesmo período de 77,3% para 52,5% (Figura 13). No mesmo período, a indexação ao peso úmido, mostrou que a variação entre T0 e o T6 na quantidade de biomassa viva foi de 1,85 e 1,51 % (p/v), respectivamente para mosto tratado com fosfato de amônio e mosto controle.

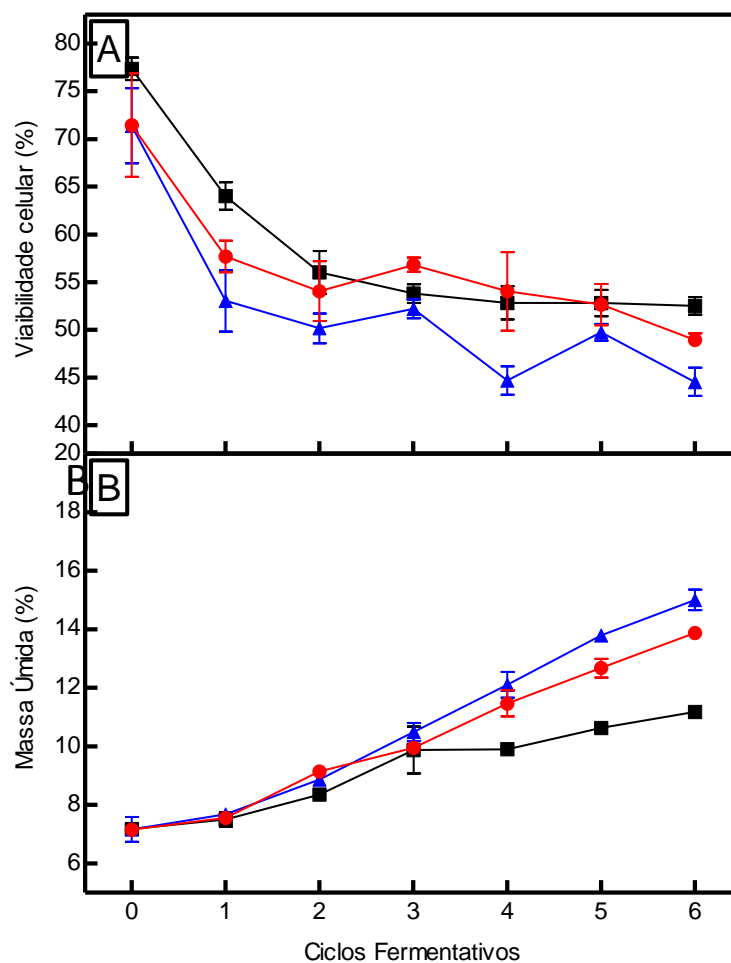


Figura 13 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura PE-2 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 30° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

No que diz respeito ao nitrogênio no meio fermentativo, e com o devido cuidado na interpretação destes resultados devido à metodologia empregada (ver acima), verifica-se que o tratamento controle foi aquele em que se observou maior consumo total de nitrogênio. Além disso, o padrão de evolução do consumo seguiu a mesma curva observada a 25 °Brix (Figura 11), ou seja, muito acentuada no 1° ciclo, seguida de um pequeno aumento exceto no controle (Figura 14). A transitoriedade deste aumento foi observada para o mosto tratado com fosfato de amônio, mas não no tratamento com ureia (Figura 15).

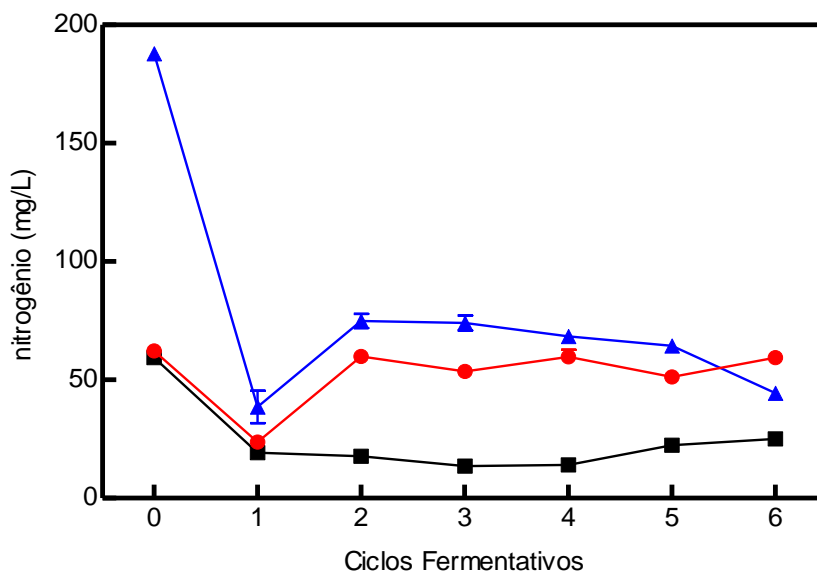


Figura 14 - Nitrogênio no meio da linhagem PE-2 durante fermentação em mosto concentrado a 30° Brix a 30°C, em 6 ciclos sucessivos suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

Em resumo, a linhagem PE-2 em mosto a 30 °Brix suplementado com fosfato de amônio ou com ureia produziu em média, respectivamente 15,84 e 15,82%(v/v) de etanol, comparativamente ao mosto controle que produziu em média apenas 14,99% (v/v) (Tabela 2).

#### 4.1.3 Mosto concentrado a 35 °Brix.

Os resultados obtidos durante fermentação da linhagem PE-2 em mosto concentrado a 35 °Brix permitiram verificar que esta extrema concentração de substrato fermentável não permite o mesmo desempenho que a 30 ou 25 °Brix. O etanol produzido em qualquer dos três tipos de mosto foi ligeiramente menor que nos casos anteriores (Tabela 3) tendência que foi acompanhada, desta vez, pelo desprendimento de CO<sub>2</sub> (Tabel S4 e S5).

Ao longo do tempo em cada ciclo, o desprendimento de CO<sub>2</sub> apresentou uma variação idêntica aos casos anteriores. No final do 1º ciclo fermentativo os dois tratamentos com suplementação nitrogenada apresentaram um desprendimento de CO<sub>2</sub> superior ao do controle, sendo no final das 24 h a suplementação com fosfato de amônio superior ao tratamento com ureia (Tabela S4). A produção média de etanol no primeiro ciclo acompanhou a desprendimento de CO<sub>2</sub>, o tratamento com fosfato de amônio produziu 8,49% (v/v), o tratamento com ureia produziu 6,96% (v/v) e o tratamento controle, produziu 6,22% (v/v) (Tabela 3).

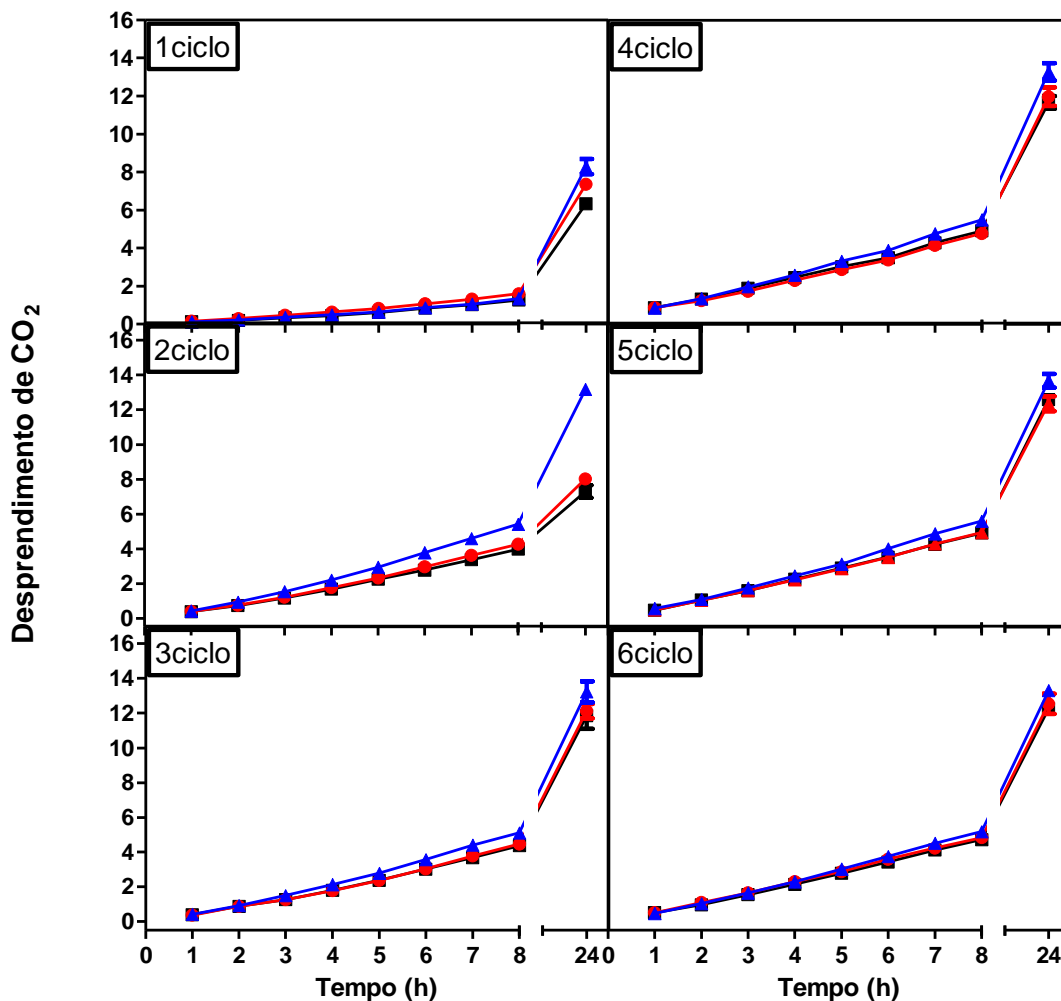


Figura 15 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura PE-2 em mosto concentrado a 35° Brix a 30°C durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■).

No 2º ciclo o mosto suplementado com fosfato de amônio apresentou um desprendimento de CO<sub>2</sub> superior desde a segunda hora de fermentação (Tabela S4); este comportamento se manteve até ao final da fermentação. Os outros dois tratamentos tiveram um comportamento semelhante. No segundo ciclo a produção de etanol, em média, obtida nos diferentes tratamentos foi de: 14,1% (v/v) no tratamento com fosfato de amônio, 11,6% (v/v) em ureia e 10,70% (v/v) no tratamento controle (Tabela 3). No 4º, 5º e 6º ciclos fermentativos, mais uma vez, a suplementação com fosfato de amônio se destacou no desprendimento de CO<sub>2</sub> a partir da sexta hora e manteve-se até o final das 24 h (Tabela S5), enquanto que a produção de etanol foi maior no caso da suplementação com fosfato de amônio (Tabela 3).

Tabela 3 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação da linhagem PE-2 em mosto a 35 °Brix, após 24 de cada ciclo fermentativo

Ciclo	Controle <sup>1</sup>	Ureia <sup>2</sup>	Fosfato <sup>2</sup>
1	6,22 cE	6,96 bD	8,49 aD
2	10,70 cD	11,64 bC	14,06 aBC
3	11,73 cC	12,52 bB	13,84 aC
4	12,64 bB	12,96 bAB	14,46 aAB
5	13,25 bA	13,23 bA	14,68 aA
6	12,95 bAB	12,77 bAB	14,20 aABC

1 mosto sem suplementação 2 mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo (5% significancia) Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (5% significancia)

No 6º ciclo fermentativo no final das 24 h, a linhagem PE-2, no mosto a 35 °Brix suplementado com fosfato de amônio, apresentou um desprendimento de CO<sub>2</sub> superior aos demais. O controle e o tratamento com ureia liberaram uma quantidade semelhante de CO<sub>2</sub> e a concomitante produção de etanol, que não diferiu estatisticamente ao longo das 24 h de fermentação (Tabela S5). Estes resultados sugerem que ao fim de vários ciclos as fermentações têm tendência para se tornarem semelhantes. Nos seis ciclos pode-se verificar que a suplementação nitrogenada, em particular com fosfato de amônio, teve uma influência positiva no desprendimento de CO<sub>2</sub> e, logo, na produção de etanol.

A suplementação nitrogenada não introduziu diferenças significativas na evolução da viabilidade celular durante os 6 ciclos fermentativos, que no seu geral mostraram menor sobrevivência da cultura (Figura 16A). Além disso, a quantidade de biomassa estimada por peso úmido foi inferior aos ensaios realizados a 25 e 30 °Brix (Figura 16B), apesar desta ter sido superior no mosto suplementado com fosfato de amônio. A massa úmida passou de 4,9 %(p/v) no início para 4,5 %(p/v) no final da fermentação no mosto controle, e 5,85 %(p/v) no meio suplementado com fosfato de amônio. A viabilidade da levedura é muito afetada pela pressão osmótica (JONES; INGLEDEW, 1994). Esta é provocada em condições fermentativas pelo efeito conjunto dos açúcares e do etanol. Os açúcares funcionam como agentes de redução da  $a_w$  do meio, e o etanol como agente redutor da  $a_w$ , mas também como agente caotrópico. Desta forma é expectável que a 35 °Brix haja mais letalidade que nas restantes condições de cultivo, independentemente da suplementação nitrogenada.

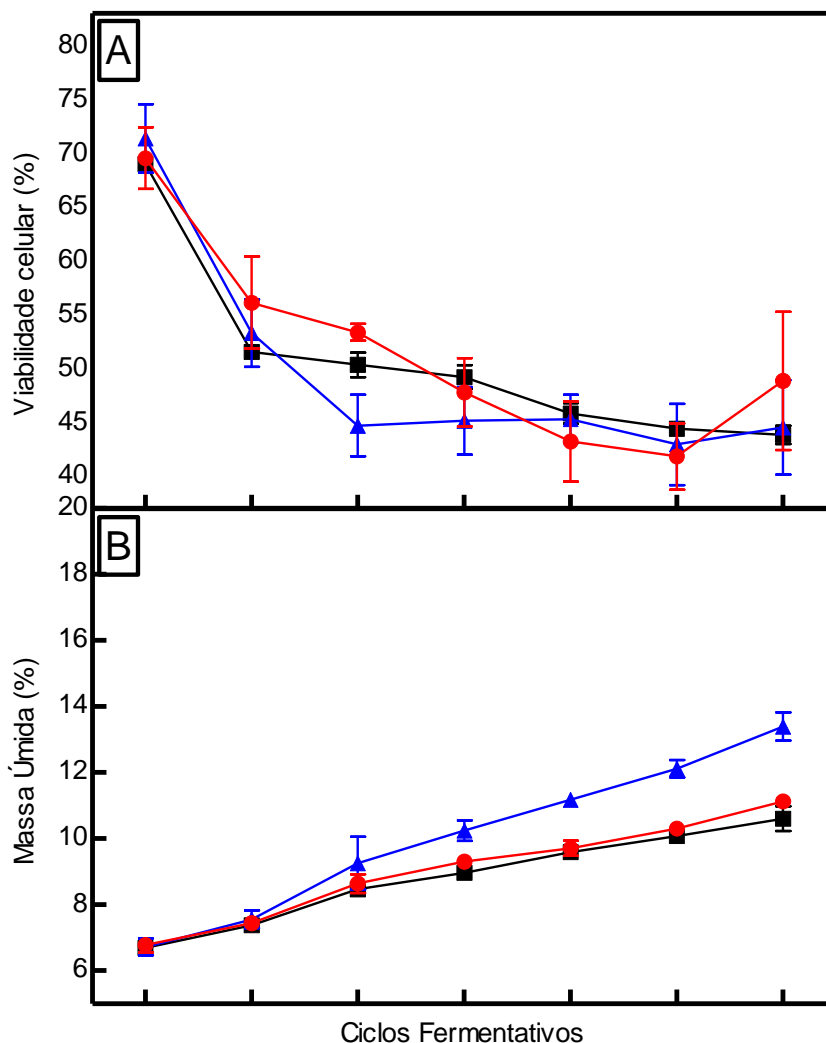


Figura 16 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura PE-2 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 35° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

No que diz respeito ao consumo de nitrogênio, nos ensaios a 35 °Brix, o comportamento dos mostos tratado com fosfato de amônio e controle foi, em tudo, semelhante aos ensaios a 25 e 30 °Brix. O controle foi o tratamento que menos deixou nitrogênio no mosto. Já o tratamento com fosfato de amônio foi o tratamento que apresentou um maior consumo de nitrogênio face aos valores iniciais (Figura 17). A partir do 4° ciclo, o meio suplementado com ureia apresentou valores negativos de consumo de nitrogênio, o que só pode ser explicado pela redução observada no mesmo tempo na viabilidade celular (Figura 16A). No 5° e 6° ciclos, o



consumo de nitrogênio foi superior no caso do meio suplementado com fosfato de amônio. De um modo geral, o padrão de variação das concentrações de nitrogênio ao longo dos 6 ciclos, só foi igual aos casos anteriores para o mosto suplementado com fosfato de amônio, os restantes (ureia e controle) mantiveram ao longo de todo o crescimento valores pouco diferentes no T0.

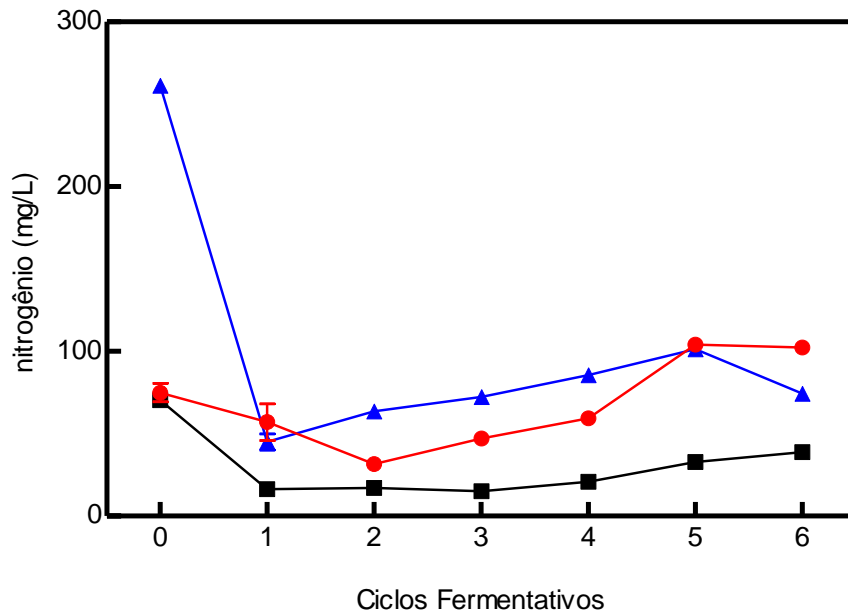


Figura 17 - Nitrogênio no meio da linhagem PE-2 durante fermentação de mosto concentrado a 35° Brix em 30°C, em 6 ciclos sucessivos, suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

#### 4.1.4 Rendimento fermentativo e produtividade em mosto concentrado a 25, 30 e 35°Brix

A adaptabilidade e resistência da levedura podem ser caracterizadas de várias formas, desde a sua capacidade para produzir etanol até suportar as condições de stress. Isto pode ser analisado mediante a quantificação de, além da produção de etanol, da biomassa produzida bem como a viabilidade. No tratamento com fosfato de amônio, o rendimento baixa muito, o que nos mostra que para atingir valores de álcool superiores aos demais, isto acarreta num consumo maior de açúcar, não sendo este convertido totalmente em etanol. Os resultados obtidos durante cultivo da linhagem PE-2, nas diferentes condições, foram utilizados para os cálculos do rendimento fermentativo e produtividade (Tabela 4).

Tabela 4 - Rendimento fermentativo e produtividade da linhagem PE-2 nos mostos a 25, 30 e 35°Brix sem ou com suplementação com ureia (16 mM) ou fosfato de amônio (24 mM), após 2, 4 e 6° ciclo fermentativo de 24h

Concentração do mosto (°Brix)	Tratamento	Ciclo fermentativo	Açúcar consumido (g/L)	Etanol produzido (% v/v)	Etanol produzido (% p/v)	Produtividade (g/L/h)	Rendimento fermentativo (%)
25	controle	2	250,33	13,79	10,87	3,52	84,96
		4	248,59	14,45	11,41	4,15	89,80
		6	253,00	14,43	11,39	4,26	88,09
	fosfato	2	255,11	13,92	11,00	4,62	84,36
		4	255,00	14,29	11,29	4,76	86,63
		6	255,12	14,16	11,17	4,67	85,67
	ureia	2	255,09	14,29	11,30	3,83	86,67
		4	254,96	14,10	11,13	4,27	85,41
		6	255,15	13,94	11,01	4,19	84,43
30	controle	2	203,22	12,34	9,73	4,05	93,68
		4	233,02	14,14	11,11	4,63	93,28
		6	247,65	14,99	11,83	4,93	93,46
	fosfato	2	251,98	14,67	11,57	4,82	89,84
		4	243,92	14,44	11,40	4,75	91,44
		6	269,85	15,84	12,50	5,21	90,63
	ureia	2	239,99	12,34	9,74	4,06	79,41
		4	239,57	14,14	11,11	4,63	90,73
		6	256,47	14,99	11,83	4,93	90,25
35	controle	2	197,40	10,70	8,44	3,52	83,65
		4	232,40	12,64	9,96	4,15	83,85
		6	233,90	12,95	10,23	4,26	85,57
	fosfato	2	277,99	14,06	11,09	4,62	78,05
		4	291,61	14,46	11,42	4,76	76,62
		6	278,82	14,20	11,21	4,67	78,66
	ureia	2	214,76	11,64	9,18	3,83	83,63
		4	237,04	12,96	10,24	4,27	84,52
		6	241,70	12,77	10,06	4,19	81,44

O rendimento fermentativo da linhagem PE-2 em mosto contendo 25 ou 35 °Brix foi menor que 90% (Tabela 4). Em mosto 30 °Brix foram observados os melhores resultados, em que o tratamento controle proporcionou resultados acima de 93% de rendimento, idêntico ao rendimento teórico de uma fermentação industrial (AMORIM et al., 2011). No entanto, a nível de produtividade, calculada como:

$$\text{Produtividade (g/L/h)} = \frac{\text{Etanol produzido (\% (p/v))} \times 10}{\text{tempo (h)}}$$

foi o mosto suplementado com fosfato de amônio que apresentou melhor valor que o controle, 5,21 em comparação com 4,93 g/L/h. Os valores de rendimento (Tabela 4), calculados como:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Etanol produzido (\% (p/v))} \times 1000}{\text{Glicose consumida (g)} \times 0,5111^*}$$

\*proporção derivada da fórmula de Gay-Lussac – ver Material e Métodos.

corresponderam concomitantemente a um aumento substancial da quantidade total de etanol produzido (Figura 18). Este resultado não foi observado nos mostos suplementados com ureia.

Os resultados (Tabela 4) sugerem ainda que existem variações no comportamento da linhagem PE-2 de ciclo para ciclo fermentativo, e a tendência, como mencionado acima, é de que as diferenças diminuem ao final dos 6 ciclos e os resultados se aproximam uns dos outros. No mosto a 25 °Brix foi obtido um rendimento de 86,7% (Tabela 4) para o tratamento com ureia nos dois primeiros ciclos. Já no 4° e no 6° ciclos, o mosto controle tem um desempenho superior aos demais sendo maior a concentração de etanol produzido. Outro fator relevante é o consumo de açúcar que não ultrapassou os 250 g/L. Este ponto poderá ser de alguma forma melhorado no futuro, para que se possa aumentar também a produção de etanol e o desempenho da levedura. Genericamente, verificou-se que para produzir mais etanol com PE-2 é vantajoso suplementar o mosto com fosfato de amônio de amônio, e que se pode usar esta levedura para fermentar mostos com 30 °Brix.

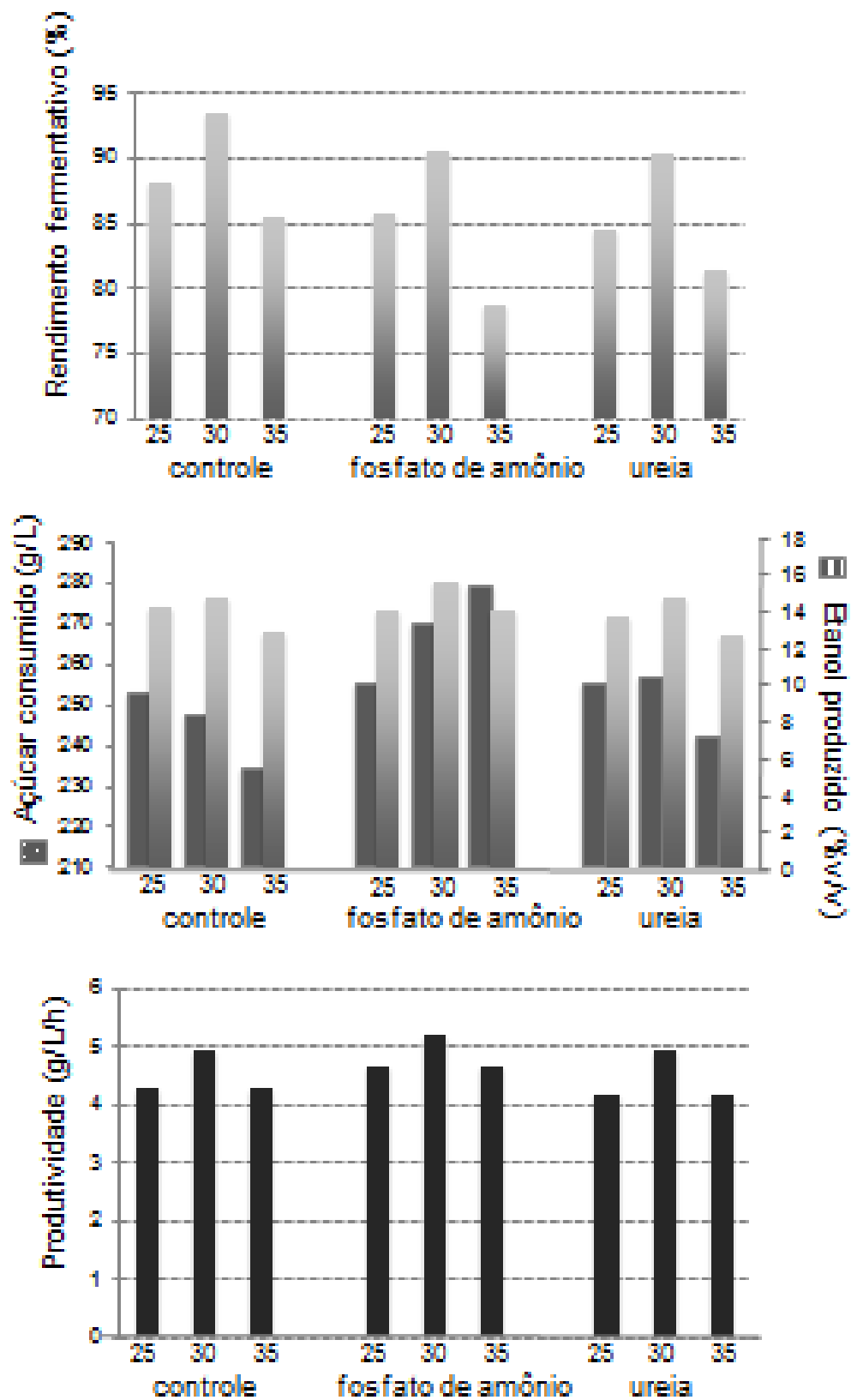


Figura 18 - Rendimento e produtividade durante fermentação da linhagem PE-2 em mosto a 25, 30 e 35°Brix

## 4.2 Estudos realizados com a linhagem CAT-1

### 4.2.1 Mosto concentrado a 25 °Brix

Os resultados obtidos durante a fermentação com a linhagem CAT-1 no mosto a 25 °Brix apresentaram resultados com uma taxa de liberação de CO<sub>2</sub> que aumentou ao longo dos ciclos fermentativos de forma semelhante ao sucedido com a linhagem PE-2 (Figura 19). Durante o 1º ciclo só se observou diferenças estatisticamente significativas ao fim das 24 horas (Tabela 6; Figura 19). Ao contrário do que se verificou no caso da PE-2, estas diferenças seguiram de forma mais aproximada a equação Gay-Lussac, ou seja, o tratamento que mais etanol produziu foi também o tratamento que maior taxa de CO<sub>2</sub> liberou (Tabela S6; Tabela 5). A diferença entre a quantidade de etanol produzida foi estatisticamente significativa entre os tratamentos, sendo a suplementação em ureia o tratamento que maior produção obteve, seguido sucessivamente pelo tratamento com suplementação em fosfato de amônio e pelo controle. Ao fim do 1º ciclo foram produzidos respectivamente 13,50, 12,08 e 10,90% (v/v).

Diferentemente do que acontece no 1º ciclo em que só se verifica diferença estatística ao fim das 24h, no 2º ciclo existe diferença estatisticamente significativa a partir da segunda hora de fermentação entre os tratamentos suplementados com uma fonte nitrogenada e o controle (Tabela S6). O etanol produzido acompanhou mais uma vez a taxa de CO<sub>2</sub> liberada. Apesar disso, ao fim de 24 h (Tabelas S6 e Tabela 5) só o tratamento com ureia apresentou diferenças estatisticamente significativas nos valores de produção de etanol e liberação de CO<sub>2</sub>. Foi interessante observar que a produção de etanol melhorou sensivelmente do 1º ciclo para o 2º ciclo, passando de 13,50 para 15,11% (v/v) no tratamento suplementado com ureia e de 10,90% para 14,20% (v/v) no tratamento controle. Já no 3º ciclo fermentativo, observou-se o contrário, ou seja, a taxa de liberação de CO<sub>2</sub> foi maior no controle do que nos mostos suplementados, tendência que se manteve até ao 5º ciclo (Tabela 5). Finalmente, no 6º ciclo, observa-se um desfaseamento entre a liberação de CO<sub>2</sub> e a quantidade de etanol produzido, de modo que os resultados finais se aproximam dos anteriormente obtidos com a cepa PE-2 (Tabela S1). Neste ciclo, o controle (Tabela S7) mostrou diferença significativa em relação aos mostos suplementados, produzindo uma concentração de etanol (Tabela 5) de 15,15% (v/v) enquanto a suplementação nitrogenada com ureia e com fosfato de amônio produziram, respetivamente, 14,35% (v/v) e 14,10% (v/v). O facto de a liberação de CO<sub>2</sub> ter sido

menor no tratamento controle neste mesmo ciclo, poderá indicar que os açúcares estão a ser utilizados para a produção de biomassa ou de outros subprodutos em vez de etanol.

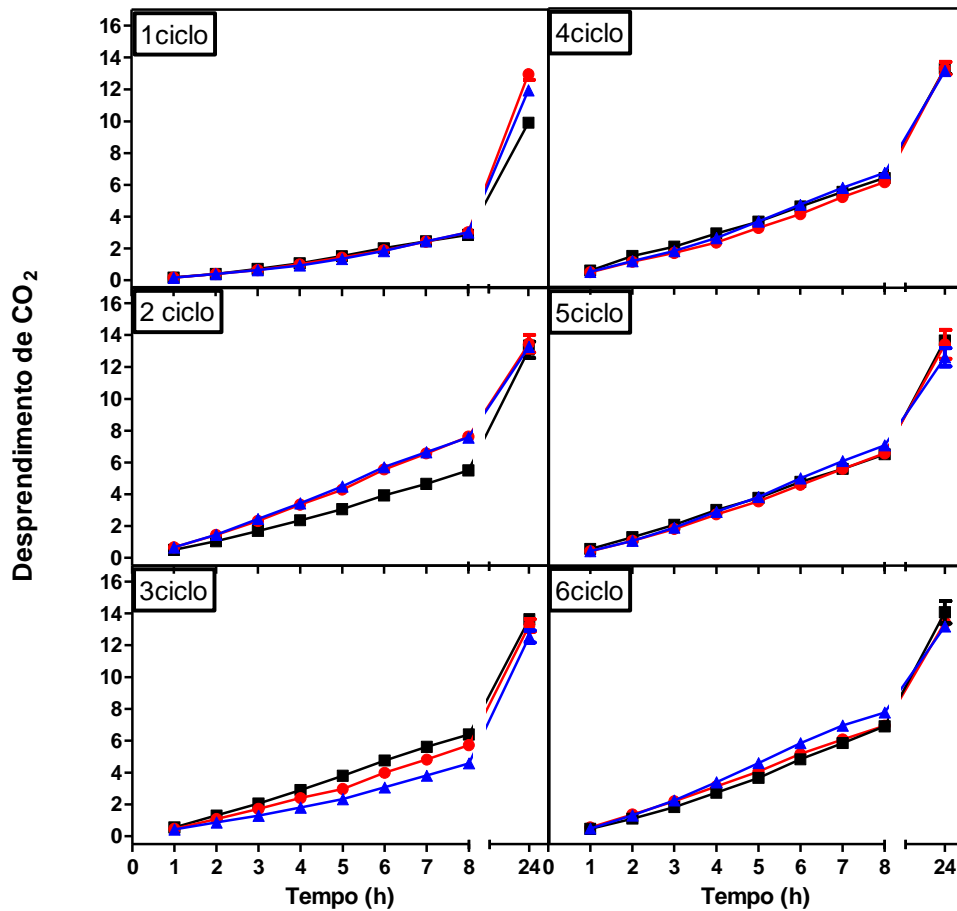


Figura 19 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura CAT-1 em mosto concentrado a 25° Brix a 30°C durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■).

Nas fermentações com a linhagem CAT-1 (Figura 21A e 21B), observou-se que desde o 1º ciclo a suplementação nitrogenada começou a induzir uma maior produção de massa úmida comparativamente ao controle. Por outro lado, devido às condições de elevada pressão osmótica criadas pela quantidade de sólidos solúveis e etanol, a viabilidade celular diminuiu de forma significativa logo no 1º ciclo (Figura 21B). A análise dos resultados sugere que a suplementação com uma fonte nitrogenada permite um aumento de viabilidade (Figura 21B) bem como da produção

de biomassa. De alguma forma estes resultados sugerem que o nitrogênio promove a adaptação das células a essas condições estressantes, permitindo através da promoção da síntese dos aminoácidos uma mais fácil multiplicação celular (MAGASANIK e KAISER, 2002). Além disso, tal como aconteceu com a PE-2 (ver 4.1.1), a viabilidade celular melhorou transitoriamente durante o 4º ciclo em todos os ensaios embora menos acentuadamente no controle.

Tabela 5 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação da linhagem CAT-1 em mosto concentrado a 25 °Brix nos 6 ciclos fermentativos, após 24 de cada ciclo

Ciclo	Controle	Ureia	Fosfato
1	10,90 cC	13,50 aB	12,08 bC
2	14,20 bB	15,11 aA	14,82 abA
3	15,20 aA	14,92 aA	13,53 bB
4	15,14 aA	14,88 aA	14,68 aA
5	15,07 aAB	14,96 aA	14,26 bAB
6	15,15 aA	14,35 bAB	14,07 bAB

1 mosto sem suplementação 2 mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo (5% significancia) Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (5% significancia)

Os valores de massa úmida obtida no final de cada ciclo fermentativo não seguiram o mesmo padrão de evolução ao longo dos ciclos fermentativos (Figura 21B). A massa úmida aumentou apesar da viabilidade celular ter diminuído (Figura 21B). Isto indica que em cada ciclo houve multiplicação celular, mas também houve morte, pelo que a massa úmida será constituída por uma elevada quantidade de biomassa morta, maior para os ciclos mais avançados. Isso é particularmente verdade para os mostos suplementados, tal como já tinha sido sugerido na literatura (LAOPAIBOON et al., 2009).

O nitrogênio amínico foi analisado para saber se a quantidade de nitrogênio do meio estaria aumentando ou reduzindo conforme a síntese de aminoácidos. Os resultados encontram-se na Figura 21. Os resultados de elevada biomassa apresentados anteriormente (Figura 20A) confirmam que a suplementação com uma fonte nitrogenada estimula a produção de células, pelo que o consumo de nitrogênio nessas condições deveria ter sido maior que no controle. No entanto, no 3º ciclo fermentativo, que é quando o controle passa a produzir mais etanol que os meios suplementados, observa-se nestes uma redução no consumo de nitrogênio. Este fenómeno é mais acentuado no caso da suplementação com ureia, em que a

quantidade de nitrogénio medida foi superior à que foi originalmente adicionada no meio (Fig....). Estes dados podem justificar a diminuição da produção de etanol que se verificou a partir do 3º ciclo quando comparado com o controle.

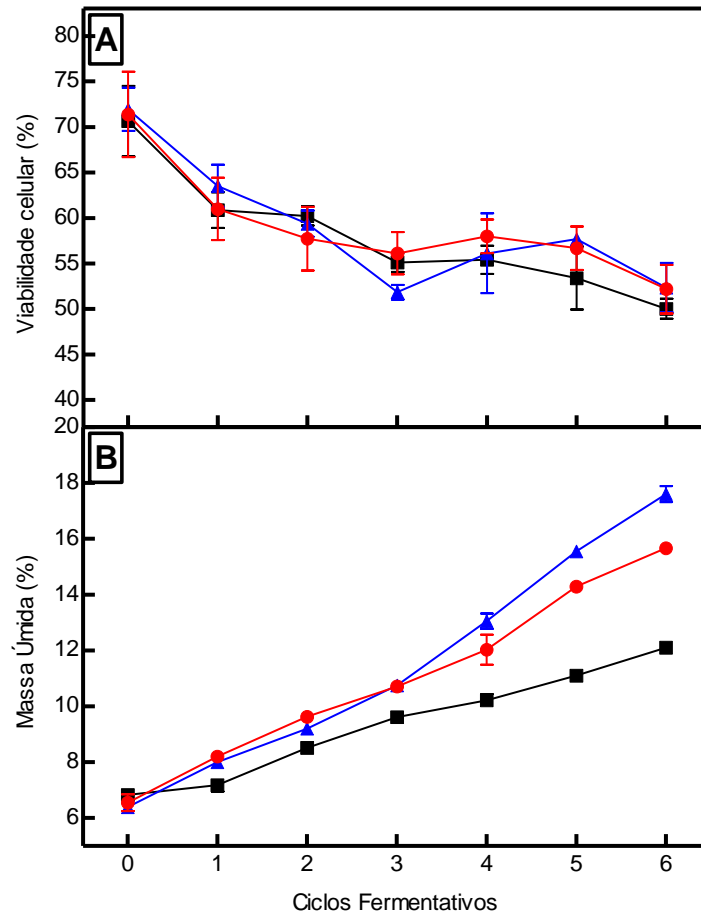


Figura 20 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura CAT-1 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 25° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

Os cálculos realizados para obter o valor da massa de células viáveis disponíveis para a fermentação – ver 4.1.1 – mostram que nos meios suplementados com fosfato de amônio o produto da massa úmida pela viabilidade no fim do 6º ciclo fermentativo (Figura 20) seria 8,30 g /100 mL. Este valor comparando com a massa úmida x viabilidade iniciais de 4,9 g /100 mL mostra aproximadamente 3x mais massa fermentativa. Neste sentido, pode-se dizer que a conversão teórica de açúcar em etanol foi menos eficiente, podendo de alguma forma explicar os resultados da Tabela 10. No caso do controle, o aumento de massa fermentativa foi apenas de aproximadamente 2x, ou seja, passou de 4,9 g /100 mL para 8,61 g /100



mL no final do 6º ciclo, decorrente da viabilidade que era de 71,1% com a massa úmida de 12,1%, e uma produção de etanol superior. Estes resultados sugerem que a 25º Brix na presença de fosfato de amônio, a massa de leveduras disponível para a fermentação seria maior permitindo mais produção de etanol.

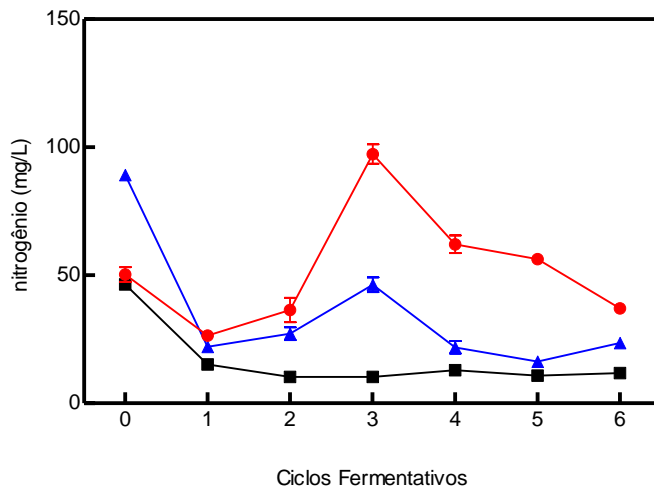


Figura 21- Nitrogênio no meio da linhagem CAT-1 durante fermentação em mosto concentrado a 25º Brix a 30°C, em 6 ciclos sucessivos suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

#### 4.2.2 Mosto concentrado a 30 °Brix

A linhagem CAT-1 quando cultivada em mosto concentrado a 30 °Brix teve um desempenho ainda melhor que a 25 °Brix.

O desprendimento de CO<sub>2</sub> representado nas (Tabelas S8 e S9) e Figura 22 foi maior que nas condições anteriores. No 1º ciclo fermentativo (Tabela S8) os mostos suplementados com uma fonte nitrogenada tiveram um desprendimento de CO<sub>2</sub> estatisticamente superior ao tratamento controle a partir da 4ª hora. Ao fim das 24 h os tratamentos suplementados com uma fonte nitrogenada apresentam uma quantidade de etanol estatisticamente superior ao tratamento controle (Tabela 6).

No 2º ciclo fermentativo (Tabela S8) as duas suplementações nitrogenadas mantiveram um comportamento semelhante ao 1º ciclo em relação ao tratamento controle, e destacaram-se na produção de gás carbônico a partir da 2ª hora, daí em diante até ao final do ciclo sempre se mantiveram com um desprendimento de CO<sub>2</sub> superior ao do controle, com predominância da suplementação com fosfato de amônio. Ao final das 24h a suplementação com ureia superou a suplementação com fosfato de amônio. A produção de etanol correspondeu aos resultados do

desprendimento de CO<sub>2</sub> em que a suplementação nitrogenada obteve 17,4% (v/v) e 15,3% (v/v), concentrações de etanol superiores aos obtidos por (THOMAS et al., 1996) ureia e fosfato de amônio respectivamente. O controle apresentou uma concentração de etanol de 12,1% (v/v) (Tabela 6). Ainda no 2º ciclo, ocorreu uma diminuição acentuada de viabilidade idêntica à verificada no mosto a 25 °Brix (Figura 23A). Esta queda abrupta teve um impacto importante no 3º ciclo onde se observa uma redução acentuada da quantidade de etanol produzido e concomitante CO<sub>2</sub> libertado (Tabela S8). Este comportamento das fermentações foi menos acentuado no mosto suplementado com ureia (Tabela S8). Neste caso, houve maior consumo de nitrogênio ao mesmo tempo que a produção de etanol e CO<sub>2</sub> diminuíram à reposição de células viáveis no mosto fermentativo (Figura 23B). Esta recuperação dá lugar à melhor produção de etanol verificada nestes meios a partir do 4º ciclo (Tabela 6). Nos ciclos 4 – 6, a liberação de CO<sub>2</sub> variou sempre de forma proporcional à produção de etanol e os valores foram sempre estatisticamente significativos (Tabela S9). A produção de etanol (Tabela 6) no fim do 6º ciclo foi de 12,9% (v/v) para o controle, 14,4% (v/v) para a suplementação com fosfato de amônio e 17,1% (v/v) para a suplementação com ureia. A suplementação com ureia apresentou assim melhores resultados de produção de etanol, seguida da suplementação de fosfato de amônio, e do controle.

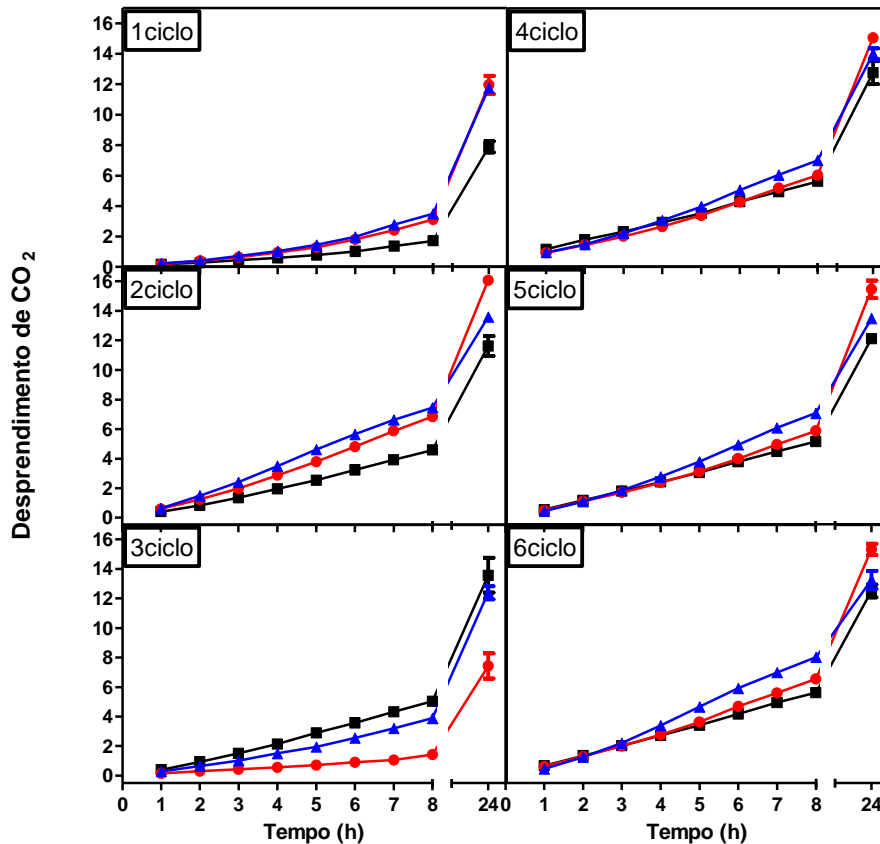


Figura 22 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura CAT-1 em mosto concentrado a 30° Brix a 30°C durante 24 horas em 6ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■).

A massa úmida obtida pela linhagem CAT-1 aumentou a partir do 3º ciclo (Figura 23B). Por seu lado, a viabilidade celular sofreu uma queda acentuada no 2º ciclo, recuperando transitoriamente no 3º ciclo, e voltando a diminuir em diante (Figura 23A). Esta queda significativa por parte dos tratamentos suplementados, poderá estar relacionada com a elevada concentração de etanol, obtida no 2º ciclo. Apesar destas oscilações, os mostos suplementados com uma fonte nitrogenada apresentaram no final dos seis ciclos um aumento significativo de massa úmida (Figura 23B). A perda de viabilidade pode estar ligada ao estresse osmótico como já foi referido anteriormente (Laopaiboon et al., 2009), e também à quantidade elevada de etanol produzido. A suplementação com uma fonte de nitrogênio no meio deverá auxiliar à produção de biomassa (Figura 23B). Os resultados de consumo de nitrogênio da linhagem CAT-1 no mosto a 30 °Brix estão apresentados na Figura 24. O controle apresentou um maior consumo de nitrogênio do 4º ciclo em diante, tendência essa que não foi seguida pela produção de etanol.

Tabela 6 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação da linhagem CAT-1 em mosto concentrado a 30 °Brix nos 6 ciclos fermentativos, após 24 de cada ciclo. Ensaio realizado em caldo de cana sem suplementação, ou suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato

<b>Ciclo</b>	<b>controle</b>	<b>Ureia</b>	<b>Fosfato</b>
1	7,82 bC	12,68 aD	12,87 aC
2	12,06 cB	17,44 aA	15,32 bA
3	13,19 aA	7,93 bE	12,96 aC
4	13,27 cA	16,09 aC	14,52 bB
5	12,82 cA	16,53 aBC	14,93 bAB
6	12,94 cA	17,10 aAB	14,39 bB

1 mosto sem suplementação 2 mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo (5% significância) Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (5% significância)

Tal como se verificou com as fermentações a 25 °Brix, a suplementação nitrogenada com fosfato de amônio a 30 °Brix mostrou uma produção de massa úmida no final dos 6 ciclos maior que os demais ensaios, produzindo mais do dobro da massa úmida inicial.

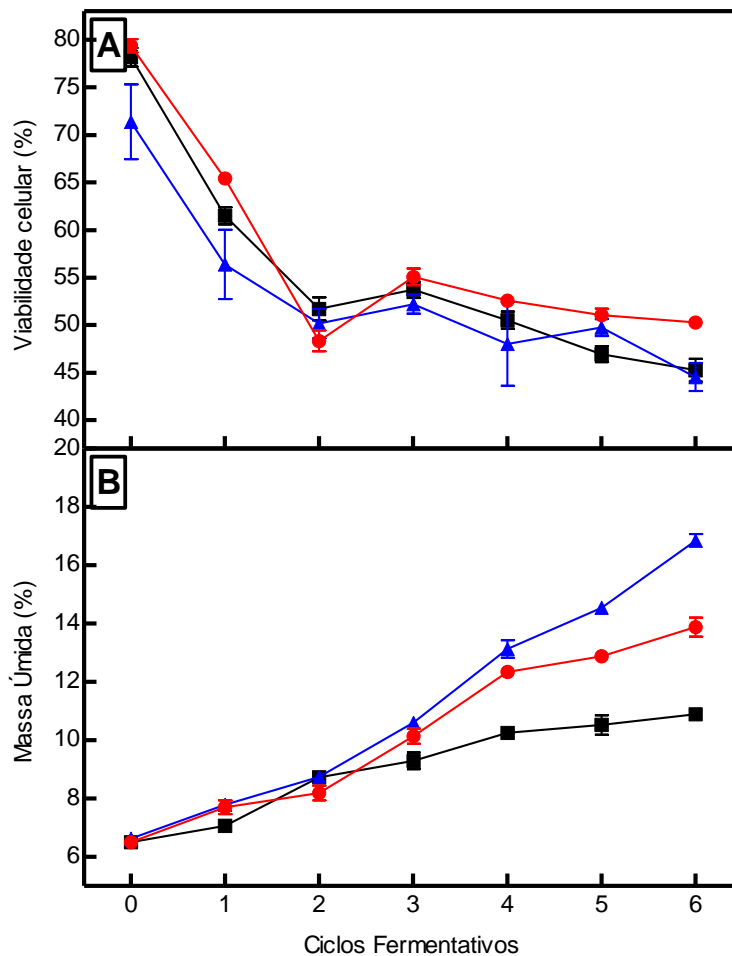


Figura 23 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura CAT-1 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 30° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

Aplicando o cálculo acima descrito (ver 4.1.1), a suplementação com fosfato de amônio teria, inicialmente, uma massa de leveduras viáveis de aproximadamente 6,63 g /100 mL e no final no 6º ciclo 10,28 g /100 mL. Já o controle que apresentou um valor médio inicial superior 6,50 g /100 mL de massa de leveduras viáveis terminou o 6º ciclo com uma massa de leveduras vivas de 6,21 g / 100 mL, ou seja, teve um crescimento inferior ao da suplementação com fosfato de amônio. Estes valores mostram um aumento de biomassa ativa em termos de fermentação menor que no caso das fermentações a 25 °Brix. Dado que a produção de etanol foi superior a 30° Brix, conclui-se que na fermentação do mosto concentrado a 30° Brix as células viáveis estão em menor quantidade mas produzem mais etanol.

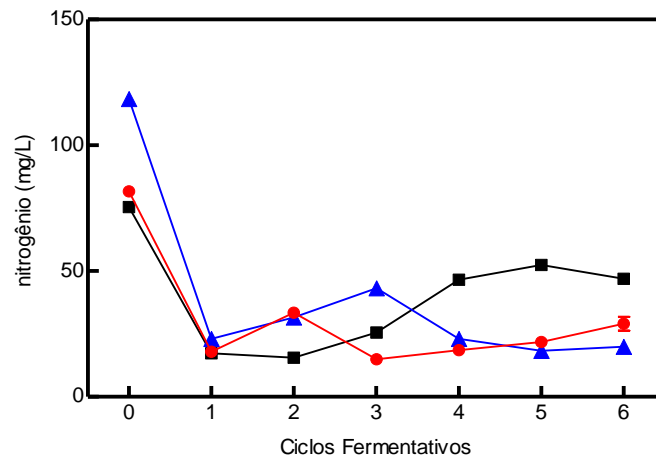


Figura 24 - Nitrogênio no meio da linhagem CAT-1 durante fermentação em mosto concentrado a 30° Brix a 30°C, em 6 ciclos sucessivos suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

#### 4.2.3 Mosto concentrado a 35 °Brix

Nestas condições fermentativas verificou-se novamente que a suplementação com fosfato de amônio apresentou uma produção de massa úmida total superior aos outros casos, a viabilidade das leveduras caiu de aproximadamente 75% no início do 1º ciclo para valores em torno de 50% (Figura 25A), existindo diferença estatística relevante entre a suplementação nitrogenada com fosfato de amônio e controle. A linhagem CAT-1, quando cultivada em mosto concentrado a 35°Brix mostrou que a produção de biomassa foi menor que nas outras concentrações Brix, bem como a sua viabilidade celular (Figura 25B). Este fato deve-se possivelmente à pressão osmótica exercida pela alta concentração de açúcares no meio acrescida das concentrações de etanol que foi sendo produzido.

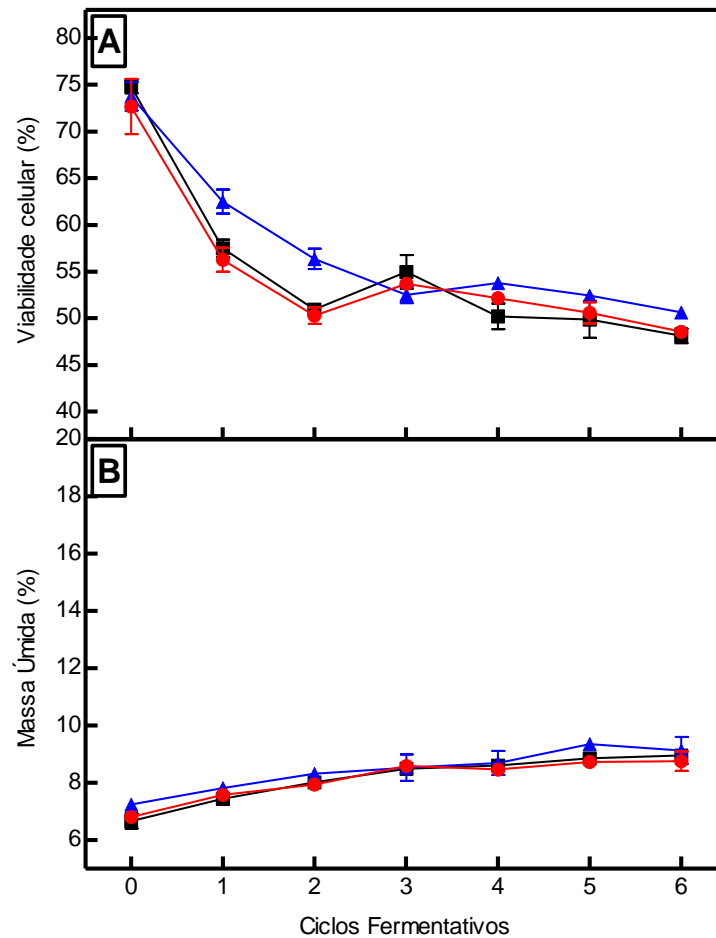


Figura 25 - Massa úmida (A) e Viabilidade celular (B) da levedura CAT-1 durante 6 ciclos de fermentação em mosto concentrado a 35° Brix, a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

O cálculo da massa de leveduras vivas (ver 4.1.1) permitiu ver que a suplementação nitrogenada auxiliou na produção de massa úmida viável. No início da fermentação a biomassa viva era de 6,67 g /100 mL e no final do 6º ciclo de 5,76 g /100 mL. No mosto suplementado com fosfato de amônio, no fim do 6º ciclo obteve-se 6,27 g /100 mL, um valor idêntico ao início da fermentação. Isso indica que a suplementação tem possivelmente um efeito protetor relativamente à pressão osmótica, mesmo que não se tenham atingido valores próximos dos que foram atingidos a 30 °Brix.

A levedura CAT-1 teve um desempenho, no mosto concentrado a 35 °Brix, abaixo do que seria esperado de acordo com a fórmula de Gay-Lussac. Na produção de CO<sub>2</sub> ao longo dos seis ciclos e as suplementações nitrogenadas não apresentou diferenças estatísticas significativas (Tabela S10).

A produção de etanol (Tabela 7) acompanhou a produção de CO<sub>2</sub> (Figura 26) apresentando diferença significativa no 1º ciclo em que o tratamento controle e a suplementação com ureia forma iguais, e o tratamento com fosfato foi estatisticamente inferior ao tratamento com ureia. Dos ciclos 2 - 5 não existiu diferença estatística entre os diversos tratamentos. No 6º ciclo a suplementação nitrogenada com fosfato de amônio foi estatisticamente diferente, produzindo uma 14,5% (v/v) de etanol comparativamente aos 13,9% (v/v) do controle e do meio com ureia (Tabela 7). Este valor é mais baixo que o máximo obtido a 30 °Brix ou mesmo a 25 °Brix, o que mostra que mesmo a suplementação nitrogenada nas condições experimentais aplicadas neste trabalho consegue permitir um desempenho fermentativo interessante.

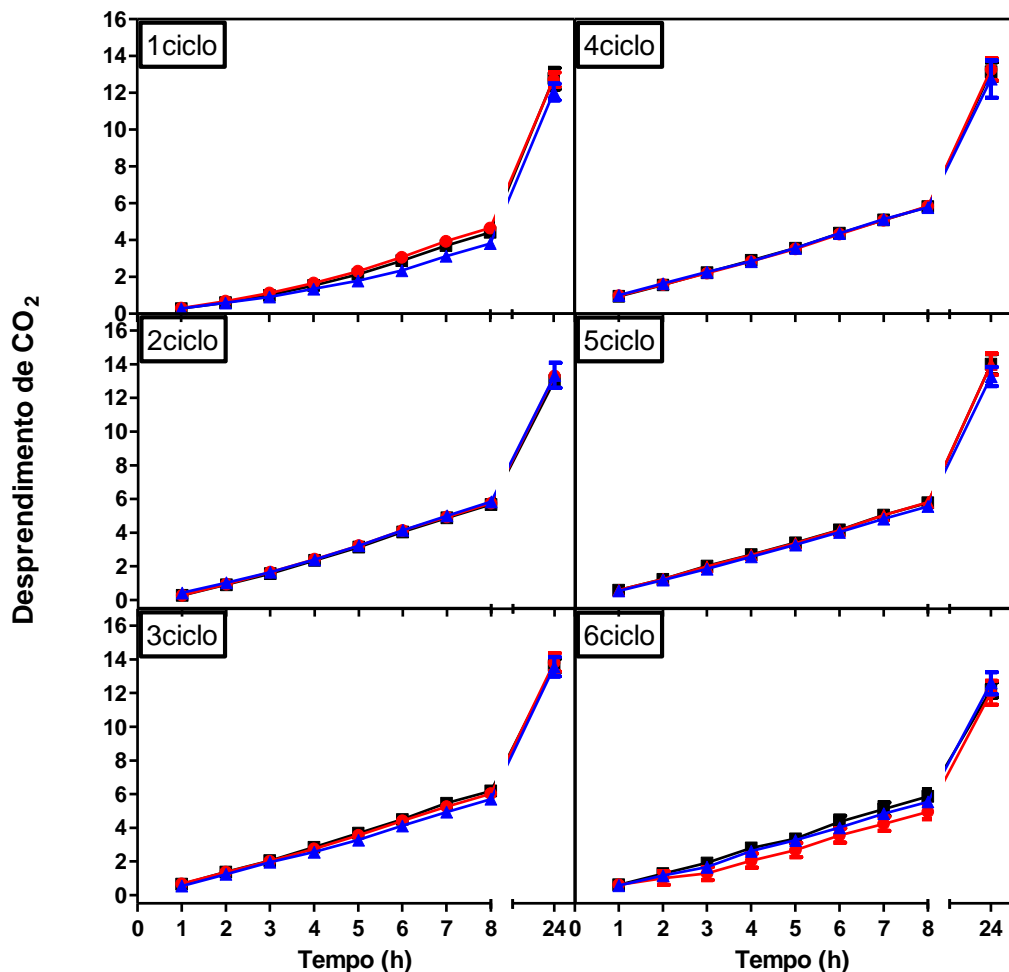


Figura 26 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> observado durante fermentação da levedura CAT-1 em mosto concentrado a 35º Brix a 30ºC durante 24 horas em 6 ciclos sucessivos e suplementado com fosfato (▲) ou ureia (●) e controle (■).



Tabela 7 - Etanol produzido % (v/v) durante a fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 35 °Brix nos 6 ciclos fermentativos, após 24 de cada ciclo

Ciclo	Controle	Ureia	Fosfato
1	13,21 abC	13,66 aB	13,09 bC
2	14,82 aA	14,91 aA	15,13aA
3	15,21 aA	14,81 aA	15,03 aAB
4	14,95 aA	14,88 aA	14,60 aAB
5	14,77 aA	14,72 aA	14,96 aAB
6	13,87 bB	13,89 bB	14,51 aB

1 mosto sem suplementação 2 mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo (5% significancia) Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (5% significancia)

#### 4.2.4 Rendimento fermentativo e produtividade em mosto concentrado a 25, 30 e 35° Brix

Os ensaios fermentativos realizados com a linhagem CAT-1 sugerem que o mosto tipo *Very High Gravity* (VHG) pode ser utilizado industrialmente. Todas as fermentações deste tipo são à partida economicamente interessantes porque permitem reduzir o consumo de água e de energia bem como de produção de vinhaça e outros efluentes por parte da indústria. Apesar disso, no presente trabalho encontraram-se algumas limitações ao processo VHG, mesmo usando a CAT-1. Uma delas consiste numa aparente limitação do consumo de açúcar nos 250 g/L para todas as fermentações à exceção do mosto com fosfato de amônio a 30 °Brix (Tabelas 8). Não há nenhuma referência na literatura que mencione este teto, e não se encontra justificativa plausível para a sua existência.

Pelos resultados obtidos pode verificar-se que no mosto a 25 °Brix existiria apenas necessidade de suplementação nos dois primeiros ciclos. Isto é comprovado pelos dados de rendimento fermentativo nestes ciclos dos mostos suplementados onde se atinge um rendimento de 95,5% (Tabela 8). Nos ciclos seguintes, pelos dados do controle, a levedura parece adaptar-se àquelas condições e não necessitar mais da suplementação, o que se pode inferir pela produtividade que é superior no controle em relação aos demais mostos (4,98 g/L/h). Naturalmente, a concentração

de etanol foi também superior nesses ciclos em que a produtividade foi maior, obtendo-se assim rendimentos acima de 94%.

A CAT-1 consome mais açúcar a 30 °Brix, porém este não é convertido em etanol e sim em biomassa, enquanto que a suplementação nitrogenada com ureia converteu de forma mais eficiente o açúcar em etanol, sendo esse o grande objetivo (Figura 27). O rendimento fermentativo da CAT-1 na concentração de 30 °Brix com exceção da suplementação nitrogenada com ureia, apresenta rendimentos fermentativos relativamente baixos (66 e 80%), comparativamente aos valores de 90% do tratamento suplementado com ureia. Estes rendimentos apresentam-se baixos porque o cálculo de rendimento utilizado direciona o açúcar para a conversão de etanol, como nesses tratamentos a produção de etanol foi abaixo do esperado teoricamente, tais rendimentos apresentam-se baixos.

A 30 °Brix verifica-se que a CAT-1 fica mais dependente da suplementação. Durante os três ciclos em que foi medido o açúcar remanescente (Tabela 8), o melhor desempenho para a fermentação observou-se com o mosto suplementado com ureia. Nestes casos, a produtividade em etanol foi, respetivamente, de 5,74, 5,29 e 5,63 g/L/h (Tabela 8). Como consequência, o rendimento fermentativo também acompanhou os valores da produtividade, obtendo-se valores médios de 90% de eficiência fermentativa (Tabela 8), mostrando assim que para uma fermentação com um mosto altamente concentrado, é viável a utilização da 16 mM de ureia como a forma de suplementação do caldo de cana para obter rendimentos industrialmente interessantes com a cepa industrial do bioetanol CAT-1. Pensando na aplicação prática deste processo, uma fermentação em dorna de 500.000 L teria de levar 112 kg de ureia, o que corresponde a valores de 2015 a  $\pm 433R\$,$  ou  $\pm 0,79R\$/m^3$  \* de etanol produzido, um custo irrelevante comparado com a poupança estimada pela concentração do caldo.

O que se pode verificar pelos dados apresentados na Tabela 18 é que quanto mais se aumenta a concentração de açúcar mais se sacrifica o rendimento fermentativo. Ainda assim, com 30 °Brix, a levedura consegue produzir valores de álcool elevados mesmo mantendo-se a duração do ciclo por 24 h. Na fermentação de mosto altamente concentrado a 35 °Brix, a linhagem CAT-1 produziu no 2º ciclo fermentativo suplementado com fosfato de amônio uma concentração de álcool de 15,1%. Como seria de esperar por estas serem condições de elevada adversidade, a produtividade mostrou-se bastante reduzida. Estes valores acompanham os

rendimentos fermentativos. Estes, poderão ser melhorados e aumentado o desempenho fermentativo da levedura, nomeadamente no que diz respeito ao aparente teto de 250 g/L de consumo de açúcar. A viabilidade da levedura e a produtividade em etanol poderão ser muito melhoradas. O presente trabalho, mais do que apresentar condições de fermentação ótimas, permitiu verificar que o processo é viável e pode ser usada uma das leveduras mais frequentes da indústria brasileira.

Tabela 8 - Rendimento fermentativo da linhagem CAT-1 nos mostos concentrado a 25, 30 e 35°Brix, nos 2°, 4° e 6° ciclos fermentativos. Ensaio realizados em caldo de cana - mosto concentrado a 25, 30 e 35 °Brix - a 30 °C, sem suplementação, ou suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, durante 24, em 6 ciclos sucessivos.

°Brix	Tratamento	Ciclo fermentativo	Açúcar consumido (g/L)	Etanol produzido (% v/v)	Etanol produzido (% p/v)	Produtividade (g/L/h)	Rendimento fermentativo (%)
25	controle	2	237,5	14,26	11,26	4,69	92,76
		4	245,4	15,14	11,94	4,98	95,19
		6	247,1	15,15	11,95	4,98	94,62
	fosfato	2	244,1	14,82	11,70	4,88	93,80
		4	242,8	14,68	11,57	4,82	93,25
		6	237,7	14,07	11,10	4,63	91,35
	ureia	2	244,1	15,11	11,92	4,97	95,54
		4	243,8	14,88	11,70	4,88	93,88
		6	244,1	14,35	11,33	4,72	90,81
30	controle	2	234,2	12,06	9,52	3,97	79,53
		4	253,0	13,27	10,47	4,36	80,96
		6	250,7	12,94	10,22	4,26	79,76
	fosfato	2	309,0	15,32	12,09	5,04	76,56
		4	307,6	14,52	11,46	4,78	72,88
		6	299,6	12,94	10,22	4,26	66,73
	ureia	2	294,6	17,44	13,77	5,74	91,45
		4	276,8	16,09	12,70	5,29	89,77
		6	289,2	17,10	13,50	5,63	91,32
35	controle	2	252,97	14,82	11,70	4,88	90,49
		4	257,95	14,95	11,80	4,92	89,50
		6	256,21	13,87	10,94	4,56	83,54
	fosfato	2	259,92	15,13	11,92	4,97	89,73
		4	258,77	14,60	11,50	4,79	86,95
		6	254,54	14,51	11,45	4,77	88,01
	ureia	2	250,13	14,91	11,77	4,90	92,07
		4	256,62	14,88	11,75	4,90	89,59
		6	258,70	13,89	10,97	4,57	82,97

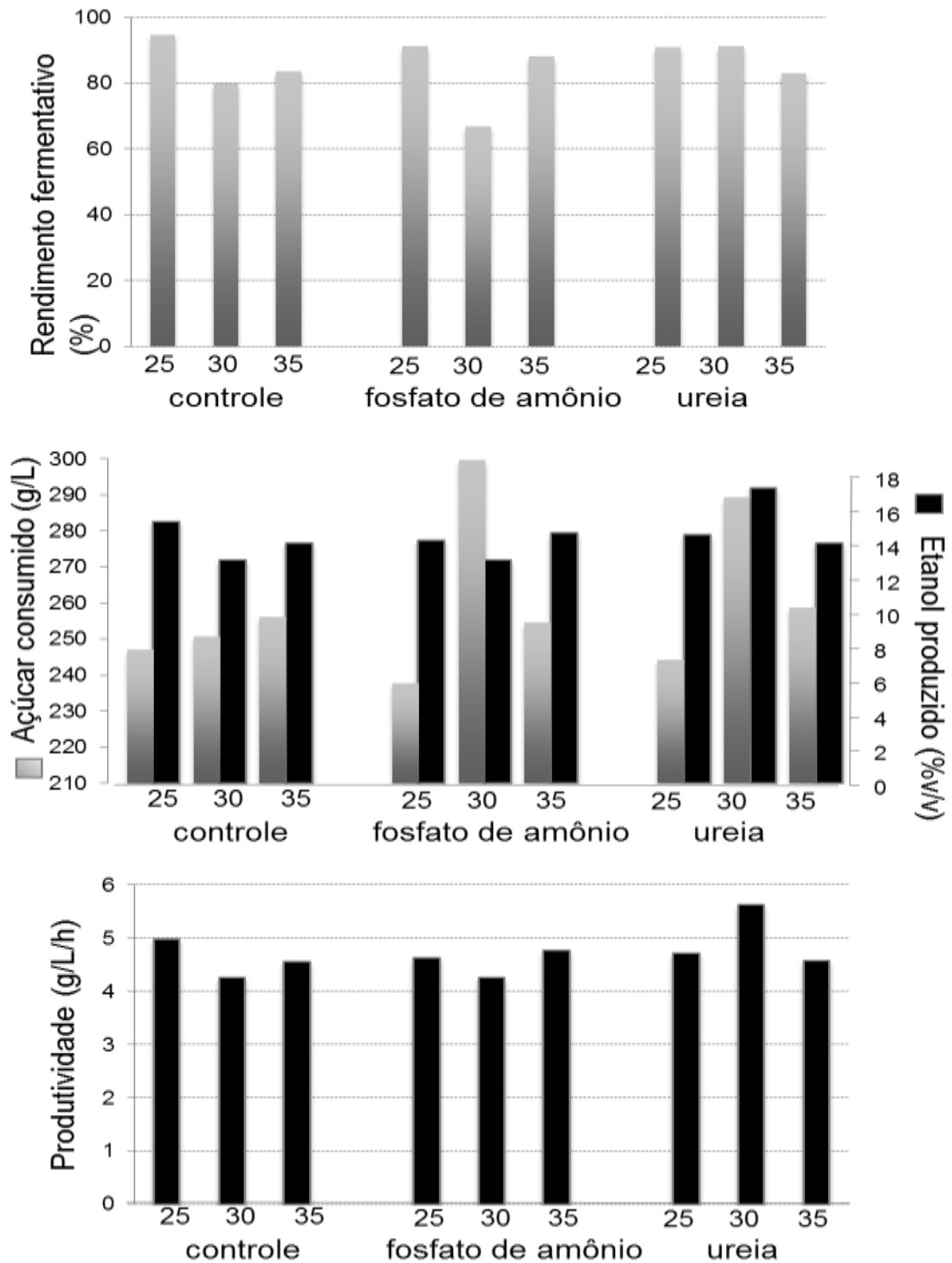


Figura 27 - Rendimento e produtividade durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 25, 30 e 35°Brix

#### **4.3 Estudos complementares de produção de glicerol durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto com 30 °Brix**

Devido aos resultados obtidos para a linhagem CAT-1 no mosto a 30 °Brix, foi realizado um novo ensaio para verificar a produção de glicerol durante o processo. A correlação entre o crescimento de células de levedura sob condições de estresse osmótico e produção de glicerol está muito bem documentada na literatura (para uma revisão ver HOHMANN, 2002). O glicerol tem o papel chave de osmolito na adaptação da célula de levedura à baixa atividade de água ( $a_w$ ) no meio de cultura. A acumulação intracelular de solutos compatíveis inertes (osmolitos) para ajustar a pressão osmótica do citosol é uma estratégia bem conservada (BURG; FERRARIS 2008). A adaptação molecular e metabólica à pressão osmótica é realizada através da via de sinalização HOG, uma via de transdução de sinal que regula a resposta ao estresse osmótico (BREWSTER et al., 1993). Esta via promove em condições de stress hiperosmótico a produção de glicerol a partir da dihidroxiacetona, desviando o fluxo glicolítico através da hiper-indução da Gpd1 (glicerol 3P desidrogenase) e da Gpp2 (glicerol 3P fosfatase) responsáveis pela síntese de glicerol (revisado por HOHMANN 2002). Adicionalmente, a retenção de glicerol é obtida mediante a combinação funcional de dois processos de retenção, o fechamento do canal Fps1, impedindo o efluxo de glicerol (TAMÁS et al., 1999), e a indução do transportador ativo de glicerol Stl1 que promove a entrada de glicerol do meio extracelular favorecendo a sua retenção contra o seu gradiente químico (FERREIRA et al., 2005). Deste modo, uma levedura sujeita a elevado stress osmótico, como é o caso das fermentações industriais em geral e das VHG em particular, mesmo que a sua viabilidade não seja drasticamente afetada, deverá acumular muito glicerol, o que a princípio se deverá traduzir por uma redução do rendimento de produção de etanol por desvio do fluxo glicolítico, e possivelmente por acumulação no meio de cultivo do excesso deste composto. No presente trabalho, verificou-se (Figuras 28 e 29) que a suplementação com uma fonte nitrogenada levou a uma produção maior de glicerol acumulado no meio extracelular. Em particular, no meio suplementado com fosfato de amônio, foi produzido aproximadamente mais 30% de glicerol que no meio suplementado com ureia, e mais 70% que no meio controle. Este aumento na produção de glicerol acompanhou a produção de biomassa.

As proporções verificadas para o glicerol extracelular (Figura 14) mantêm-se mais ou menos semelhantes a 30 °Brix. A síntese de aminoácidos “*de novo*” (ver

4.1.1) provoca um excesso de NADH, que tem que ser reoxidado pela formação de glicerol. O consumo de glicose e a formação de etanol bem como do glicerol estão diretamente relacionados com o crescimento e aumentam exponencialmente ao longo do tempo de fermentação (ALBERS et al., 1996) que também verificou que o etanol aumentava com a suplementação nitrogenada. A fonte nitrogenada influencia o crescimento da biomassa devido à necessidade que a célula tem de dispende a energia da utilização dessa fonte. A quantidade de açúcar no meio - abundante - faz com que a levedura produza mais biomassa, o que deriva, no caso das fermentações industriais, do necessário arejamento da cultura para que as leveduras suportem as condições do meio. Como consequência do aumento da quantidade de biomassa, é produzido mais NADH devido à síntese intensa de aminoácidos, e concomitantemente também mais glicerol como forma de compensação do potencial redox. Como referido anteriormente, esta ocorre a partir de uma forma ativa da ribose-5-fosfato de amônio, proveniente da glicose-6-P que é desviada para a via das Pentoses Fosfato. Devido à existência de fosfato de amônio extracelular, a glicose está sendo desviada para a síntese de nucleotídeos da purina como referido anteriormente, o que justifica uma produção superior de biomassa nos mostos suplementados com fosfato de amônio como foi observado (Figura 23). Ao mesmo tempo, a concentração interna de ortofosfato de amônio é crítica para resistência ao estresse osmótico e à proliferação celular (YORK, 2006).

A biomassa está relacionada, também, com a quantidade de glicerol produzida e excretada para o meio (Figura 22). A célula produz muito glicerol, exportando muito do que produz desde que não esteja em condições de estresse osmótico. Nesse caso acumula o necessário para contrapor turgor celular (BRUMM; HEBEDA, 1988). A produção de glicerol ocorre mediante um desvio do fluxo glicolítico (Figura 27) (LARSSON et al., 1998), que aumenta em condições de elevado stress como o das fermentações VHG, diminuindo o rendimento da fermentação. Como foi mencionado acima, culturas fermentativas de *S. cerevisiae* produzem glicerol para reoxidarem o excesso de NADH gerado durante a biossíntese dos aminoácidos e ácidos orgânicos. (van DIJKEN; SCHEFFERS, 1986; RIGOULET et al., 2004). Esta é razão pela qual o glicerol é o maior subproduto nos processos produtivos de etanol e do vinho. Consistentemente, um mutante sem os isôgenos que codificam a glicerol 3P desidrogenase mencionados a seguir ( $\Delta gpd1\Delta gpd2$ ) não estão aptos a crescer anaerobicamente (HOHMANN, 2002).

A suplementação nitrogenada com ureia auxiliou a produção da biomassa, mas em nada comprometeu a continuação da glicólise e da fermentação, originando uma quantidade superior de etanol (Figura 26). Já a suplementação com fosfato de amônio de amônio, levou a uma produção de biomassa superior à suplementação com ureia. Sabendo de antemão que o fósforo é uma macromolécula importante para a síntese de compostos celulares, os resultados obtidos com a produção de biomassa (Figura 12) são compreensíveis.

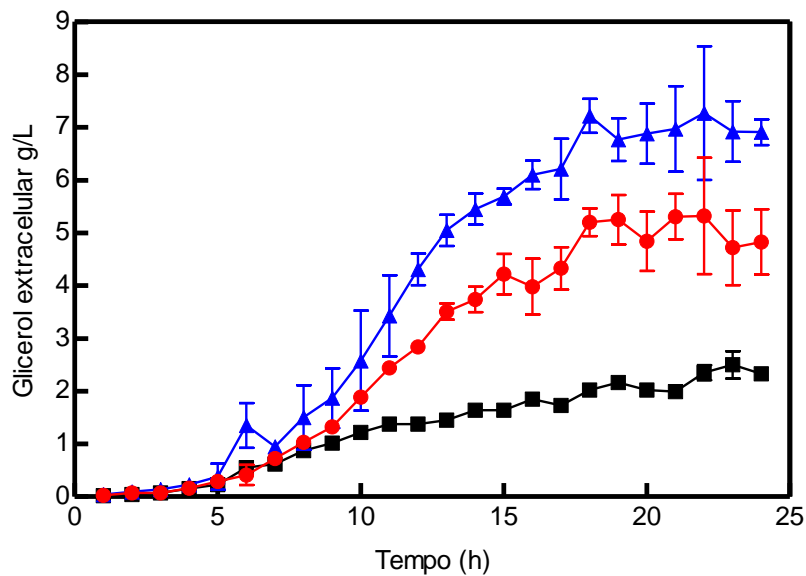


Figura 28 - Produção de glicerol extracelular durante um ciclo fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto 30°Brix a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)



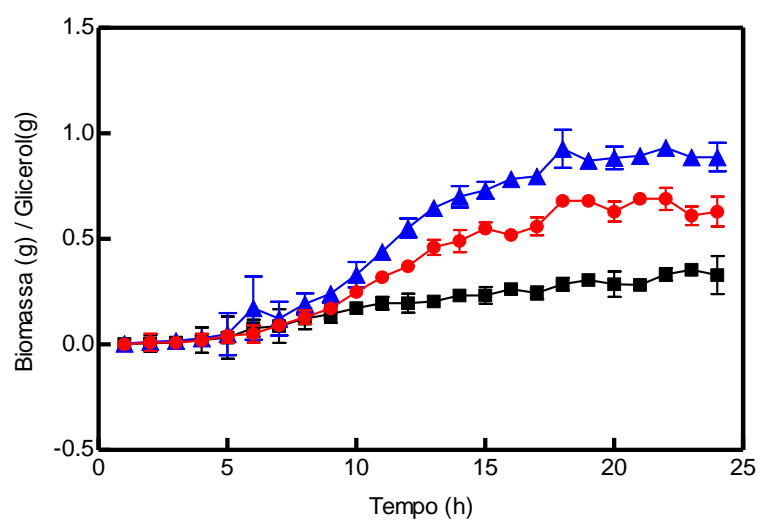


Figura 29 - Razão entre biomassa (peso úmido) e glicerol produzidos pela linhagem CAT-1 em mosto 30° Brix a 30°C suplementado com fosfato de amônio bibásico 3,218 g/L (▲) ou ureia 0,960 g/L (●) e controle (■)

## 5 CONCLUSÕES

A linhagem PE-2 mostrou-se sensível à suplementação nitrogenada, dependendo da concentração de açúcar utilizado no mosto. No mosto a 25 °Brix não se observaram diferenças na produção de etanol, apesar da massa úmida obtida nos mostos suplementados com fonte nitrogenada tenha sido maior que no controle. Já a 30 °Brix, observou-se um aumento da produção de etanol no mosto suplementado em aproximadamente 5,36%, com aumento médio do peso úmido de 2,71 g/100mL. A 35 °Brix a PE-2 apresentou um rendimento pior que em qualquer das outras concentrações de caldo de cana. Assim sendo, para a linhagem PE-2 o melhor rendimento fermentativo ocorreu em mosto concentrado a 30 °Brix onde foi possível obter resultados de etanol acima de 15,8%. A linhagem CAT-1 apresentou, no entanto, genericamente resultados superiores à PE-2. O melhor rendimento fermentativo desta linhagem na ausência de suplementação nitrogenada observou-se no mosto a 25 °Brix, tendo sido o controle a evidenciar os melhores resultados de produção de etanol. Nos mostos suplementados, a CAT-1 mostrou melhor produção de etanol a 30 °Brix suplementado com ureia, em que foram obtidos valores na ordem dos 17% (v/v), i.e.,  $\pm 2\%$  maior do que os valores reportados na literatura. Por seu lado, a CAT-1 nestas condições manteve 70% de viabilidade comparativamente com o valor inicial, não comprometendo o rendimento fermentativo.

A fermentação com mosto a 35 °Brix é um tipo de VHG à partida muito agressivo para as leveduras, principalmente a 30 °C, razão pela qual o processo não está implementado industrialmente. Seria, no entanto, muito interessante encontrar condições que permitam a implementação de fermentações VHG, já que estas permitem poupar energia e água e produzir menos vinhaça, e são por isso económica e ambientalmente mais favoráveis. Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível verificar que uma das leveduras comercialmente disponíveis no mercado sucro-alcooleiro do Brasil – a CAT-1 - tem características de resiliência e produtividade que permitem a sua utilização em fermentações VHG às temperaturas ambientes das usinas no Brasil. Assim os resultados permitem a exploração da CAT-1 na optimização do processo industrial de produção de bioetanol, mediante a utilização de caldo de cana concentrado a 35 °Brix suplementado com ureia. A concentração mínima/ideal de ureia que permita um rendimento em etanol

economicamente interessante terá de ser estimada no futuro e possivelmente será variável consoante a origem e a constituição em nutrientes da própria cana.

## REFERÊNCIAS

- ABERNATHY, D.G.; SPEDDING, G.; STARCHER, B. Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell Ninhydrin assay. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 115, n. 2, p. 122-127, 2009.
- 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**, Washington v. 62, p. 3187-3195, 1996.
- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros de formação alcoólica**, 1994, 251p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- AMORIM, H.V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 1267-75, 2011.
- ANDRE, B.; HEIN, C.; GRENSON, M.; JAUNIAUX, J.-C. Cloning and expression of the UGA4 gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 237, p. 17-25, 1993.
- ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol- Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, São Carlos, v. 7, p. 1-16, 2006.
- ARRIZON, J.; GSCHAEDLER A. Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. **Journal of applied microbiology**, Bedford v.102, p.1123-1131, 2007
- ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature biotechnology**, New York, v. 15, p. 1351-1357, 1997
- AZEVEDO, J.L. **Fungos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 1, p. 12-15, 1997.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M.G.; ALVES, S.L.; CORDIOLI, M.L.; MILETTI, L.C.; DE ARAUJO, P.S.; STAMBUK, B.U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 7, n. 1, p. 4-15. 2008.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R., McHALE, A.P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 809-821, 1998.

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

BASSO, L.C.; PAULILLO, S.C.L. Estudo comparativo entre a levedura "turbo" e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ". **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**: 2003. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 2003. p. 12-25.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. **Processos de produção de álcool**: controle e monitoramento. 2 ed, Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. p. 38-84.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation, In: SANTOS BERNARDES, M.A. dos (Ed.). **Recent developments and prospects**. Croatia: INTECH, 2011. chap. 5, p. 85-100. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/ethanol-production-in-brazil-the-industrial-process-and-its-impact-on-yeast-fermentation>>. Acesso em: 17 Agosto 2015.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, 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 yeasts influenced by the complexity of nitrogen source. **Journal of the Institute of Brewing**, London, UK, v. 112, n. 2, p. 84-91, 2006.

BAUER, F.F. AND PRETORIUS, I.S. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v.21, p. 27–51, 2000.

BECK, T.; HALL, M.N. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature**, London, v. 402, p. 689-692. 1999.

BELO, I.; GOMES, N.; GONÇALVES, C.; LOPES, M.; TEIXEIRA, J.A.; MOTA, M. **Development of bioprocesses involving non-conventional yeasts**. Braga, 2009. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/32140>>. Acesso em: 14 maio 2015.

BELY, M.; SALMON, J.M.; BARRE, P. Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. **The Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 100, n. 4, p. 279–282, 1994.

BERTRAM, P.G.; CHOI, J.H.; CARVALHO, J.; AI, W.; ZENG, C.; CHAN, T-F.; ZHENG, X.F.S. Tripartite regulation of Gln3 by TOR, Ure2, and phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, p. 35727-35733, 2000.

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

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Resenha energética brasileira**. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/1138787/1732840/Resenha+Energ%C3%A9tica+-+Brasil+2015.pdf/4e6b9a34-6b2e-48fa-9ef8-dc7008470bf2>>. Acesso em: 01 Setembro 2015

BREWSTER, J.L.; VALOIR, T. de; DWYER, N.D.; WINTER, E.; GUSTIN, M.C. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science**, Washington, v. 259, p. 1760–1763, 1993.

BRUMM, P.J.; HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations, **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, p. 677-682, 1988.

BURG, M.B.; FERRARIS, J.D. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 283, n. 12, p. 7309-7313, 2008.

BUZIOL, S.; WARTH, L.; MAGARIO, I.; FREUND, A.; SIEMANN-HERZBERG, M.; REUSS, M. Dynamic response of the expression of HXT1, HXT5 and HXT7 transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae* to perturbations in the extracellular glucose concentration. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 134, p. 203–210, 2008.

CAIN, N.E.; KAISER, C.A. Transport activity–dependent intracellular sorting of the yeast general amino acid permease. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 22, n. 11, p. 1919-1929, 2011.

CALDAS, C. **Manual de análises selecionadas para indústrias sucroalcooleiras**. Maceió: Sindicato da Indústria do Açúcar e do Alcool; Cooperativa Regional dos Produtores de Açúcar e de Alcool de Alagoas; Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil - Regional Leste, 1998. 424 p.

CARDENAS, M. E.; CUTLER, N. S.; LORENZ, M. C.; DI COMO, C. J.; & HEITMAN, J. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. **Genes & development**, New York, v. 13, p. 3271-3279. (1999).

CARTWRIGHT, C.P.; JUROSZEK, J.-R.; BEAVAN, M.J.; RUBY, F.M.S.; DE MORAIS, S.M.F.; ROSE, A.H. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 132, p. 369-377, 1986.

CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 3, p. 639-646, 1984.

CAMPOS, L.S. **Entender a bioquímica**. Lisboa: Escolar Ed., 1998. 683 p.

CESAR, M.A.A.; DELGADO, A.A.; CAMARGO, A.P.; BISSOLI, B.M.A.; SILVA, F.C. Capacidade de fosfatos naturais e artificiais em elvar o teor de fósforo no caldo de cana-de-açúcar (cana-palanta), visando o processo industrial. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.5, n.5/6, p.32-38, 1987.

CHEN J.C.P.; CHOU C.C. **Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists**. 12th ed. New York: John Willey & Sons, 1993. 1093p.

COFFMAN, J.A.; RAI, R.; CUNNINGHAM, T.; SVETLOV, V.; COOPER, T.G. Gat1, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 16, p. 847-858, 1996.

COGONI, C.; VALENZUELA, L.; GONZALEZ-HALPHEN, D.; OLIVERA, H.; MACINO, G.; BALLARIO, P.; GONZALEZ, A. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, p. 792-798, 1995.

COLLINS K.D. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. **Biophysical Journal**, New York, v. 72, n. 1, p. 65-76, 1997.

COMISSÃO DA COMUNIDADE EUROPEIA. **Directiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Maio de 2003 relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes**.

Bruxelas, 2003. Disponível em:

<<http://eur.lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:123:0042:0046:PT:PDF>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

CONRAD, M.; SCHOTHORST, J.; KANKIPATI, H.N.; VAN ZEEBROECK, G.; RUBIO-TEXEIRA, M.; THEVELEIN, J.M. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 254-299, 2014.

COOPER, T.G. Allantoin degradative system - an integrated transcriptional response to multiple signals. **Mycota**, Cambridge, v. 3, p. 139-169, 1996.

\_\_\_\_\_. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 223-238. 2002.

COOPER, T.G.; KOVARI L.; SUMRADA R.A.; PARK H.D.; LUCHE R.M.; KOVARI I. Nitrogen catabolite repression of arginase (CAR1) expression in *Saccharomyces cerevisiae* is derived from regulated inducer exclusion. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 48–55, 1992.

COURCHESNE, W.E.; MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the URE2 and GLN3 genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 708-713, 1988.

COSCHIGANO, P.W.; MAGASANIK, B. The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 11, n. 2, p. 822-832, 1991.

COX, K.H.; RAI, R.; DISTLER, M.; DAUGHERTY, J.R.; COFFMAN, J.A.; COOPER, T.G. *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, n. 23, p. 17611-17618, 2000.

CRAUWELS, M.; DONATON, M.C.V.; PERNAMBUCO, M.B.; WINDERICKX, J.; DE WINDE, J.H.; THEVELEIN, J.M. The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. **Microbiology**, London, v. 143, p. 2627–2637, 1997.

Crespo, J. L.; Hall, M. N. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, p. 579-591, 2002.

CRUZ, S.H.; BATISTOTE, 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**, London, v. 109, p. 349-355, 2003.

CUNNINGHAM, T.S.; ANDHARE, R.; COOPER, T.G. Nitrogen catabolite repression of DAL80 expression depends on the relative levels of Gat1 and Ure2 production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, p. 14408-14414, 2000.

DELGADO, A.A.; CESAR, M.A.A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. Sertãozinho: Zanini, 1977. 3v.

DE VIRGILIO, C. The essence of yeast quiescence. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 306-339, 2012.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOULET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, Dresden, v. 1807, p. 568-576, 2011.



DRILLEN, R.M.; AIGLE, M.; LACROUTE, F. Yeast mutants pleiotropically impaired in the regulation of two glutamate dehydrogenases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Taramani, v. 53, p. 367-372, 1973.

DRILLIEN, R.; LACROUTE, F. Ureidosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 109, p. 203-208, 1972.

DUFOUR, J.P.; GOFFEAU, A. Molecular and kinetic properties of the purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 105, p. 145-154, 1980.

ESPOSITO, R.E.; KLAPHOLZ S. Meiosis and ascospore development. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**, Woodbury, n. 11, p. 211-287, 1981.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast, **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 469-486, 2000.

FERREIRA, C.; VAN VOORST, F.; MARTINS, A.; NEVES, L.; OLIVEIRA, R.; KIELLAND-BRANDT, M.C.; BRANDT, A. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 16, n. 4, p. 2068-2076, 2005.

FEREA, T.L.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.; ROSENZWEIG, R.F. Systematic changes in gene expression patterns following adaptative evolution in yeast, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, n. 17, p. 9721-9726, 1999.

FERES, P.F.D. **Os biocombustíveis na matriz energética alemã: possibilidades de cooperação com o Brasil**, Fundação Alexandre de Gusmão, Brasília, 2010.

GIUDICI, P.; SOLIERI, L.; PULVIRENTI, A.M.; CASSANELLI, S. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 66, p. 622-628, 2005.

GONÇALVES, P.; DE SOUSA, H. R.; SPENCER-MARTINS, I. FSY1, a Novel Gene Encoding a Specific Fructose/H<sup>+</sup> Symporter in the Type Strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 182, p. 5628-5630, 2000.

GOLDEMBERG, J. Pesquisa e desenvolvimento na área de energia. **São Paulo em Perspectiva**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 91-97, 2000.

GRENSON, M.F.; MUYLDERMANS, K. B.; VISSERS, S. 4-Aminobutyric acid (GABA) uptake in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the general amino acid permease, the proline permease and a GABA-specific permease integrated into the GABA-catabolic pathway. **Advances Biochemistry**. New York, v. 6, p. 35-39, 1987.

GRENSON, M.; DUBOIS, E.; PIOTROWSKA, M.; DRILLIEN, R.; AIGLE, M. Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases: evidence for the *gdhA* locus being a structural gene for the NADP-dependent glutamate dehydrogenase. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 73–85, 1974.

GUIMARÃES, T.M. **Identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HAGMAN, A.; PIŠKUR J. A Study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. **PLoS one**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116942>>. Acesso em: 22 set. 2015.

HARDWICK, J.S.; KURUVILLA, F.G.; TONG, J.K.; SHAMJI, A.F.; SCHREIBER, S.L. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, n. 26, p. 14866-14870, 1999.

HOFFMAN-BANG, J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biotechnology**, New York, v. 12, p. 35-73, 1999.

HOHMANN, S. Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, p. 300–372, 2002.

HONIG, P. The presence of phosphate in cane juice. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 10. Hawaii, 1959. **Proceedings**. Amsterdam: Elsevier, 1960. P.351-361.

INGLEDEW, W.M. Improvements in alcohol technology through advancements in fermentation technology. **Getriede Technologie**, Berlin, v. 58, p. 308-311, 2005.

INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 125, n. 2, p. 670-678, 1976.

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

JERONIMO, E.M.; OLIVEIRA, E.S.; ROCHA SOUZA, E.L.; SILVA, M.A.; SERRA, G.E. Addition of proteic nitrogen during alcoholic fermentation for the production of cachaça. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 2, p 161-168, 2008.

JONES, A.M.; INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 60, n. 3, p. 1048-1051, 1994.

- KAFFMAN, A.; RANK, N.M.; O'NEILL, E.M.; HUANG, L.S.; O'SHEA, E.K. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. **Nature**, London, v. 396, p. 482–486, 1998.
- KARPEL, J.E.; PLACE, W.R.; BISSON, L.F. Analysis of the major hexose transporter genes in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis v. 59, n. 3, p. 265–275, 2008.
- KIRISAKO, T., BABA, M., ISHIHARA, N., MIYAZAWA, K., OHSUMI, M., YOSHIMORI, T., OHSUMI, Y. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. **The Journal of cell biology**, New York, v. 147, p. 435-446, 1999.
- KRAMPE, S.; BOLES, E. Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 513, p. 193–196, 2002.
- KRAMPE, S.; STAMM, O.; HOLLENBERG, C.P.; BOLES, E. Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. **FEBS Letters**, Heidelberg v. 441, p. 343–347, 1998.
- KRUCKEBERG, A.L.; YE, L.; BERDEN, J.A.; van DAM, K. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. **Biochemistry Journal**, Portland, v. 339, p. 299–307, 1999.
- KULKARNI, A.A.; ABUL-HAMD, A.T.; RAI, R.; EL BERRY, H.; COOPER, T.G. Gln3 nuclear localization and interaction with Ure2 *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 276, p. 32136-32144, 2001.
- LACROUTE, F. Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 95, p. 824-832, 1968.
- LAGES, F.; LUCAS, C. Characterization of a Glycerol/H<sup>+</sup>Symport halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. **Yeast**, Chichester, v. 11, p. 111-119, 1995.
- \_\_\_\_\_. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta -Bioenergetics**, Dresden, v. 1322, n. 1 p. 8-18, 1997.
- LAGUNAS, R. Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Amsterdam, v. 27, p. 139-146, 1979.
- LAOPAIBOON, L.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 18, p. 4176-4182, 2009.

LARSSON, C.; PÅHLMAN, I.L.; ANSELL, R., RIGOULET, M.; ADLER, L.; GUSTAFSSON, L. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 14, n. 4, p. 347-357, 1998.

LASKO, P.F.; BRANDRISS, M.C. Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 148, p. 241–247, 1981.

LAU, M.W.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B.E. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, .n. 1, p.1-11, 2010.

LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 24, p. 2601-2604, 1982.

LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 774, n. 1, p. 43-48, 1984.

LIANG, H.; GABER, R.F. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 7, p. 1953–1966, 1996.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 143, p. 1384-1394, 1980.

LJUNGDAHL, O.; DAIGNAN-FORNIER, B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Rockville, v. 190, p. 885–929, Mar. 2012.

LUNT, S.Y.; VANDER HEIDEN, M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 27, p. 441-464, 2011.

MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: metabolism and gene expression**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992. chap. 2, p. 283–317.

MAGASANIK, B.; KAISER, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, Amsterdam, v. 290, p. 1-18, 2002.

MAGER, W.H.; SIDERIUS, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.

MAIER, A.; VOLKER, B.; BOLES, E.; FUHRMANN, G.F. Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 539–550, 2002.

MARINI, A.M.; SOUSSI-BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; ANDRÉ, B. A Family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 17, p. 4282–4293, 1997.

MARTÍNEZ, J. L.; BORDEL, S.; HONG, K. K.; NIELSEN, J. Gcn4p and the Crabtree effect of yeast: drawing the causal model of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae* and explaining evolutionary trade-offs of adaptation to galactose through systems biology. **FEMS yeast research**, Amsterdam, v. 14, p. 654-662. 2014.

MATSUOKA, S.; JESUS, F.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **Biofuels**, New York, v. 45, n.3, p. 157-172, 2009.

MATOBA, S.; KANG, J. G.; PATINO, W. D.; WRAGG, A.; BOEHM, M.; GAVRILOVA, O.; HWANG, P.M. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, Washington, v.312, p. 1650-1653, 2006.

MAURICIO, J.C.; SALMON, J.M. Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 14, n. 7, p. 577–582, July 1992.

MCWILLIAMS C.S.; PETERSON M.S. **YEAST - Its characteristics, Growth and function in baked products**. Washington DC: Quatermaster Food and Container Institute for the Armed Forces.,1957. 120 p.

MENDES-FERREIRA, A.; DEL OLMO, M.; GARCIA-MARTINEZ, J.; JIMENEZ-MARTI, E.; MENDES-FAIA, A.; PEREZ-ORTIN, J.E.; LEÃO, C. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 73, p. 3049–3060, 2007.

MENESES, J.F.; HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. A survey of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals numerous altered pattern of maltose and sucrose utilisation. **The Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 108, p. 310–321, 2002.

MENSONIDES, F.I.C.; SCHUURMANS, J.M.; MATTOS, M.J.T.; HELLINGWERF, K.J.; BRUL, S. The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 29, p. 103-106, 2002.

MILLER, S.M.; MAGASANIK, B. Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, p. 4927–4935, 1990.

MITCHELL, A.P.; MAGASANIK, B. Purification and properties of glutamine synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 258, p. 119–124, 1983,

\_\_\_\_\_. Regulation of glutamine-repressible gene products by the GLN3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 4, p. 2758–2766, 1984.

NEIMAN, A.M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Micobiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 69, p. 565-584, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Worths Publ., 2000. 949 p.

NGANG, J.J.E.; LETOURNEUA, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied and Microbiological Biotechnology**, New York, v. 31, p. 125-128, 1989.

NILSSON, A.; PAHLMAN, I.L.; JOVALL, P.A.; BLOMBERG, A.; LARSSON, C.; GUSTAFSSON, L. The catabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae* is preserved to a higher extent during carbon compared to nitrogen starvation. **Yeast**, Chichester, v. 18, p.1371-1381, 2001.

O'CONNOR-COX, E.S.C.; PAIK, J.; INGLEDEW, W.M. Improved ethanol yields through supplementation with excess assimilable nitrogen. **Journal of Industrial Microbiology**, Boston, v. 8, p. 45-52, 1991.

OLIVEIRA, A. Reassessing the Brazilian alcohol program, **Energy Policy**, London, v. 19, p. 47-55, 1991

OMICINSKI, J.G.; CLORE, G.M.; SCHAAD, O.; FELSENFELD, G.; TRAINOR, C.; APPELLA, E.; GRONENBORN, A.M. NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. **Science**, Washington, v. 261, n. 5120, p. 438-446, 1993.

OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, London, v. 12, p. 19-35, 1977.

ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 15, p. 1564–1572, 1995.

PALMA, M.; MADEIRA, S.C.; MENDES-FERREIRA, A.; SÁ-CORREIA, I. Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Microbial Cell Factories**, London, v. 99, p. 1-11, 2012.

PARK, J. I.; GRANT, C. M.; ATTFIELD, P. V.; DAWES, I. W. The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. **Applied and environmental microbiology**, Berlin, v. 63, p. 3818-3824, 1997.

PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCÍA, I.; ROMAY, C. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 32, n. 3, p. 374-378, 1988.

PEDRUZZI, I.; DUBOULOZ, F.; CAMERONI, E.; WANKE, V.; ROOSEN, J.; WINDERICKX, J.; DE VIRGILIO. TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G 0. **Molecular cell**, Cambridge, v. 12, p. 1607-1613, 2003.

PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v.1, 556 p.

PEREZ, M.; LUYTEN, K.; MICHEL, R.; RIOU, C.; BLONDIN, B. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low and high-affinity Hxt transporters are expressed. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, n. 5, p. 351–361, 2005.

PHAFF, H.J., MILLER, M.W., MRAK E.M. **The life of yeasts**. 2<sup>nd</sup> ed. Harvard: Harvard University Press, 1978. v. 1, 360 p.

PIDDOCKE, M.P.; KREISZ, S.; HELDT-HANSEN, H.P.; NIELSEN, K.F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 453-464, 2009.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos**. Piracicaba FEALQ : 2002. 309p.

PINSON, B.; VAUR, S.; SAGOT, I.; COULPIER, F.; LEMOINE, S.; DAIGNAN-FORNIER, B. Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. **Genes and Development**, Washington, v. 23, p. 1399-1407, 2009.

PIPER, P.W. The heat shock and ethanol stress response of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiology Letters**, Amesterdam, v. 134, p. 121-127, 1995.

POPOVA, Y., P. THAYUMANAVAN, E. LONATI, M. AGROCHAO, AND J. M. THEVELEIN. Transport and signaling through the phosphate-binding site of the yeast Pho84 phosphate transceptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United Satates of America**, Washington, v. 107, p. 2890–2895, 2010.

PRICK, T.; THUMM, M.; KOHRER, K.; HAUSSINGER, D.; VOM DAHL, S. In yeast, loss of Hog1 leads to osmosensitivity of autophagy. **Biochemistry Journal**, London, v. 394, p. 153-161, 2006.

PRONK, J.T.; STEENSMA, H.Y.; VAN DIJKEN, J.P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.

PULIGUNDLA, P.; SMORGROVICOVA, D.; OBULAM, V.S.R.; KO, S. Very high gravity (ACA) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1133-1144, 2011.

REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 245, n. 2, p. 324-333, 1997.

REIFENBERGER, E.; FREIDEL, K.; CIRIACY, M. Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 16, p. 157-167, 1995

RIGOLET, M.; AGUILANIU, H.; AVÉRET, N.; BUNOUST, O.; CAMOUGRAND, N.; GRANDIER-VAZEILLE, X.; GUSTAFSSON, L. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Amsterdam, v. 256, n. 1, p. 73-81, 2004.

ROBERG, K.J.; ROWLEY, N.; KAISER, C.A. Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 137, n. 7, p. 1469-1482, 1997.

ROBERG, K.J.; BICKEL, S.; ROWLEY, N.; KAISER, C.A. Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST78. **Genetics**, Berlin, v. 147, n. 4, p. 1569-1584, 1997.

ROGERS, P. J.; STEWART, P. R. Energetic efficiency and maintenance energy characteristics of *S. cerevisiae* (wild type and petite) and *C. parapsilosis* grown aerobically and micro-aerobically in continuous culture. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 99, p. 25-46, 1974.

RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In. ROSA, C.A.; PETER, G. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeast**, Berlin: Springer, 2006. chap. 6, p. 101-121.

ROSA, M.F.; SÁ-CORREIA, I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, n. 1, p. 23-27, 1992.



ROWEN, D.W.; ESIOBU, N.; MAGASANIK, B. Role of GATA factor Nil2p in nitrogen regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 3761–3766, 1997.

SALMON, J.M. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 55, p. 953–958, 1989.

SALMON, J.M.; VINCENT, O.; MAURICIO, J.C.; BELY, M.; BARRE, P. Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 44, n. 1, p. 56-64, 1993.

SALGUEIRO, S.P.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 903-909, 1988.

SANTANGELO, G.M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, p. 253–282, 2006.

SCHMELZLE, T.; BECK, T.; MARTIN, D.E.; HALL, M.N. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 24, p. 338–351, 2004.

SCHREVE, J.L.; SIN, J.K.; GARRETT, J.M. The *Saccharomyces cerevisiae* YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 9, p. 2556–2559, 1998.

SCOTT, S.V.; NICE, D.C.; NAU, J.J.; WEISMAN, L.S.; KAMADA, Y.; KEIZER-GUNNINK, I.; FUNAKOSHI, T.; VEENHUIS, M.; OHSUMI, Y.; KLIONSKY, D.J. Agp13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, p. 25840–25849, 2000.

SINCLAIR, K.; WARNER, J.P.; BONTHRON, D.T. The ASP1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. **Gene**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 37-43, 1994.

SRICHUWONG, S.; FUJIWARA, M.; WANG, X.; SEYAMA, T.; SHIROMA, R.; ARAKANE, M.; TOKUYASU, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. **Biomass and Bioenergy**, Washington, v. 33, p. 890-898, 2009.

SRIKANTA, S.; JALEEL, S.A.; GHILDYAL, N.P.; LONSANE, B.K. Technoeconomic feasibility of ethanol production from fresh cassava tubers in comparison to dry cassava chips. **Food/Nahrung**, Weinheim, v. 36, p. 253–258, 2006.

SOUSA, H. R., SPENCER - MARTINS, I., & GONÇALVES, P. Differential regulation by glucose and fructose of a gene encoding a specific fructose/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts. **Yeast**, Chichester, v. 21, p. 519-530, 2004.

SOUZA DIAS, M.O.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P.E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C.E.V.; BONOMI, A.; LEAL, M.R.L.V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, Berlin, v. 15, p. 35-51, 2015

STANBROUGH, M.; MAGASANIK, B. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 1, p. 94-102, 1995.

STEFFEN, K.; KENNEDY, B.K.; KAEBERLEIN, M. Measuring replicative life span in the budding yeast. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, v. 28, p. 1-5, 2009.

STEINKRAUS, K.A.; KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B.K. Replicative aging in yeast: the means to the end. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 24, p. 29-54, 2008.

TAMÁS, M.J.; LUYTEN, K.; SUTHERLAND, F.C.W.; HERNANDEZ, A.; ALBERTYN, J.; VALADI, H.; HOHMANN, S. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. **Molecular Microbiology**, Oxford v. 31, n. 4, p. 1087-1104, 1999.

TEIXEIRA, C.G.; SALATI, A. Fermentação alcoólica do caldo da cana açúcar var, co.290 II. Influência da estirpe de fermento utilizada sobre o rendimento alcoólico. **Bragantia**, Campinas, v. 13, n. 15, p. 181-186, 1954.

TER SCHURE, E.G.; SILLJÉ, H.H.; VERMEULEN, E.E.; KALHORN, J.W.; VERKLEIJ, A.J.; BOONSTRA, J.; VERRIPS, C.T. Repression of nitrogen catabolic genes by ammonia and glutamine in nitrogen-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, London, v. 144, n. 5, p. 1451-1462, 1998.

THEERARATTANANOON, K.; LIN, Y. H.; PENG, D. Y. Metabolic heat evolution of *Saccharomyces cerevisiae* grown under very-high-gravity conditions. **Process Biochemistry**, London, v. 43, p. 1253-1258. 2008.

THEVELEIN, J.M.; BEULLENS, M. Cyclic AMP and the stimulation of trehalase activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by carbon sources, nitrogen sources and inhibitors of protein synthesis. **Journal of General Microbiology**, London, v. 131, p. 3199-3209, 1985.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation, **Process Biochemistry**, London, v. 31, n. 4, p. 321-331, 1996.

- 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**, Berlin, v. 56, p. 2046–2050, 1990.
- TOMAS-COBOS, L.; VIANA, R.; SANZ, P. TOR kinase pathway and 14-3-3 proteins regulate glucose-induced expression of HXT1, a yeast low-affinity glucose transporter. **Yeast**, Chichester, v. 22, p. 471–479, 2005.
- TORRES, J.; DI COMO, C. J.; HERRERO, E.; DE LA TORRE-RUIZ, M. A. Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 277, p. 43495-43504, 2002.
- TORTORA, G.J.; FUNKE B.R.; CASE C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2011. 964 p.
- TUROSCY, V.; COOPER, T.G. Ureidosuccinate is transported by the allantoin transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 2598-2600. 1987.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção de etanol pode atingir 30 bilhões de litros**. 2015. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias>>. Acesso em: 20 set. 2015.
- UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT. **Biofuels in Asia: an analysis of sustainability options**. 2009. Disponível em: <<https://www.cbd.int/doc/biofuel/USAID-biofuels-asia-2009-03.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2015.
- VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 199-224, 1986.
- van SUYLEKOM, D.; van DONSELAAR, E.; BLANCHETOT, C.; DO NGOC, L.N.; HUMBEL, B.M.; BOONSTRA, J. Degradation of the hexose transporter Hxt5p in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biology of the Cell**, Bethesda, v. 99, n. 1, p. 13–23, 2007.
- VISSER, D; VAN ZUYLEN G.A.; VAN DAM, J.C.; EMAN, M.R.; PROLL A.; RAS, C.; WU L.; VAN GULIK W.M.; HEIJNEN, J.J. Analysis of in vivo kinetics of glycolysis in aerobic *Saccharomyces cerevisiae* by application of glucose and ethanol pulses. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 88, p. 157–167, 2004.
- VOM DAHL, S.; DOMBROWSKI, F.; SCHMITT, M.; SCHLISS, F.; PFEIFER, U.; HAUSSINGER, D. Cell hydration controls autophagosome formation in rat liver in a microtubule-dependent way downstream from p38MAPK activation. **Biochemistry Journal**, Portland, v. 354, p. 31-36, 2001.
- WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**, Chichester: John-Wiley, 1998. 350 p.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in biotechnology**, Cambridge, v. 17, p. 482-487, 1999.

WIAME, J.M.; GRENSON, M.; ARST Jr., H.N. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. In: ROSE A.H.; ARST Jr., H.N. **Advances in microbial physiology**. London: Academic Press, 1985. v. 26, p. 1-329.

WIENKEM, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate **Antonie van Leewenhoek**, Amsterdam, v. 58, p. 209-217, 1990.

WINDERICKX, J.; HOLSBEEKS, I.; LAGATIE, O.; GIOTS, F.; THEVELEIN, J.; DE WINDE, H. From feast to famine: adaptation to nutrient availability in yeast. In: HOHMANN, S.; MAGER, P.W.H. **Topics in current genetics, yeast stress responses**. Berlin: Springer-Verlag, 2003. v. 1, p. 305-386.

YE, L.; BERDEN, J.A.; VAN DAM, K.; KRUCKEBERG, A.L. Expression and activity of the Hxt7 high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 18, p. 1257–1267, 2001.

YOON, S. H.; MUKERJEA, R.; ROBYT, J. F. Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. **Carbohydrate research**, Norwich, v. 338, p. 1127-1132. 2003.

YORK, J.D. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Dresden, v. 1761, n. 5, p. 552-559, 2006.

ZHENG, X.F.; FLORENTINO, D.; CHEN, J.; CRABTREE, G.R.; SCHREIBER, S.L. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. **Cell**, Riverport Lane, v. 82, p. 121-130, 1995.



## **APÊNDICES**



**APÊNDICE A**

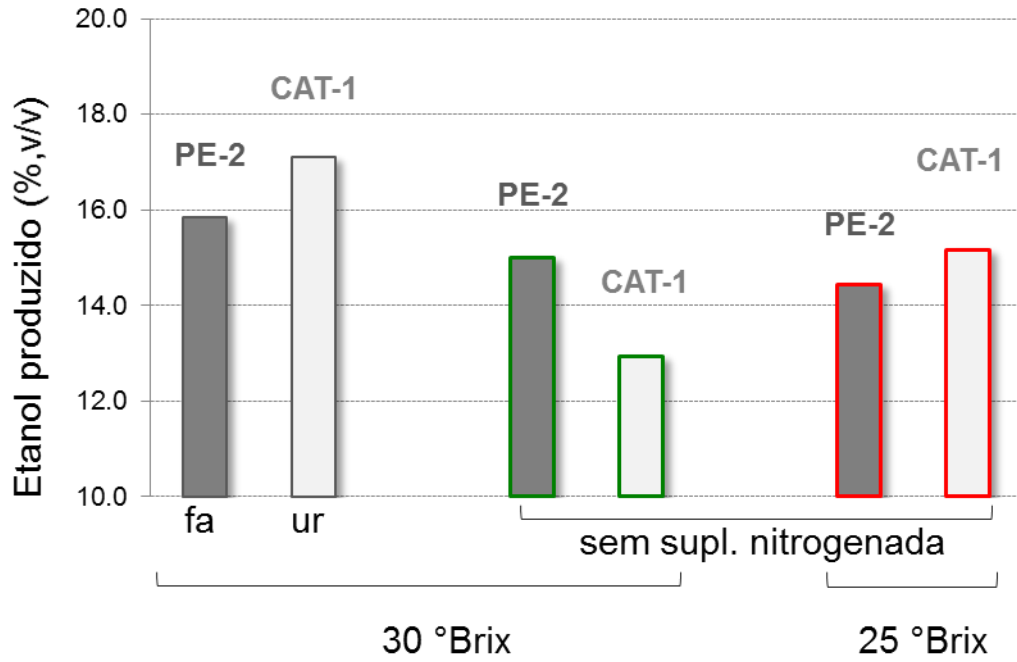


Figura 30 - Melhores resultados obtidos entre todos os tratamentos durante fermentação das linhagens PE-2 e CAT-1 em mosto 25 ou 30 °Brix sem suplementação nitrogenada (controle) ou suplementado com fosfato de amônio (fa) ou ureia (ur)

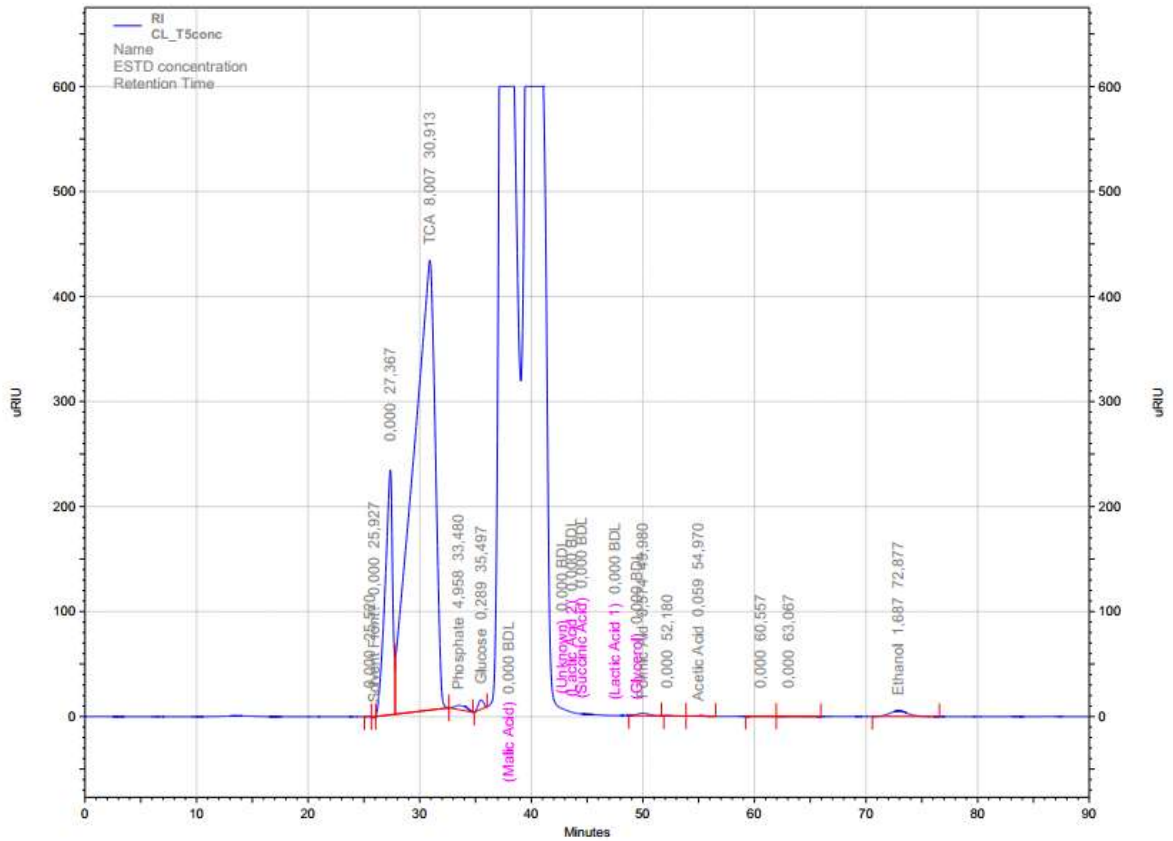


Figura 31 - Cromatograma da quinta hora do tratamento control terceira repetição



Tabela S1 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 25 °Brix pela linhagem PE-2 em quatro ciclos fermentativos, durante as primeiras 8 h e após 24 h de cada ciclo, a 30°C

Ciclo	Tempo (h)	Controle <sup>1</sup>	Ureia <sup>2</sup>	Fosfato <sup>2</sup>
1°	1	0,18 aH	0,18 aG	0,19 aG
	2	0,37 aGH	0,32 aG	0,35 aFG
	3	0,61 aFG	0,54 aFG	0,56 aEFG
	4	0,82 aEF	0,77 aEF	0,71 aEF
	5	1,08 aDE	1,05 aDE	0,91 aDE
	6	1,49 aD	1,33 aD	1,25 aCD
	7	1,92 aC	1,77 abC	1,57 bC
	8	2,39 aB	2,26 abB	2,00bB
	24	9,69 cA	11,12 aA	10,10 bA
2°	1	0,49 aI	0,63 aI	0,56 aI
	2	1,06 aH	1,37 aH	1,21 aH
	3	1,77 bG	2,20 aG	1,98 abG
	4	2,5 bF	3,05 aF	2,86 aF
	5	3,5 bE	4,05 aF	2,86 aF
	6	4,22 bD	5,10 aD	4,89 aD
	7	5,07 bC	6,06 aC	5,90 aC
	8	5,79 bB	6,96 aB	6,79 aB
	24	12,92 aA	13,15 aA	13,04 aA
3°	1	0,53	0,51	0,53
	2	1,28	1,23	1,21
	3	2,11	2,08	2,03
	4	2,99	3,02	2,93
	5	3,98	4,05	3,91
	6	4,93	5,18	4,94
	7	5,87	6,15	6,01
	8	6,68	7,14	6,90
	24	13,40	13,18	13,30
4°	1	0,72 aI	0,68 aI	0,42 aI
	2	1,48 aH	1,55 aH	1,04 bH
	3	2,31 aG	2,33 aG	1,65 bG
	4	3,24 aF	3,20 aF	2,34 bF
	5	4,23 aE	4,24 aE	3,12 bE
	6	5,38 aD	5,42 aD	4,15 bD
	7	6,33 aC	6,39 aC	5,20 bC
	8	7,12 aB	7,32 aB	6,12 bB
	24	13,46 aA	13,69 aA	12,89 bA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (significância 5%)

Tabela S2 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 30°Brix pela linhagem PE-2 durante as primeiras 8 h e após 24 h nos três ciclos fermentativos

Ciclo	Tempo (h)	Controle <sup>1</sup>	Ureia <sup>2</sup>	Fosfato <sup>2</sup>
1° ciclo	1	0,21 aH	0,20 aH	0,16 aH
	2	0,33 aGH	0,34 aGH	0,31 aGH
	3	0,49 aFG	0,50 aFG	0,45 aFG
	4	0,73 aEF	0,69 aEF	0,63 aEF
	5	0,90 aE	0,91 aE	0,79 aDE
	6	1,20 aD	1,22 aD	1,03 aCD
	7	1,51 aC	1,52 aC	1,26 bC
	8	1,84 aB	1,91 aB	1,61 bB
	24	7,90 cA	9,27 bA	9,96 aA
2° ciclo	1	0,56 aH	0,63 aH	0,43 aI
	2	0,99 aGH	1,10 aH	1,01 aH
	3	1,48 aG	1,70 aG	1,64 aG
	4	2,11 aF	2,38 aF	2,43 aF
	5	2,84 bE	3,24 aE	3,28 aE
	6	3,41 bD	3,91 aD	4,08 aD
	7	4,09 bC	4,75 aC	5,01 aC
	8	4,74 bB	5,53 aB	5,83 aB
	24	12,67 cA	14,60 aA	14,04 bA
3° ciclo	1	0,45 aI	0,49 aI	0,44 aI
	2	0,97 aH	1,02 aH	0,94 aH
	3	1,58 aG	1,57 aG	1,46 aG
	4	2,23 aF	2,16 aF	2,03 aF
	5	2,91 aE	2,89 aE	2,74 aE
	6	3,64 aD	3,64 aD	3,49 aD
	7	4,38 aC	4,45 aC	4,28 aC
	8	5,05 aB	5,23 aB	5,07 aB
	24	12,35 cA	13,70 aA	12,82 bA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (significância 5%)

Tabela S3 Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 30°Brix pela linhagem PE-2 durante as primeiras 8 h e após 24 h no 4° e 6° ciclos fermentativos

<b>Ciclo</b>	<b>(h)</b>	<b>Controle<sup>1</sup></b>	<b>Ureia<sup>2</sup></b>	<b>Fosfato<sup>2</sup></b>
4°	1	0,51 aI	0,51 aI	0,55 aI
	2	1,11 aH	1,1 aH	1,16 aH
	3	1,76 aG	1,68 aG	1,77 aG
	4	2,41 aF	2,32 aF	2,52 aF
	5	3,13 aE	3,02 aE	3,24 aE
	6	3,93 abD	3,85 bD	4,13 aD
	7	4,72 bC	4,77 bC	5,03 aC
	8	5,44 bB	5,49 bB	5,84 aB
	24	12,68 cA	13,37 bA	13,91 aA
6°	1	0,56 aH	0,55 aH	0,44 aH
	2	1,18 aGH	1,13 aGH	1,05 aGH
	3	1,88 aG	1,75 aFG	1,70 aFG
	4	2,66 aF	2,42 aF	2,39 aF
	5	3,42 aE	3,21 aE	3,18 aE
	6	4,23 aD	4,07 aD	4,17 aD
	7	5,17 aC	4,95 aC	5,0 aC
	8	6,19 aB	5,73 aB	5,96 aB
	24	13,50 cA	14,66 bA	15,50 aA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (significância 5%)

Tabela S4 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 35°Brix pela linhagem PE-2 durante as primeiras 8 h e após 24 h nos três primeiros ciclos fermentativo

<b>Ciclo</b>	<b>(h)</b>	<b>Controle</b>	<b>Ureia</b>	<b>Fosfato</b>
1°	1	0,13 aF	0,16 aG	0,13 aF
	2	0,21 aEF	0,30 aFG	0,24 aEF
	3	0,34 aEF	0,47 aEFG	0,36 aEF
	4	0,46 aDEF	0,65 aDEF	0,50 aDEF
	5	0,62 aCDE	0,84 aDE	0,65 aCDE
	6	0,84 aBCD	1,07 aCD	0,88 aCD
	7	1,03 aBC	1,33 aBC	1,06 aBC
	8	1,27 bB	1,61 aB	1,35 abB
	24	6,34 cA	7,37 bA	8,29 aA
2°	1	0,38 aI	0,39 aI	0,43 aI
	2	0,73 bH	0,76 bH	0,94 aH
	3	1,16 bG	1,21 bG	1,54 aG
	4	1,68 bF	1,77 bF	2,20 aF
	5	2,25 bE	2,32 bE	2,95 aE
	6	2,78 cD	2,97 bD	3,78 aD
	7	3,37 cC	3,61 bC	4,60 aC
	8	3,98 cB	4,26 bB	5,42 aB
	24	7,30 cA	8,03 bA	13,17 aA
3°	1	0,40 aH	0,37 aH	0,42 aH
	2	0,88 aGH	0,88 aGH	0,92 aH
	3	1,25 aG	1,25 aG	1,50 aG
	4	1,79 aF	1,79 aF	2,13 aF
	5	2,39 bE	2,36 bE	2,79 aE
	6	3,02 bD	3,04 bD	3,58 aD
	7	3,68 bC	4,47 bB	4,40 aC
	8	4,36 bB	4,47 bB	5,11 aB
	24	11,84 bA	12,12 bA	13,22 aA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (significância 5%)

Tabela S5 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação de mosto a 35°Brix pela linhagem PE-2 durante as primeiras 8 h e após 24 h no 4°, 5° e 6° ciclos fermentativos

Ciclo	(h)	Controle	Ureia	Fosfato
4°	1	0,46 aI	0,45 a,	0,44 aI
	2	0,95 aH	0,86 a,	0,98 aH
	3	1,57 aG	1,41 aG	1,67 aG
	4	2,19 aF	2,03 aF	2,34 aF
	5	2,82 abE	2,65 bE	3,13 aE
	6	3,33 bD	3,19 bD	3,76 aD
	7	4,19 bC	4,04 bC	4,71 aC
	8	4,87 bB	4,73 bB	5,51 aB
	24	12,27 bA	12,60 bA	14,03 aA
5°	1	0,48 aI	0,49 aI	0,57 aI
	2	1,06 aH	1,04 aH	1,10 aH
	3	1,60 aG	1,61 aG	1,75 aG
	4	2,25 aF	2,23 aF	2,45 aF
	5	2,89 aE	2,86 aE	3,12 aE
	6	3,53 bD	3,52 bD	4,02 aD
	7	4,26 bC	4,29 bC	4,88 aC
	8	4,92 bB	4,94 bB	5,60 aB
	24	12,61 bA	12,36 bA	13,68 aA
6°	1	0,51 aH	0,52 aI	0,47 aI
	2	0,96 aH	1,10 aH	1,03 aH
	3	1,55 aG	1,65 aG	1,66 aG
	4	2,14 aF	2,29 aF	2,29 aF
	5	2,78 aE	2,88 aE	3,03 aE
	6	3,42 aD	3,59 aD	3,75 aD
	7	4,12 bC	4,23 abC	4,51 aC
	8	4,72 bB	4,82 abB	5,18 aB
	24	12,26 bA	12,53 bA	13,29 aA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos (significância 5%)

Tabela S6 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto concentrado a 25 °Brix nos 1°, 2° e 3° ciclos fermentativos durante as primeiras 8 h e após 24 h de cada ciclo

		<b>Controle<sup>1</sup></b>	<b>Ureia<sup>2</sup></b>	<b>Fosfato<sup>2</sup></b>
1° ciclo	1	0,180 aH	0,160 aH	0,170 aH
	2	0,403 aGH	0,390 aGH	0,393 aGH
	3	0,723 aG	0,653 aG	0,637 aFG
	4	1,07 aF	1,01 aF	0,927 aFG
	5	1,52 aE	1,43 aE	1,34 aE
	6	2,01 aD	1,89 aD	1,84 aD
	7	2,45 aC	2,43 aC	2,45 aC
	8	2,85 aB	3,01 aB	3,01 aB
	24	9,90 cA	12,5 aA	11,9 bA
2° ciclo	1	0,500 aI	0,66 aI	0,66 aI
	2	1,05 bH	1,44 aH	1,46 aH
	3	1,70 bG	2,32 aG	2,46 aG
	4	2,37 bF	3,34 aF	3,43 aF
	5	3,06 bE	4,29 aE	4,50 aE
	6	3,93 bD	5,56 aD	5,70 aD
	7	4,65 bC	6,56 aC	6,66 aC
	8	5,50 bB	7,61 aB	7,57 aB
	24	13,01 bA	13,46 aA	13,28 abA
3° ciclo	1	0,54 aI	0,46 aI	0,42 aH
	2	1,30 aH	1,08 abH	0,86 bGH
	3	2,04 aG	1,71 aG	1,28 bG
	4	2,90 aF	2,40 bF	1,79 cF
	5	3,79 aE	2,97 bE	2,34 cE
	6	4,76 aD	3,98 bD	3,06 cD
	7	5,62 aC	4,82 bC	3,81 cC
	8	6,39 aB	5,72 bB	4,58 cB
	24	13,64 aA	13,25 bA	12,55 cA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos

Tabela S7 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto concentrado a 25 °Brix no 6° ciclo fermentativo durante as primeiras 8 h e após 24 h de cada ciclo

(h)	Controle <sup>1</sup>	Ureia <sup>2</sup>	Fosfato <sup>2</sup>
1	0,66 al	0,62 al	0,46 al
2	1,34 aH	1,28 aH	1,26 aH
3	2,01 aG	2,00 aG	2,19 aG
4	2,71 BF	2,7633 bF	3,38 aF
5	3,42 bE	3,62 bE	4,66 aE
6	4,18 cD	4,69 bD	5,91 aD
7	4,95 cC	5,59 bC	6,98 aC
8	5,61 cB	6,53 bB	8,01 aB
24	12,49 cA	15,31 aA	13,24 bA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos

Tabela S8 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 30 °Brix a 30°C durante o 1°, 2° e 3° ciclo fermentativo

<b>Ciclo</b>	<b>(h)</b>	<b>Controle</b>	<b>Ureia</b>	<b>Fosfato</b>
1°	1	0,17 aF	0,18 aH	0,23 aH
	2	0,29 aF	0,40 aGH	0,41 aGH
	3	0,45 aEF	0,65 aFG	0,73 aFG
	4	0,60 bDEF	0,95 aEF	1,04 aEF
	5	0,79 bDE	1,29 aE	1,45 aE
	6	1,03 bCD	1,82 aD	1,98 aD
	7	1,36 cBC	2,41 bC	2,79 aC
	8	1,72 cB	3,12 bB	3,50 aB
	24	7,89 bA	11,96 aA	11,76 aA
2°	1	0,41 aA	0,58 aB	0,63 aI
	2	0,84 bH	1,24 aH	1,49 aH
	3	1,36 cG	1,99 bG	2,41 aG
	4	1,96 cF	2,88 bF	3,51 aF
	5	2,54 cE	3,80 bE	4,61 aE
	6	3,24 cD	4,82 bD	5,65 aD
	7	3,93 cC	5,88 bC	6,63 aC
	8	4,58 cB	6,84 bB	7,45 aB
	24	11,61 cA	16,07 aA	13,60 bA
3°	1	0,39 aH	0,16 aD	0,287 aG
	2	0,94 aGH	0,29 bD	0,65 abG
	3	1,50 aFG	0,42 bCD	1,02 aFG
	4	2,14 aEF	0,56 cCD	1,50 bEF
	5	2,89 aDE	0,72 cBCD	1,94 bDE
	6	3,58 aCD	0,91 cBCD	2,55 bCD
	7	4,32 aBC	1,06 cBC	3,20 bBC
	8	5,04 aB	1,42 cB	3,88 bB
	24	13,57 aA	7,42 cA	12,38 bA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos



Tabela S9 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 30 °Brix a 30°C durante o 4°, 5° e 6° ciclo fermentativo

<b>Ciclo</b>	<b>(h)</b>	<b>Controle</b>	<b>Ureia</b>	<b>Fosfato</b>
4°	1	0,71 aD	0,47 bD	0,49 bD
	2	1,34 aH	0,99 aH	1,04 aH
	3	1,88 aG	1,58 aG	1,80 aG
	4	2,51 abF	2,23 bF	2,65 aF
	5	3,13 bE	2,99 bE	3,59 aE
	6	3,92 bD	3,91 bD	4,72 aD
	7	4,60 bC	4,85 bC	5,73 aC
	8	5,29 cB	5,72 bB	6,72 aB
	24	12,66 cA	15,02 aA	13,95 bA
5°	1	0,56 al	0,52 al	0,46 al
	2	1,18 aH	1,11 aH	1,10 aH
	3	1,79 aG	1,71 aG	1,86 aG
	4	2,42 aF	2,38 aF	2,78 aF
	5	3,06 bE	3,12 bE	3,79 aE
	6	3,80 bD	4,00 bD	4,95 aD
	7	4,50 cC	4,96 bC	6,08 aC
	8	5,16 cB	5,88 bB	7,07 aB
	24	12,12 cA	15,46 aA	13,49 bA
6°	1	0,66 al	0,62 al	0,46 al
	2	1,34 aH	1,28 aH	1,26 aH
	3	2,01 aG	2,00 aG	2,19 aG
	4	2,71 BF	2,7633 bF	3,38 aF
	5	3,42 bE	3,62 bE	4,66 aE
	6	4,18 cD	4,69 bD	5,91 aD
	7	4,95 cC	5,59 bC	6,98 aC
	8	5,61 cB	6,53 bB	8,01 aB
	24	12,49 cA	15,31 aA	13,24 bA

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos

Tabela S10 - Desprendimento de CO<sub>2</sub> (g) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto a 35 °Brix a 30°C durante o 1° ciclo fermentativo

<b>Tempo(h)</b>	<b>Controle</b>	<b>Ureia</b>	<b>Fosfato</b>
1	0,28	0,32	0,28
2	0,60	0,68	0,59
3	1,00	1,13	0,91
4	1,54	1,68	1,35
5	2,14	2,32	1,80
6	2,88	3,07	2,36
7	3,70	3,94	3,13
8	4,42	4,66	3,82
24	12,78	12,72	12,05

1- mosto sem suplementação 2- mosto suplementado com 16 mM de ureia ou 24 mM fosfato de amônio, Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do ciclo Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os ciclos