**FERMENTAÇÃO DE TREALOSE E GLICOGÊNIO
ENDÓGENOS EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

LEONEL VASCO FERREIRA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1998

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

Ferreira, Leonel Vasco

Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae* /
Leonel Vasco Ferreira. - - Piracicaba, 1998.
125 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Carboidrato 2. Fermentação alcoólica 3. Levedura 4. Microbiologia aplicada 5.
Tecnologia de alimento I. Título

CDD 663.13

**FERMENTAÇÃO DE TREALOSE E GLICOGÊNIO
ENDÓGENOS EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

LEONEL VASCO FERREIRA

Aprovada em: 13/02/1998

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim

ESALQ/USP

Prof. Dr. Jorge Horii

ESALQ/USP

Prof. Dr. Paulo Fernando Machado

ESALQ/USP

Prof. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM
Orientador

É agradável fazer um trabalho no sentido de deixar a nossa marca registrada na vida profissional e contribuir em parte, neste mundo tão amplo que é a ciência.

Leonel Vasco Ferreira

Aos Professores Dr. Eduardo Lima e Dr. Marco Aurélio da UFRRJ, que me acompanharam desde o início da minha carreira até o presente momento,

DEDICO.

Aos meus pais,
Vasco Patrão Ferreira e
Nhima Correia,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço pela saúde e disposição que me permitiram a realização deste trabalho, bem como, a coragem e determinação concedida para enfrentar os desafios da vida cotidiana.

Ao Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim, pela orientação, amizade, e o apoio concedido em todos os sentidos durante este percurso.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pela co-orientação e os ensinamentos transmitidos incansavelmente no decurso deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio A. César, pela recepção calorosa concedida ao pisar pela primeira vez ao solo piracicabano, bem como pelas primeiras orientações no início do curso.

Ao técnico de laboratório Admir de Almeida Campos e Luiz Lucatti, pela orientação em análise de laboratório, ajuda e amizade estabelecida.

Às estagiárias Karina e Ivanete, pela ajuda em análises laboratoriais.

Ao Engenheiro Agrônomo Mário Lúcio Lopes, pelo apoio incansável oferecido e os conhecimentos transmitidos.

Às Bibliotecárias Beatriz Helena Giongo e a Midiam pelo apoio constante nos serviços bibliotecários e na correção das referências bibliográficas.

Ao aluno de graduação Marcos Faria Gomes, pela recepção, apoio e sobretudo um grande amigo.

Aos funcionários da Fermentec S/C Ltda, Sueli, Luciana, Marta e Raquel, pela ajuda constante nas impressões de trabalho e amizade.

À secretária da Bioquímica, Cristina, pelo apoio e amizade.

À Prof. Maria Izalina Ferreira Alves, pela orientação em análises estatísticas.

Às Usinas da Pedra e Santa Elisa, pela cessão de instalações, equipamentos e hospedagem, bem como, pelo calor humano oferecido.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Agroindustrial e à Comissão de pós-graduação pela oportunidade oferecida para a realização de mais uma etapa da minha vida profissional.

Ao Departamento de Química - Bioquímica (ESALQ - USP) pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

À Fermentec S/C Ltda pelo apoio financeiro à execução deste projeto.

À Direção da CAVE da ESALQ, pela cessão da moradia Estudantil.

À todos que tiveram a participação direta ou indireta para a realização deste trabalho, agradeço imensamente.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xvii
RESUMO.....	xxi
SUMMARY.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Composição química da célula de levedura	4
2.2 Efeito da temperatura em células de leveduras.....	6
2.3 Efeito do pH e lixiviação de minerais em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.4 Reservas de carboidratos em <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> suas funções e metabolismo	13
2.4.1 Glicogênio	13
2.4.2 Biossíntese de glicogênio	15
2.4.3 Regulação da biossíntese de glicogênio	16
2.4.4 Catabolismo de glicogênio.....	19
2.4.5 Trealose	19
2.4.5.1 Biossíntese da trealose.....	20
2.4.5.2 Regulação da biossíntese de trealose.....	21
2.4.5.3 Catabolismo de trealose	23

2.4.6 Metabolismo de glicogênio e trealose em condições não proliferantes e de estresse	25
2.4.7 Mobilização e acúmulo dos carboidratos de reserva durante a fermentação alcoólica	32
2.4.8 Efeito da temperatura e do pH na fermentação endógena	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Microrganismos	36
3.2 Multiplicação da levedura	36
3.3 Fermentação prévia	37
3.4 Fermentação endógena	38
3.5 Tratamentos	39
3.5.1 - 1 Ciclo fermentativo	39
3.5.2 - 4 Ciclos fermentativos	39
3.5.3 Efeito de diferentes pH iniciais	39
3.5.4 Efeito de diferentes temperaturas	40
3.5.5 Tempo em horas	40
3.6 O delineamento experimental	40
3.7 Determinação de etanol	42
3.8 Extração e determinação dos carboidratos de reserva	42
3.9 Determinação do pH da suspensão e do nitrogênio total no fermento e no vinho	42
3.10 Determinação do teor do fermento úmido e seco	43
3.11 Determinação da viabilidade celular	43
3.12 Determinações na indústria	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 A influência dos ciclos fermentativos na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagens PE-2 e VR-1	45
4.1.1 Linhagem PE-2	45
4.1.2 Linhagem VR-1	53

4.2 Efeito do pH inicial da suspensão na fermentação.....	62
4.3 Efeito da temperatura na fermentação endógena.....	78
4.4 Acúmulo e mobilização de trealose e nitrogênio no fermento durante a fermentação do mosto e tratamento do fermento no processo industrial de produção de álcool carburante e anidro.....	95
5. CONCLUSÕES	104
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Efeito de 1 ciclo fermentativo na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação de etanol e trealose no transcorrer do tempo. (b) a variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo.....	48
2 Efeito de 1 ciclo fermentativo na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do pH da suspensão, teor do fermento úmido e seco no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no fermento e no vinho com o tempo.....	49
3 Efeito de 4 ciclos fermentativos na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação de etanol e trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo.....	50

4	Efeito de 4 ciclos fermentativos na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do pH da suspensão, teor do fermento úmido e seco no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no fermento e no vinho com o tempo.....	51
5	Efeito de 1 ciclo fermentativo na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação de etanol e trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo.....	56
6	Efeito de 1 ciclo fermentativo na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do pH da suspensão, teor do fermento úmido e seco no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no fermento e no vinho com o tempo.....	57
7	Efeito de 4 ciclos fermentativos na fermentação endógena em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação de etanol e trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo	58

8	Efeito de 4 ciclos fermentativos na fermentação endógena em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do pH da suspensão, teor do fermento úmido e seco no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no fermento e no vinho com o tempo.....	59
9	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do etanol no transcorrer do tempo, (b) a variação do pH da suspensão com o tempo.....	65
10	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do teor do fermento úmido no transcorrer do tempo, (b) a variação do teor do fermento seco com o tempo.....	66
11	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do nitrogênio no fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no vinho com o tempo.....	67

- 12 Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia.
Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação da trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação do glicogênio com o tempo..... 68
- 13 Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia.
Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, a variação da viabilidade celular no transcorrer do tempo..... 69
- 14 Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia.
Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do etanol no transcorrer do tempo, (b) a variação do pH da suspensão com o tempo..... 70
- 15 Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia.
Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do teor do fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do teor do fermento seco com o tempo..... 71

16	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do nitrogênio no fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no vinho com o tempo.....	72
17	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito do pH inicial na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação da trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação do glicogênio com o tempo.....	73
18	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito do pH inicial na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, a variação da viabilidade celular no transcorrer do tempo.....	74
19	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito de diferentes temperaturas na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação do etanol no transcorrer do tempo, (b) a variação do pH da suspensão com o tempo.....	82

24	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito de diferentes temperaturas na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação de etanol no transcorrer do tempo, (b) a variação do pH da suspensão com o tempo.....	87
25	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito de diferentes temperaturas na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação do teor do fermento úmido no transcorrer do tempo, (b) a variação do fermento seco com o tempo.....	88
26	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito de diferentes temperaturas na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação do nitrogênio no fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no vinho com o tempo.....	89
27	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito de diferentes temperaturas na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação de trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação de glicogênio com o tempo.....	90

28	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito de diferentes temperaturas na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, a variação da viabilidade celular com o tempo.....	91
29	Histograma de algumas etapas do processo de produção de álcool hidratado e anidro na Usina da Pedra	98
30	Amostras de fermento coletadas na Usina da Pedra 24/06/97 Teores de trealose expressa em porcentagem da matéria seca em diferentes pontos no processo de produção de álcool hidratado e anidro, 1 - saída da centrífuga; 2 - cuba de tratamento inicial; 3 - cuba de tratamento final; 4 - 1 hora de alimentação; 5 - 3 horas de alimentação; 6 - final de alimentação; 7 - final de fermentação	99
31	Histograma de algumas etapas do processo de produção de álcool hidratado e anidro na Usina Santa Elisa.....	100
32	Amostras de fermento coletadas na Usina Santa Elisa, 24/07/97 Teores de trealose expressa em porcentagem da matéria seca em diferentes pontos no processo de produção de álcool hidratado e anidro, 1 - saída da centrífuga; 2 - início do tratamento; 3 - final do tratamento; 4 - 1 hora de alimetação; 5 - 3 horas de alimentação; 6 - final de alimentação; 7 - final da fermentação.....	101

33	Amostras de fermento coletadas na Usina Santa Elisa, 24/07/97. Porcentagem de nitrogênio no fermento em diferentes pontos no processo de produção de álcool hidratado e anidro, 1 - saída da centrífuga; 2 - início do tratamento; 3 - final do tratamento; 4 - final de fermentação.....	102
----	---	-----

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Composição elementar de leveduras comerciais e melaços (Harrison, 1971).....	5
2 Concentração de Sais e formulação composta de Vitamina adicionadas ao mosto	37
3 Esquema de análise de variância	41
4 Amostragem em cada tempo para a determinação de etanol, trealose, glicogênio, teor de fermento úmido, matéria seca, viabilidade celular, nitrogênio no fermento e no vinho	41
5 Efeito dos ciclos fermentativos na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio	52

6	Comparação de médias dos ciclos (em 7 tempos) entre os tratamentos na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C	53
7	Efeito dos ciclos na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio	60
8	Comparação de médias dos ciclos (em 7 tempos) entre os tratamentos na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C.....	61
9	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito do pH na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio	75
10	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Comparação de médias de pH entre tratamentos em fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C	76

11	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia Efeito do pH na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento à temperatura de 40°C. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio.....	76
12	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Comparação de médias de pH entre tratamentos em fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C	77
13	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito da temperatura na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio	92
14	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Comparação de médias de temperaturas entre tratamentos em fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido	93

15	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito da temperatura na fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio	93
16	Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Comparação de médias de temperaturas entre tratamentos em fermentação endógena com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento.....	94
17	Fermentação endógena com 30% de fermento a 40°C, amostra do final de fermentação, Usina da Pedra.....	103

FERMENTAÇÃO DE TREALOSE E GLICOGÊNIO ENDÓGENOS EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Autor: LEONEL VASCO FERREIRA

Orientador: Prof. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM

RESUMO

As linhagens PE-2 e VR-1 de *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas à fermentação das reservas endógenas na temperatura de 40°C com fermentos provenientes de 1 ciclo e de 4 ciclos fermentativos. Foi verificado também o efeito de diferentes temperaturas (35, 40 e 45°C) e diferentes pH iniciais da suspensão (2,50, 3,50 e 4,50) à 40°C. No intervalo de 0 a 24 horas foram recolhidas as amostras para a determinação de etanol, pH da suspensão, teor do fermento úmido, matéria seca, nitrogênio no fermento e no vinho, bem como as reservas de carboidratos (trealose e glicogênio) e a viabilidade celular. Foram detectados maiores valores de etanol e nitrogênio no fermento com 1 ciclo fermentativo. Com 35 e 40°C a trealose foi esgotada em 24 horas, mas com a temperatura de 45°C o esgotamento ocorreu em 2 horas na linhagem PE-2 e em 6 horas na linhagem VR-1. Os teores de glicogênio sofreram muitas oscilações ao longo do tempo, entre a mobilização e a síntese e embora não esgotado, deve ter contribuído significativamente para a formação de álcool na suspensão, principalmente em temperaturas altas (40 e 45°C). Foi observado a relação proporcional entre os teores de trealose e a viabilidade celular. No transcorrer da fermentação das reservas de carboidratos houve aumento nos teores de nitrogênio no fermento, entre 2 e 8 horas, sendo tal incremento afetado pelos ciclos fermentativos, temperatura, pH inicial da suspensão e a linhagem de levedura. Este resultado tem reflexos positivos quando da comercialização da levedura seca como proteína microbiana. No prosseguimento da fermentação ocorreu a autólise celular, que foi percebida

pelo aumento brusco de nitrogênio no vinho (de 200 para 1500mg/l) e pela queda da viabilidade celular. O ganho alcançado com a fermentação endógena foi de 40 e 67 litros de álcool por tonelada de levedura seca com incremento de 25 e 27% de proteína no fermento para as linhagens PE-2 e VR-1, respectivamente. Os valores de 20% de trealose no fermento foram encontrados no final da fermentação do mosto na destilaria. Esta concentração da trealose é indispensável para a manutenção da levedura perante as condições estressantes do processo da fermentação industrial.

FERMENTATION OF ENDOGENOUS TREHALOSE AND GLYCOGEN BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Author: LEONEL VASCO FERREIRA

Adviser: Prof. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM

SUMMARY

FERMENTATION OF ENDOGENOUS TREHALOSE AND GLYCOGEN BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. Two *Saccharomyces cerevisiae* strains (PE-2 and VR-1) were subjected to fermentation of its carbohydrate reserve (Trehalose and glycogen) at 40°C using yeast from the first and fourth fermentation cycle. It was observed the effects different temperatures (35, 40 and 45°C), different initial pHs (2,50, 3,50 and 4,50) at 40°C. During a 24 hours interval samples were collected for determination of ethanol, suspension of pH, yeast content and dry, yeast and wine nitrogen, and yeast trehalose, glycogen and cell viability. The endogenous fermentation using yeast from one cycle result in higher ethanol content and higher level of yeast nitrogen. Trehalose was completely exhausted after 24 hours at 35 and 40°C, but at 45°C it was consumed after 2 hours for PE-2 and after 6 hours for VR-1 strain. Glycogen was not completely consumed, but probably contributes for ethanol formation. As trehalose is consumed yeast cell viability decreases, while yeast nitrogen content increase, reaching a maximum between 2 and 8 hours, depending on the temperature, initial pH and yeast strain. If yeast is maintained under prolonged stressing conditions, cell autolysis occurs and nitrogen is lost to the medium, increasing from 200 to 1500 mg/l. Such endogenous fermentation allows a production of 40 to 67 l of ethanol per ton of dry yeast, with yeast nitrogen increasing of 25 and 27% for PE-2 and VR-1,

respectively. Values of up to 20% of trehalose can be found in distillery yeast during the industrial process, and such high trehalose concentration may render yeast tolerant to the stressing factor imposed by the industrial fermentation.

1. INTRODUÇÃO.

O desafio atual dos países em todo mundo é encontrar uma fonte energética renovável de forma a garantir a autosuficiência energética com consequências diretas para o desenvolvimento econômico e social dos mesmos. O desenvolvimento está ligado a energia, sem a qual a atividade humana seria praticamente nula.

No Brasil a produção de etanol é feita através da fermentação do caldo de cana-de-açúcar. Em outros países como os EUA e da Europa outras culturas são utilizadas como fonte de açúcar para a produção de etanol. O etanol é a fonte de energia renovável que pode ser utilizada em diversos setores industriais; sendo assim, a expectativa de sua participação na economia será crescente tendo em vista as vantagens referidas.

Muitos fatores afetam o rendimento da fermentação, os quais foram e continuarão a ser estudados com o objetivo de se otimizar o rendimento do processo.

Muitas dessas pesquisas já orientaram novos procedimentos na condução do processo fermentativo em escala industrial, com subsequente aumento do rendimento da fermentação alcoólica. Tanto assim que algumas destilarias já conseguiram aumentar o rendimento da fermentação para 90-91% com relação ao rendimento teórico, atualmente considerado satisfatório, pelo exercício de um controle sistemático sobre as infecções nas dornas, temperatura do processo, suplementação de nutrientes para a levedura, controle do pH e etc. Mesmo assim uma quantidade significativa de açúcar não

é transformada em etanol, sendo em parte utilizada para a multiplicação excessiva do fermento na dorna bem como a formação dos carboidratos de reserva (trealose e glicogênio), produtos secundários como glicerol, succinato, acetato, lactato, acetona, butanodiol, alcoóis superiores, etc.

Nessa busca constante de altos rendimentos em álcool produzido, torna-se imprescindível conhecer o comportamento metabólico e fisiológico da levedura quando submetida a diferentes ambientes fermentativos.

Com adequação dos parâmetros envolvidos torna-se possível explorar ao máximo a potencialidade genética da levedura em fermentar os açúcares disponíveis inclusive os seus carboidratos de reserva. Estes últimos que constituem objeto de estudo desse projeto, podem responder por 34 a 72% do etanol produzido com a fermentação das reservas e o restante provinha da contribuição de outros constituintes celulares (Basso et al., 1992).

Os carboidratos de reserva da levedura, trealose e glicogênio, chegam a representar até 30% da matéria seca do fermento e seus teores sofrem alterações consideráveis durante a fermentação; deste modo torna-se importante buscar a correlação do acúmulo e mobilização de tais reservas com o rendimento fermentativo.

Algumas evidências sugerem que os teores de trealose têm correlação positiva com a termotolerância e tolerância ao etanol manifestadas por certas linhagens de leveduras.

A produção de etanol se mostra maior (56 e 81 litros/ton de levedura seca, em meios com pH 4,7 e 2,4, respectivamente), quando a levedura apresenta teor inicial elevado de trealose (7,0%). Já a levedura com menor teor de trealose inicial (4,0%) apresenta menor rendimento em etanol (20 l/ton, tanto em pH 4,6 como 2,2) (Amorim et al., 1994). Maiores teores alcoólicos do meio parecem acelerar a mobilização das reservas, mas o rendimento em etanol (que pode ser maior ou menor do que permite a estequiometria das reservas mobilizadas), depende muito das condições

fisiológicas nas quais a levedura inicia o processo. Entretanto faz-se necessária a busca de mecanismos que façam com que o glicogênio seja totalmente mobilizado para aumentar o rendimento em álcool produzido.

Pretende-se avaliar com este trabalho as variáveis ligadas a fermentação endógena como: teor de fermento (matéria úmida e seca), pH da suspensão, nitrogênio no fermento e no vinho, níveis de trealose e glicogênio e a viabilidade celular. Com estes dados será possível criar uma estratégia a uma boa fermentação endógena com o rendimento adequado, com a vantagem de obter o aumento em álcool produzido ao mesmo tempo ter um fermento rico em proteína, cujo o valor comercial se eleva quando for vendida como a levedura seca no final da safra.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Composição Química da Célula De Levedura

A composição química da levedura varia com a linhagem, fase de crescimento e condições físicas e químicas do meio de cultivo (Lima, 1954).

Leveduras de panificação apresentam cerca de 25% de matéria seca (Suomalainen & Oura, 1971), da qual 10% é representada pela trealose, 12% pelo glicogênio, 8% de glucana e 6% de manana (Suomalainen & Pfaffli, 1961; Amorim et al., 1994).

O teor de proteína bruta ($N \text{ total} \times 6,25$), situa-se entre 40 e 56% da matéria seca. Cerca de 80% do nitrogênio encontra-se na forma de aminoácidos, 12% na forma de ácidos nucléicos, 8% como amônia e quantidades menores em compostos como lecitina, glutatona, ácido adenílico, vitaminas e coenzimas (Peppler, 1970).

Os lipídios não excedem 7% da matéria seca (Eddy, 1958), sendo representados principalmente por glicerídios de ácidos graxos, fosfolipídios (lecitina e cefalina) e esteróis (ergosterol) (Gambirásio, 1967).

As cinzas representam de 1,9 a 10% do peso seco da levedura dependendo da linhagem e do meio de crescimento, sendo o fósforo e o potássio, seus maiores componentes (Eddy, 1958).

A Tabela 1 mostra os intervalos relativos às proporções dos elementos em leveduras comerciais, incluindo a de cerveja, panificação e levedura utilizada como alimento animal ou humano (Harrison, 1971).

TABELA 1 - Composição elementar de leveduras comerciais e melaços (Harrison, 1971).

ELEMENTO	LEVEDURA	MELAÇOS
	(g/100g matéria seca)	(g/100 g matéria seca)
C	45 - 77	39 - 41
H	6,0 - 6,5	6,3 - 6,8
O	31 - 32	47 - 50
N	7,5 - 9,0	0,1 - 2,8
K	0,9 - 3,5	0,8 - 5,2
P	1,1 - 2,0	0,01 - 0,9
S	0,3 - 0,5	0,15 - 0,2
Mg	0,15 - 0,5	0,007 - 0,75
Ca	0,04 - 0,9	0,018 - 1,2
Na	0,02 - 0,2	0,82 - 1,4
Zn	0,004 - 0,13	0,0006 - 0,013
Fe	0,003 - 0,10	0,01 - 0,021
Cu	0,002 - 0,012	0,0001 - 0,006
Mn	0,0004 - 0,0035	0,001 - 0,004
Co	0,0005	0,00004 - 0,0001
Mo	0,000005 - 0,000009	0,000009 - 0,000026
Cl	0,004 - 0,1	1 - 3
I	0,00005 - 0,0005	-
Pb	0,0001 - 0,0007	0,0006
As	0,00001	-
Si	-	0,028
Sr	-	0,0005
B	-	0,0002 - 0,0004

2.2 - Efeito Da Temperatura em Células de Leveduras

Linhagens mesofílicas de *Saccharomyces cerevisiae* crescem num intervalo compreendendo uma temperatura mínima de 10°C e máxima de 40°C, estando a temperatura ótima entre 28 e 35°C (Jones et al., 1981).

A manutenção de células em temperatura próxima à máxima leva à alterações bioquímicas nas mesmas. Tais alterações consistem de aumento no requerimento de ácidos graxos para manutenção da rigidez da membrana (Porter & Ough, 1982), aumento acentuado na fração de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (Suomalainen & Pfaffli, 1961), maior sensibilidade ao etanol, diminuições da atividade enzimática e dos teores de proteína, RNA e DNA da célula (Slapack et al., 1987).

Foi demonstrado que a medida que se eleva a temperatura há acentuada diminuição na capacidade respiratória das leveduras. Da mesma forma leva a um aumento na taxa de fermentação (Porter & Ough, 1982).

Têm sido descrito diversos fatores ambientais que atuam sinergisticamente com a alta temperatura. Slapack et al. (1987) demonstraram que o efeito nocivo da alta temperatura sobre as leveduras, é acentuado a pH menos favorável. Os mesmos autores, observaram que células em fase de crescimento exponencial são mais sensíveis à temperatura alta do que aquelas em fase estacionária de crescimento.

Leveduras incubadas à temperaturas acima da ótima apresentam maior requerimento nutricional durante o crescimento. No entanto, células sob jejum, são mais resistentes ao calor do que células em meio rico em nutrientes (Paris & Pringle, 1983).

Lewis & Kuiper (1972) demonstraram que *Saccharomyces uvarum* mantida em suspensão com água a 40°C, não apresentou alteração na viabilidade. Entretanto, a adição de glicose ao meio provocou rápida queda na

viabilidade celular. Tal efeito, segundo os autores, seria decorrente da alteração da membrana citoplasmática por ação combinada da temperatura e absorção do açúcar.

A manutenção de leveduras à temperatura acima da ótima induz a liberação de aminoácidos hidrofóbicos pelas mesmas, os quais atuariam como “termoprotetores”, estabilizando a membrana e aumentando a resistência das células ao calor. Desta forma, segundo Slapack et al. (1987), a maior termotolerância observada por leveduras em suspensão com alta concentração de massa celular, é consequente dos maiores níveis desses aminoácidos “termoprotetores” no meio, atingidos nessas condições.

Investigações correlacionando teor de trealose da célula e sua resistência ao calor, sugeriram que microrganismos termotolerantes produzem mais trealose quando mantidos em temperatura alta, como um mecanismo para prevenir a desidratação, sem que haja necessidade de aumentar a rigidez da membrana (Crowe et al., 1979).

Outro fator relacionado ao crescimento em temperatura alta é a presença de proteínas de choque térmico (H.S.P. - Heat Shock Proteins). Uma breve exposição de células a temperatura acima do ótimo (37°C por 30 minutos) induz uma série de HSP específicas, as quais conferem termoresistência às mesmas. Tal fenômeno parece ser universal, tendo sido observado em *Drosophila*, leveduras e bactérias (Ritossa, 1962; Plesset et al., 1982; Watson & Cavicchioli, 1984).

2.3 - Efeito do pH e Lixiviação de Minerais em *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras, como qualquer outro organismo requerem para seu crescimento uma determinada faixa de concentração de íons hidrogênio no meio, na qual são mantidas a estrutura e atividade de suas moléculas.

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* toleram ampla variação de pH, crescendo entre os limites de 2,5 e 8,5. O índice ótimo de pH obtido para essa levedura aproxima-se de 4,5 (Cooney, 1981).

O pH interno das células de *S. cerevisiae* mostra-se relativamente independente do pH externo, mantendo-se entre 5,8 e 6,3, mesmo quando o pH do meio varia de 3,0 a 7,0 (Jones et al., 1981).

A manutenção do pH intracelular durante o crescimento das leveduras, está relacionada com a excreção de íons H^+ gerados pela absorção de íons NH_4^+ (Cooney, 1981). Tal hipótese foi confirmada por dados experimentais obtidos por Slavik & Kotik (1984), os quais demonstraram que a inibição da translocação de H^+ através da membrana, provocada pelo tratamento das células de leveduras com dietilstibestrol, leva a uma redução do pH interno das mesmas.

A liberação de íons H^+ juntamente com ácidos orgânicos, leva ao abaixamento do pH do meio de suspensão de células, após a alcalinização do mesmo, segundo Janacek (1980). Quando tal suspensão é suplementada com glicose, ocorre uma intensificação no abaixamento do pH demonstrando haver estreita correlação entre a glicose e a liberação de íons H^+ . A liberação de íons H^+ aumenta acentuadamente quando, além da glicose, são adicionados cátions monovalentes à suspensão de leveduras, na sequência $K^+ > Rb^+ > Li^+ = Na^+$ (Sigler et al., 1981).

A associação entre metabolismo de carboidratos e absorção de potássio foi demonstrada por Rothstein & Enns (1946), sendo seus dados corroborados pelos apresentados por Scott et al. (1951). De acordo com esses autores, a inibição da via glicolítica por ácido indol acético, além de bloquear a absorção de potássio, provoca a perda desse elemento pela célula.

A constatação de que a absorção de potássio era acompanhada da liberação de íon H^+ , levou diversos autores a proporem um mecanismo de troca K^+/H^+ entre o meio e a célula (Conway & Downey, 1950; Foulkes, 1956;

Conway & Duggan, 1958). Tal mecanismo de troca envolveria um carreador, atuando como uma bomba de prótons, cujo funcionamento se daria às custas de energia proveniente do metabolismo celular (Conway & Downey, 1950).

Essa hipótese foi suportada por Mitchell (1961), o qual propôs ainda, a presença de atividade de ATPase de membrana criando um potencial eletroquímico necessário para a transferência do íon K^+ para dentro da célula contra gradiente de concentração.

No entanto, Peña (1975), tratando células de levedura com dinitrofenol (D.N.P.), conhecido inibidor da fosforilação oxidativa, observou que a inibição da absorção de potássio ocorreu antes que o ATP das células caísse a níveis críticos. Foi proposto pelo autor que a inibição da absorção de potássio não foi devida à diminuição do ATP, mas sim ao aumento da liberação desse elemento pela célula, observado em tais condições. O efluxo de H^+ da célula durante o experimento, ocorreu através de um mecanismo à parte do transporte de K^+ .

A liberação de H^+ , através do mecanismo distinto de troca direta K^+/H^+ também foi relatada por Kotik & Sigler (1981) e confirmada por Ramos (1985). Este último, submetendo célula de levedura a tratamento com os antibióticos nistatina e anfotericina, obteve inibição na absorção de K^+ antes da inibição da excreção de H^+ . Por outro lado, dinitrofenol inibiu o fluxo do íon H^+ antes de inibir o fluxo do íon K^+ .

Villalobo (1984) estudando transporte de potássio em lipossoma de *Saccharomyces pombe*, observou que ocorria a translocação de íons K^+ e H^+ na ausência de ATP, quando havia um potencial de membrana induzido pelo efluxo de H^+ proporcionado, no experimento, por um condutor de prótons. Na ausência de condutor do íon H^+ e presença de ATP, o potássio interno estimulou a hidrólise do ATP. O autor sugeriu que a translocação do íon K^+ através da membrana apresenta 2 componentes cinéticos diferentes: utilizando o potencial de membrana, gerado pela translocação do íon H^+ e a energia livre

gerada pela hidrólise do ATP. Tais suposições foram confirmadas por Ramos (1985).

A influência do pH do meio sobre o transporte de potássio foi estudada por Rothstein & Bruce (1958). Estes pesquisadores, mantendo leveduras de panificação em suspensão a pH 3,5, na ausência de potássio e em aerobiose, detectaram uma perda de íon K^+ relativamente constante, cuja taxa foi de 10 mM/Kg de levedura/h. Sob anaerobiose, o efluxo de K^+ foi reduzido a 1 mM/Kg/h. Observaram ainda, que esse efluxo apresentava-se menor a 5 ou 15°C do que a 25° ou 30°C. Foi concluído que o efluxo de íon K^+ a pH baixo deve-se ao aumento no influxo de H^+ através da membrana. Estes dados concordam com os obtidos por Conway & Downey (1950) as quais demonstraram que o efluxo de íons K^+ em função do influxo de íons H^+ , envolve movimento de potássio de um meio rico, a célula (0,12 a 0,16 mM/Kg célula) para um meio livre desse elemento, e movimento de íon H^+ de um meio rico (pH 3,5) para um citoplasma pobre em H^+ (pH aproximadamente 6,0).

Estudos cinéticos da translocação de cátion através da membrana, em função do pH do meio evidenciaram dois tipos de efeito do íon H^+ sobre esse processo. A pH de 4,0 a 6,0 o íon atua como inibidor não competitivo da absorção de K^+ . O efeito competitivo, a pH abaixo de 4,0 poderia ser interpretado como interação do íon H^+ com o carreador responsável pelo transporte de K^+ para dentro da célula. Esse carreador, tendo maior afinidade por íon H^+ do que por íon K^+ , transportaria o primeiro para dentro da célula, resultando num acentuado efluxo do segundo. O efeito não competitivo ocorreria como resultado da combinação do H^+ com um segundo sítio do carreador, sendo revertido pelo aumento da concentração de K^+ ou outro cátion metal alcalino no meio (Armstrong & Rothstein, 1964).

Segundo Seaston et al. (1976) a perda espontânea de íons K^+ por células de *Saccharomyces uvarum* em suspensão (pH 4,5 a 30°C e com baixo nível de ATP) chega a 70% do conteúdo total do potássio celular, enquanto

que o pH intracelular cai de 6,2 para 5,7. Semelhante diminuição no pH intracelular foi observada por Rodriguez-Navarro & Ramos (1984) em idêntica condição experimental. Esses autores propuseram uma troca entre o K^+ da célula e o H^+ do meio independente de ATP.

No entanto, estudos realizados por Calahorra et al. (1987), utilizando vesícula de membrana plasmática de levedura, carregada de cloreto de potássio, demonstraram que a adição de ATP ao sistema leva a um aumento no efluxo de K^+ através da membrana, gerando um potencial de membrana o qual dirigiria o influxo de outros íons, com auxílio do carreador de cátions monovalentes.

Além do potássio, o fluxo de cálcio em células de *Saccharomyces cerevisiae* também mostra-se influenciado pelo pH do meio. De acordo com Eilam (1982), células crescidas em meio com ^{45}Ca , quando mantidas em meio a pH 5,0 (tampão, glicose e ausência de cátions) lixiviaram 20% do cálcio celular até a segunda hora do experimento, não havendo diminuição desse elemento nas células nas 24 horas subsequentes.

Quando o pH do meio foi 7,5 a liberação do ^{45}Ca foi menos intensa nas duas primeiras horas, porém, aumentou no período entre 2 e 24 horas de ensaio. Foi sugerido pelos autores, que a liberação de cálcio ocorrida logo no início, a pH 5,0, foi devido à troca Ca^{2+}/H^+ através de membrana plasmática. O cálcio liberado na segunda fase (entre 2 e 24 horas) corresponderia àquele sequestrado em organelas celulares, possivelmente vacuolos, e sua liberação seria mediada por mecanismos distintos da troca por íon H^+ .

Leveduras em suspensão com água destilada, excretam sódio lentamente, acompanhado por ânions como bicarbonato e succinato (Conway & Downey, 1950).

O efluxo de sódio das células, da mesma forma que o potássio, está ligado ao seu potencial de oxi-redução o qual seria responsável por

fornecimento de energia ao sistema de transporte modulado por carreador (Conway & Kernan, 1955; Foulkes, 1956). Entretanto, a liberação de sódio por células em suspensão em água, só ocorre quando estas foram crescidas em meio rico em sódio, ao contrário do que ocorre com potássio, cuja liberação ocorre em células sem nenhum enriquecimento prévio (Foulkes, 1956).

Leveduras crescidas em meio rico em sódio, quando mantidas em meio contendo fósforo inorgânico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), sempre perdem sódio e absorvem fósforo, quer na presença ou ausência de glicose ou potássio. Em meio com ausência de glicose, o fósforo absorvido é acumulado na célula na forma de fósforo inorgânico ou na forma de açúcar fosfato, não se incorporando à reserva de polifosfato.

A não formação de polifosfato, possivelmente decorreria do requerimento do P_i no processo metabólico, a partir do qual seriam formados os ânions liberados juntamente com o sódio (Hoefeler et al., 1987).

Gomes (1988) em trabalho de sua tese observou a liberação de elementos minerais (P, K, Ca e Zn) pelas leveduras e aumento do pH do meio em função do aumento da temperatura e tempo de tratamento da suspensão. Sublinhou por outro lado que durante os tratamentos (pH 2,0, 2,5 e 3,0; temperaturas $\pm 25^\circ\text{C}$, 30°C e 40°C ; 30 e 40% de células; intervalo de tempo 0:00, 1:30, 3:00 e 6:00 horas) não ocorreu consumo considerável de reservas, no entanto, com a temperatura de 30°C houve acúmulo de trealose pelas leveduras. À temperatura ambiente a mesma autora constatou menores perdas de fósforo e potássio pelas células. As maiores perdas desses elementos foram observadas nos tratamentos a 40°C .

Ainda segundo Gomes (1988) quanto mais baixo o valor do pH do meio (pH da suspensão de células) maior a perda de potássio e nitrogênio e menor a perda de cálcio pelas células. O tratamento das leveduras a 40°C refletiu em maiores porcentagens de AR e glicerol nos vinhos resultantes das fermentações realizadas a partir destas células. As fermentações realizadas

com esta temperatura apresentaram os menores rendimentos médios, possivelmente como consequência da maior produção de glicerol e menor eficiência na utilização do açúcar do mosto, revelada pela maior porcentagem de açúcar redutor residual dos vinhos. A produção de glicerol pelas leveduras é influenciada por seus teores de fósforo e potássio no início do ciclo fermentativo, sendo o teor adequado do primeiro elemento uma situação desfavorável a produção de glicerol enquanto que o segundo elemento seu aumento, contribui para o incremento de glicerol nos vinhos no final da fermentação. A autora concluiu que os teores ótimos de fósforo no início da fermentação são preponderantes a bons rendimentos fermentativos.

No que concerne as reservas, a mesma autora obteve uma correlação linear positiva entre as porcentagens de fósforo e teores de trealose e glicogênio das leveduras, já o cálcio mostra correlação negativa com teores de trealose das mesmas.

2.4 - Reservas de Carboidratos em *Saccharomyces cerevisiae* suas Funções e Metabolismo

2.4.1 - Glicogênio

O glicogênio, extraído pela primeira vez em 1857 por Claude Bernard, foi estudado posteriormente por Meyer em 1943 (Leão, 1972). Este autor propôs um modelo para a molécula, o qual consistia de unidades de glicose ligadas através de ligações glicosídicas α (1 - 4) e α (1 - 6), obedecendo a uma regularidade de cadeias de dois tipos, A e B. As cadeias do tipo A se ligavam à molécula por ligações α (1-6), não sofrendo ramificações e sendo sempre exteriores. As cadeias do tipo B, ou cadeias

principais, seriam constituídas por ligações α (1-4) e ramificadas por cadeias do tipo A.

O modelo físico-químico do glicogênio proposto por French (1964), consiste numa molécula com forma esférica, capaz de conter em sua superfície, uma enorme quantidade de cadeias A e B, cujo peso molecular é cerca de 2×10^7 na forma anidra e 4×10^7 quando hidratado.

As moléculas de glicogênio apresentam pequenas variações em suas propriedades e estruturas de acordo com a fonte biológica de origem, sendo possível diferenciá-las a partir de suas características físico-químicas. Assim, no fracionamento do glicogênio proveniente de levedura de panificação por eletrodialise e por β -amilase, obtém-se 2 frações: uma maior (73% da molécula) relativamente insolúvel em água e com um limite de hidrólise por β -amilase de 46%; e outra fração menor e mais solúvel (27%), da qual, 49% é convertida em isomaltose (Jean, 1944 citado por Leão, 1972). A análise de várias amostras de glicogênio animal tem revelado um limite de hidrólise por β -amilase de 32 a 54%.

Estudos sobre o glicogênio de leveduras, realizadas por Ling (1925) citado por Northcote & Horne (1952) ressaltaram a existência de dois tipos de glicogênio. Um primeiro tipo, estaria contido no material solúvel da célula, enquanto um segundo tipo estaria fisicamente acoplado a uma membrana de glucana, sendo insolúvel (Northcote & Horne, 1952).

Por outro lado, o método de extração de carboidratos de leveduras por processo de fracionamento, apresentado por Trevelyan & Harrison (1954) levam à distinção de uma fração de glicogênio alcali e outra ácida solúvel. Entretanto, conforme constatado por Berck & Rothstein (1957) os dois tipos de glicogênio (solúvel e insolúvel) são quimicamente iguais sendo a fração ácida solúvel apenas um artefato da extração alcalina, desaparecendo quando se utiliza alcali forte para a extração.

Foi demonstrado por Smith & Smith (1974) que a obtenção de protoplasto de *Saccharomyces cerevisiae*, leva a uma drástica redução na fração insolúvel do glicogênio, mesmo quando foi utilizado glutaraldeído (substância que impede o metabolismo endógeno desse polissacarídeo), enquanto que a fração solúvel permaneceu constante. Os autores concluíram que a fração insolúvel do glicogênio estaria contida no espaço periplasmático, ligado a um componente insolúvel da parede e não envolto por membrana como sugerido por Northcote & Horne (1952).

Além da diferenciação física do glicogênio, foi proposta uma diferenciação metabólica para a molécula. Estudos cinéticos sobre o metabolismo endógeno do glicogênio revelaram que as cadeias externas da molécula são metabolizadas por fermentação endógena, enquanto que as cadeias internas, são mobilizadas por via oxidativa (Eaton, 1961).

2.4.2 - Biossíntese de Glicogênio

A biossíntese de glicogênio requer duas enzimas distintas, uma responsável pela formação de ligações glicosídicas α (1-4) e outra pela formação de ligações α (1-6).

O clássico trabalho de Leloir & Cabid (1953) estabeleceu que as ligações α (1-4)-D-glicose da molécula de glicogênio são resultantes de sucessivas transferências de resíduos de glicose da uridina - difosfato - glicose para o polissacarídeo aceptor. A reação não é reversível e é catalizada pela enzima glicogênio - UDP - glicosil transferase. Enzima semelhante foi isolada de levedura de panificação, por Algranati & Cabid (1962).

A cadeia linear de ligações α (1-4) - glicose, são interligadas através de ligações glicosídicas α (1-6) catalizadas por uma enzima ramificadora. Esta enzima, extraída pela primeira vez a partir de levedura de panificação por

Knolberg & Manes (1936) (citado por Leão, 1972), “in vivo” atua de maneira alternada com o glicogênio sintase, constituindo uma molécula com estrutura multiramificada.

Em resumo a biossíntese de glicogênio envolve os seguintes passos:

- a) fosforilação da glicose pela hexoquinase;
- b) conversão da glicose -6- fosfato em glicose -1- fosfato;
- c) formação da uridil - difosfato - glicose pela pirofosforilase;
- d) ação combinada da glicogênio sintase e enzima ramificadora.

2.4.3 - Regulação da Biossíntese de Glicogênio.

A regulação da biossíntese de glicogênio estudada por Rothman & Cabid (1969) em leveduras, é feita por ativadores como a glicose-6-fosfato (G.6.P.); ATP e inibidores alostéricos como íons Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} .

Trabalho realizado posteriormente pelos mesmos pesquisadores (Rothman & Cabid, 1969) mostrou que a síntese de glicogênio em levedura é totalmente inibida pela adição de íons NH_4^+ . Segundo os autores, a adição de NH_4^+ não leva à inibição da glicogênio sintase, nem altera a relação ATP/ADP da célula, mas sim, leva à desinibição da fosfofrutoquinase, baixando o nível celular de G.6.P. Concluíram que a glicogênio sintase só é ativa quando os níveis de G-6-P o permitem.

Leveduras crescendo em meio com baixo nível de nitrogênio assimilável apresentam acentuada síntese de reservas (Brandt, 1941; Trevelyan & Harrison, 1956; Suomalainen & Pfaffli, 1961; Lillie & Pringle, 1980). Foi observado ainda, que quando as células são privadas de outros nutrientes como enxofre e fósforo, acumulam grande quantidade de carboidratos de reserva, sugerindo que tal acúmulo é uma resposta geral à limitação de nutrientes (Lillie & Pringle, 1980).

Entretanto, estudos sobre o controle da síntese de glicogênio durante o crescimento de levedura, levam à conclusão de que, além dos níveis de nutrientes e metabólitos, a biossíntese é dependente da interconversão da glicogênio sintase da forma fosforilada inativa (D) para a forma fosforilada ativa (I) (Rothman & Cabid, 1970). Esta interconversão é feita pela remoção do grupamento fosfato da forma D pela enzima proteína-fosfatase Mg^{2+} dependente, a qual é regulada pelos níveis de G-6-P. A reação oposta (I-D) requer Mg^{2+} e ATP.

Leveduras cultivadas em meio com baixo nível de glicose e alimentação lenta, possuindo baixo nível de ATP, apresentam síntese de glicogênio durante o crescimento exponencial a qual é interrompida no final da fase de crescimento quando o nível de ATP é alto, iniciando então a quebra dessa reserva (Grba et al., 1975).

Entretanto, células de leveduras crescendo em meio com concentração de glicose mais elevada, apresentam a interconversão da glicogênio sintase da forma D para a forma I somente no início da diauxia (exaustão da glicose do meio), obedecendo a um modelo de repressão catabólica. Foi sugerida a existência de dois sistemas regulatórios da biossíntese, um através de controle metabólico e outro por controle da interconversão das 2 formas da enzima (Becker, 1978).

Leão et al. (1984) utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes susceptibilidades à repressão catabólica, obtiveram modelos idênticos de acúmulo de glicogênio nas diferentes linhagens. A biossíntese de glicogênio foi lenta durante o crescimento exponencial, acentuando-se após ter diminuída a concentração de glicose no meio e o crescimento ter cessado. A quantidade final de glicogênio foi sempre maior nas células parcialmente derreprimidas. Concluíram, os autores, que a repressão catabólica não interfere no modelo de acúmulo de glicogênio, mas sim na quantidade do glicídeo acumulada.

Durante o ciclo fermentativo, leveduras de panificação apresentam um modelo de acúmulo de glicogênio característico, envolvendo 3 fases distintas. A primeira ocorre rapidamente após a alimentação, caracterizada por intensa mobilização de glicogênio existente na célula, consumo de oxigênio e síntese de lipídeos. Uma segunda fase, correspondendo à maior parte do ciclo, resulta em acúmulo de glicogênio pelas células. Ao final desta, já completada a fermentação, inicia-se uma terceira fase, caracterizada pela mobilização parcial do glicogênio armazenado, embora mais lentamente que na primeira fase (Berck & Rothstein, 1957).

Além dos fatores bioquímicos, os fatores inerentes ao meio de crescimento influem direta ou indiretamente no metabolismo das reservas de carboidratos da célula.

A velocidade de crescimento está diretamente ligada à mobilização e síntese das reservas, as quais são mais intensamente mobilizadas quanto maior for a taxa de crescimento (Kuenzi & Fiechter, 1972; Panek & Bernardes, 1983). Nessas condições, a trealose desaparece rapidamente das células, porém o glicogênio diminui mais lentamente. Com base nesses dados, Kuenzi & Fiechter (1972) concluíram que um mecanismo regulatório permitiria o fluxo direto da glicose entre as vias catabólicas e anabólicas, ativadas em tempos diferentes. Esse mecanismo envolveria atividade específica da UDPG-pirofosfatase (catalizando a formação de UDPG) e da glicogênio fosforilase, responsável pela quebra do glicogênio.

O crescimento anaeróbico (Chester, 1963; Mandl & Piendl, 1973) leva ao maior acúmulo de carboidratos de reserva por linhagens de *S. cerevisiae*, do que o crescimento aeróbico (40% e 10% do peso seco, respectivamente). Entretanto, resultados opostos foram obtidos para levedura de panificação (Suomalainen & Pfaffli, 1961; Grba et al., 1975). A temperatura mais favorável para síntese de glicogênio, segundo Grba et al. (1975), foi 30°C para leveduras de panificação e 7°C para levedura de cervejaria.

2.4.4 - Catabolismo de Glicogênio.

Em células animais, a degradação do glicogênio é controlada pelo nível de AMPc (adenosina - 5 - monofosfato cíclico e realizada pela enzima fosforilase existente em duas formas interconvertíveis: a forma fosforilada ativa (fosforilase a) e a forma defosforilada inativa (fosforilase b). A remoção do grupo fosfato da fosforilase a é feita por ação de uma fosforilase sendo a fosforilase b resultante, refosforilada por uma fosforilase quinase, ativada pelo AMPc. No entanto, segundo Sagartia et al. (1971) citados por Gomes (1988), a enzima glicogênio fosforilase em leveduras, não é AMPc sensível, não ocorre em duas formas (a e b), sendo inibida competitivamente, “in vitro”, pela G-6-P, UDP glicose e glicose. Porém, estes metabólitos não regulam a atividade da fosforilase “in vivo”. Foi sugerido que a não atuação dos inibidores competitivos “in vivo” deve-se ao fato da fosforilase estar ligada de maneira saturada às partículas de glicogênio, uma vez que a concentração de grupos terminais na molécula é bastante elevada.

2.4.5 Trealose

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose ligadas pelo carbono anomérico, ligação $\alpha . \alpha$.

Descoberta em 1832 por Wiggers, no centeio espigado, foi cristalizada em 1925 por Koch & Koch, após extração a partir de levedo de panificação (Panek, 1975).

Trealose encontra-se amplamente distribuída na natureza, tendo sido isolada de bactérias, algas, fungos, insetos, nematóides, anelídeos e vegetais. Nestes organismos, a trealose está envolvida com os mais diversos mecanismos. Em micobactérias, a trealose aparece associada com outras substâncias formando glicolipídeos, sulfolipídeos e polissacarídeos importantes na composição da parede celular e muitas vezes relacionada com a antigenicidade. Nos insetos, é observada na hemolinfa, ocorrendo em todos os estágios e atuando, nos adultos, como reserva para o voo (Charlab, 1983).

2.4.5.1 - Biossíntese da Trealose

O mecanismo de biossíntese de trealose, descrito por Cabid & Leloir (1958) para levedura de cervejaria, envolve a transferência do resíduo de D-glicose do nucleotídeo UDP - glicose para a glicose-6-P, por ação da enzima trealose-6-fosfato sintase, formando trealose-6-fosfato e uridina fosfato. O grupo fosfato da trealose-6-P é removido por uma fosfatase específica (trealose-6-P fosfatase) liberando a trealose.

A presença de fosfatase muito ativa, retirando o produto intermediário da reação (trealose-6-P) consiste, provavelmente, num mecanismo de estímulo à síntese da trealose (Panek, 1962).

A enzima sintase exibe atividade máxima a pH 6,6, na presença de 25 mM de Mg^{2+} (Cabid & Leloir, 1958). O papel do íon Mg^{2+} na reação depende da sua concentração no meio. Em baixa concentração (menos que 12mM) o Mg^{2+} liga-se à glicose-6-P formando o complexo G-6-P- Mg^{2+} , que constitui-se num melhor substrato para a enzima do que o éster livre. Com o aumento da concentração de magnésio e mantendo-se a concentração de G-6-P, o cátion interage diretamente com a enzima acarretando a inibição da reação de síntese da trealose (Oestreicher & Panek, 1982).

2.4.5.2 - Regulação da Biossíntese de Trealose

Elander (1969) estudando a atividade da enzima trealose-6-fosfato sintase em leveduras, demonstrou que os nucleotídeos Uridina-5-pirafosfato são inibidores competitivos de UDP-Glicose na reação. Em pesquisas posteriores, foi constatado que essa enzima também é inibida por 20 mM de fosfato inorgânico e trealose-6-P. A trealose livre não apresentou efeito sobre a enzima “in vitro” (Elbein, 1974).

O metabolismo da trealose em leveduras durante o crescimento aeróbico em meio complexo, segue um modelo para mobilização e biossíntese, característico para cada fase do crescimento. Logo após a inoculação (lag fase) há uma rápida quebra da trealose, a qual permanece em baixo nível até o final da primeira fase do crescimento logarítmico (início da diauxia) quando então inicia-se a ressíntese da trealose (Brandt, 1941; Trevelyan & Harrison, 1956; Suomalainen & Pfaffi, 1961; Panek, 1962; Kuenzi & Fiechter, 1972; Plaat, 1974). A mobilização da trealose observada na fase lag é acompanhada por liberação de CO₂ (Panek, 1963) e independe da concentração de glicose do meio (Vasconcellos & Panek, 1978). Entretanto, quando as células são colhidas na fase de crescimento logarítmico e reinoculadas em meio fresco contendo glicose, acumulam grande quantidade de trealose, sugerindo que a síntese ou degradação desse glicídeo estão relacionadas com o estado fisiológico das células (Vasconcellos & Panek, 1978).

Durante a fase de crescimento exponencial sob aerobiose, ocorrem síntese e mobilização simultâneas da trealose, resultando na pequena quantidade dessa reserva armazenada nessas condições. Por outro lado, durante o crescimento das leveduras, há ativação na síntese de aminoácidos, a qual passaria a competir pelo metabólito intermediário comum, a UDP-glicose, em detrimento da síntese de trealose (Trevelyan & Harrison, 1954; Panek, 1962). A possível competição entre as vias de biossíntese de trealose e

aminoácidos foi suportada por dados apresentados por Trevelyan & Harrison (1954). Estes autores observaram que em meio completo em nutrientes, as células de leveduras acumulam mais aminoácidos e menos trealose, sendo o inverso obtido na ausência de nitrogênio.

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

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

Avigad (1960) constatou a ocorrência de um rápido “turnover” de trealose, numa taxa de 5 moles de glicose/minuto/g de matéria seca de levedura. O autor sugeriu que nessas condições operaria um sistema ativo de síntese e quebra de trealose. Leão (1972) observou a existência de síntese de trealose em leveduras mantidas em condições não proliferantes, a partir de glicose como fonte externa de carbono.

Células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam intenso acúmulo de trealose durante a diauxia (Panek, 1962). Somente células colhidas após o final da primeira fase de crescimento exponencial sintetizam trealose quando mantidas em condições não proliferantes, indicando um possível controle da trealose sintase através de repressão catabólica (Panek, 1975). A mesma autora propôs que além da liberação da repressão catabólica, uma mitocôndria operante seria pré-requisito para a síntese desse glicídio.

A transferência de leveduras em estágio final de crescimento anaeróbico para uma condição aeróbica, leva ao aumento no teor de trealose das mesmas (Brandt, 1941). Trabalhos posteriores também evidenciaram maior acúmulo de trealose em células em crescimento aeróbico em relação àquelas crescidas sob anaerobiose (Suomalainen & Pfaffli, 1961; Gbra et al., 1975).

Células crescidas em anaerobiose, acumulam igual quantidade de trealose quando mantidas em condições não proliferantes, em presença de glicose, sob aerobiose ou semianaerobiose. Entretanto, a aeração proporciona uma síntese mais rápida do glicídeo. Tal fenômeno foi caracterizado como consequência da transformação das mitocôndrias, precursoras, formadas durante o cultivo anaeróbico, em mitocôndrias desreprimidas (Panek, 1975).

Grba et al. (1975) determinaram uma temperatura ótima de 45°C para a biossíntese de trealose. Durante o crescimento a 30°C, o mecanismo de mobilização e síntese dessa reserva obedece ao modelo descrito anteriormente. Porém a 37°C ocorre síntese de trealose durante o crescimento exponencial.

A influência do pH do meio sobre a síntese de trealose em leveduras, foi estudada por Barwell & Brunt (1969). Os autores observaram inibição da síntese quando o pH do meio foi menor que 4,5, embora tenha ocorrido absorção de glicose pelas células numa faixa de pH de 2,0 a 8,0. Foi sugerido uma alteração na atividade da trealose sintase, decorrente da alteração do pH intracelular.

2.4.5.3 - Catabolismo de Trealose

Em *S. cerevisiae*, é conhecida somente uma enzima capaz de hidrolisar a ligação glicosídica da molécula de trealose, a trealase (α . α . trealose-1-D-glicoidrolase).

A trealase foi detectada pela primeira vez em 1893, por Bouquelot, no fungo *Aspergillus* (Charlab, 1983).

O pH ótimo para atuação da enzima varia de 3,7 a 7,5 e o K_m está entre 20 mM a 400 mM nos diferentes organismos. Em alguns seres, a trealase é encontrada na fração solúvel, enquanto que em outros, ligada à membranas (Elbein, 1974). Tais oscilações no comportamento da enzima podem estar relacionadas com o papel fisiológico de seu substrato num determinado sistema biológico.

A enzima trealase e seu substrato, em leveduras de panificação, estão separados fisiologicamente, encontrando-se a primeira, solúvel no citoplasma, enquanto o segundo aparece ligado à membrana (Souza & Panek, 1968).

A purificação parcial da trealase de leveduras de panificação realizada por Souza & Panek (1968) revelou um pH ótimo para a atuação da enzima de 5,7 e um K_m de $4 \times 10^{-4} M$. Ortiz et al. (1983) utilizando outra cepa de *S. cerevisiae* obtiveram um pH ótimo de 6,0 e um K_m de $5,62 \times 10^{-3} M$.

Embora o pH ótimo para a trealase tenha sido sempre caracterizado como sendo menor que 6,0, Kelly & Catley (1976) observaram que a elevação do pH do meio até 7,0 provocava, "in vitro", um aumento na atividade da enzima de até 7 vezes.

Foi proposto posteriormente por Wienken & Schllenberg (1982) a existência de uma trealase ativa a pH 5,0, a qual estaria contida em vacúolos e outra trealase ativada por AMPc, presente no citosol. Essa hipótese foi confirmada para AMPc, presente no citosol por Londesborough & Varimo (1984), quando identificaram uma trealase C, com pH ótimo de 6,7 e requerimento de Ca^{++} , Mn^{++} e AMPc para sua atividade e trealase V, com pH ótimo de 4 a 5, sem exigência de íons bivalentes para sua ativação. Esta última corresponde à trealase vacuolar e só é ativada em condições que não

permitem a atuação da trealase C. Essa ativação é realizada através de proteases (Harris & Cotter, 1987).

A regulação da enzima trealase pelo nível de AMP-3'-5'-cíclico da célula, foi demonstrada por Plaat (1974). Ele observou que durante a fase lag, que precede o crescimento, há intensa degradação da trealose coincidindo com o aumento na concentração do AMPc da célula, o qual retorna a um nível básico quando cessa a degradação.

Estudos "in vitro" revelam que uma concentração de 0,1 mM de AMPc, em pH 7,0 a 30°C, leva a ativação de 50% do total da enzima (Plaat, 1974).

O mecanismo de ativação da enzima trealase pelo AMPc consiste num sistema em cascata AMPc dependente, envolvendo uma proteína quinase, ATP e Mg^{2+} (Chvojka et al., 1981; Ortiz et al., 1983).

Numa revisão sobre regulação do metabolismo da trealose Panek (1975) concluiu que um mesmo mecanismo de fosforilação, regulando enzimas envolvidas na síntese e degradação da trealose, levaria, em condições de predominância de fosforilação, à quebra do glicídio, enquanto que em condições opostas, resultaria no acúmulo do mesmo.

2.4.6 - Metabolismo de Glicogênio e Trealose em Condições não Proliferantes e de Estresse

Células de leveduras podem apresentar de 1% a 23% de seu peso seco como glicogênio e trealose, dependendo das condições ambientais e do estágio de seu ciclo de vida (Chester, 1963; Rothman & Cabid, 1970; Kuenzi & Fiechter, 1972).

Esta ampla variação no conteúdo das reservas de carboidratos sugere que ambas exercem importantes funções durante o ciclo de vida das

células, estando relacionadas com a manutenção, diferenciação e sobrevivência das mesmas (Panek et al., 1990).

Há evidência que estes glicídeos funcionem como fonte de carbono e energia para leveduras sob condições de jejum (Fales, 1951; Eaton, 1960; Chester, 1963; Panek, 1963); durante adaptação respiratória (Quain & Hawlam, 1979; Lillie & Pringle, 1980); na formação e germinação de esporos (Rousseau, 1972; Kane & Roth, 1974; Colonna & Magee, 1978; Fonzi et al., 1979; Panek & Bernardes, 1983); em células vegetativas por ocasião de transferência da fase estacionária para meio fresco (Pringle, 1975; Vasconcellos & Panek, 1978); e em células em mitose sob limitação de carbono e energia (Von Meyenburg, 1969; Kuenzi & Fiechter, 1972).

O comportamento dos carboidratos de reserva durante o crescimento de leveduras tem sido amplamente estudado. Entretanto, a utilização destas reservas pelas células, na ausência de qualquer substrato, tem sido objetivo de inúmeros trabalhos, por vezes conflitantes, deixando diversos aspectos em aberto.

O consumo de oxigênio ou produção de etanol e dióxido de carbono a partir das reservas de carboidratos constituem processos que se denominam respectivamente, respiração e fermentação endógena. Stier & Stannard (1936a), estudando a taxa respiratória de duas linhagens de *S. cerevisiae* cultivadas aerobicamente, revelaram que em meio sem nutrientes, houve um período de constante consumo de O_2 e produção de CO_2 ($Q/R=1$), característica de células com amplo material de reserva. Esse quociente respiratório ($=1$) manteve-se durante a maior parte do ensaio, declinando quando a taxa respiratória decresceu para aproximadamente $\frac{1}{4}$ do seu valor inicial, tornando-se então, proporcional à concentração do substrato, possivelmente o glicogênio. Concluíram os autores, que as leveduras são incapazes de fermentar suas reservas, e que o catabolismo destas se deu por

mecanismo puramente aeróbico, distinto daquele envolvido no metabolismo do substrato externo (Stier & Stannard, 1936b).

Resultados obtidos por Spiegelman & Nozawa (1945) concordaram com os apresentados por aqueles autores no que se refere à via puramente oxidativa para a mobilização das reservas, porém, afirmaram que o metabolismo endógeno segue o mesmo mecanismo postulado para a respiração do substrato exógeno.

A primeira evidência de fermentação endógena em leveduras foi divulgada por Brady et al. (1961). Estes autores constataram uma pequena queda nas reservas de carboidratos acompanhada por formação de etanol e CO_2 , quando as células eram mantidas em anaerobiose. Entretanto, foi Chester (1959a) quem demonstrou que em linhagens de *S. cerevisiae* as reservas de carboidratos eram degradadas por processo fermentativo durante a ausência de nutrientes, sob aerobiose ou anaerobiose. Como resultado dessa fermentação, observou-se uma queda de 50% do conteúdo total de carboidratos (glicogênio + trealose) num período de 5 horas. Em ensaio sob anaerobiose, o decréscimo de teor de carboidratos foi de 85 a 100% da quantidade calculada para a liberação de CO_2 .

O etanol acumulado correspondeu a cerca de 70% da quantidade esperada de CO_2 . Sob aerobiose a fermentação endógena evidenciou-se por alto quociente respiratório inicial e produção de etanol, o qual foi acumulado por 2 horas, desaparecendo a seguir, do sistema. Em ensaios posteriores foi verificado que a presença de oxigênio no meio estimula a fermentação endógena (Chester, 1959b).

Eaton (1960), mantendo células de *S. cerevisiae* em suspensão com tampão fosfato, em aerobiose, constatou a liberação de CO_2 a partir de reservas endógenas, caracterizada por dois processos de primeira ordem ocorrendo simultaneamente.

Considerando que sob aeração, apenas o teor de glicogênio diminuiu enquanto a trealose permaneceu inalterado, concluiu-se que nesta condição apenas o polissacarídeo é metabolizado. No entanto, quando a suspensão foi mantida em anaerobiose, houve produção de etanol equivalente à liberação de dióxido de carbono, com consistente consumo de glicogênio e trealose.

Foi inferido que o glicogênio constitui duas formas metabolicamente distintas, sendo uma dessas metabolizada por via oxidativa e outra por via fermentativa. A trealose foi metabolizada somente por via fermentativa. Ainda segundo Eaton (1960) os lipídeos não tiveram nenhuma atuação como substrato para respiração endógena, como seria suposto a partir dos resultados apresentados por Stickland (1956).

Em ensaios posteriores, foi demonstrado que a forma de glicogênio fermentativo corresponderia à glicose das cadeias externas da molécula, sendo a cadeia central a forma oxidável (Eaton, 1961). A não metabolização da trealose por oxidação endógena, também observada por Wilson & Mcleod (1976), difere dos resultados obtidos por Páca (1981a). Segundo esse autor, leveduras de panificação, suspensas em solução de cloreto de sódio (0,9%), em aerobiose, iniciam a mobilização de trealose após 10 horas de "jejum" a pH 5,5 e após 16 hs a pH 4,4. Após 32 horas, os teores de glicogênio e trealose das células atingiram 33% e 27%, respectivamente, dos seus teores iniciais. Leveduras crescidas sob condições aeróbicas, apresentam menor atividade respiratória e menor consumo de reservas quando mantidos em meio sem nutrientes, do que aquelas crescidas anaerobicamente. O maior consumo de reservas apresentado por leveduras provenientes de crescimento anaeróbico possivelmente foi devido às maiores exigências de carbono e energia provocadas pelo fenômeno de adaptação respiratória observado nessas células (Chester, 1963; Wilson et al., 1977). Esta hipótese encontra argumentos nos resultados apresentados por Kovac et al. (1967), os

quais observaram que as quantidades de fosfolipídeos, ácidos graxos e esterol nas células, aumentam durante a adaptação respiratória, ao mesmo tempo em que ocorre a transformação da estrutura pró-mitocôndria em mitocôndria ativa.

De acordo com Chester (1963), leveduras crescidas anaerobicamente mobilizam 63% de seu conteúdo de trealose e glicogênio em 5 horas de jejum aeróbico. Foi verificado que o etanol e acetato liberados ao meio, durante esse período, tenderam a desaparecer da suspensão. O oxigênio consumido durante o experimento foi suficiente para oxidar apenas 50% do acetato consumido do meio. O autor sugeriu que o acetato não oxidado foi utilizado na síntese de material celular, conforme demonstrado por Smedley-Mclean & Hoffert (1923) em leveduras de cervejaria.

Segundo Páca (1981b), a produção de etanol a partir de fermentação endógena em leveduras de panificação, tende a diminuir após um período de 6 horas de jejum aeróbico. Durante esse período haveria indução das enzimas envolvidas nos ciclos do ácido tricarboxílico, glioxilato e cadeia respiratória. Uma vez ativada a via oxidativa, as células passariam a utilizar o etanol como fonte de carbono e energia.

Com a redução da concentração de etanol no meio (após 10 horas de jejum), iniciou-se intensa degradação dos carboidratos de reserva, com manutenção de uma baixa atividade respiratória. Após 32 horas de jejum houve interrupção da quebra das reservas, com acentuada formação de acetato. Como a taxa de oxidação de etanol manteve-se constante durante esse período, o autor sugeriu que a formação de acetato estaria relacionada com a variação nos níveis de etanol e acetaldeído intracelular e seria o mecanismo pelo qual a célula balancearia sua razão NAD/NADH e reduziria sua atividade metabólica endógena.

Leveduras de panificação, após crescimento aeróbico, não metabolizam suas reservas por um período de 2 horas em ausência de

nutrientes, sob anaerobiose, ao contrário, acumulam trealose e glicogênio na proporção 5:1 (Panek, 1963).

Segundo Panek (1975) a síntese de trealose nessas condições só é observada quando as células apresentam mitocôndrias ativas. Por outro lado, a diminuição do conteúdo de aminoácidos (Oura & Tanner, 1971; Panek, 1975) e a presença das enzimas isocitrato liase, piruvato carboxilase e frutose difosfatase ativas nessas células (Divjak & Mor, 1973) sugerem uma via neoglicogênica para a síntese de trealose durante o jejum. A formação de esporos em leveduras, considerada uma resposta à condição de estresse, é precedida de intenso acúmulo de trealose (cerca de 18 vezes o valor original) e glicogênio (ROTH, 1970). Durante a fase de amadurecimento dos esporos, ocorre mobilização do glicogênio acumulado, por ativação da enzima amiloglucosidase, responsável pela glicogenólise nestas condições (Kane & Roth, 1974; Colonna & Magee, 1978). A germinação desses esporos é caracterizada pela quebra da trealose (Panek & Bernardes, 1983). Linhagens mutantes de *S. cerevisiae*, impossibilitadas de acumular glicogênio, não esporulam, enquanto que esporos de mutantes que não acumulam trealose são incapazes de germinar. Desta forma, foi designada a função específica do glicogênio no processo de formação de esporos, enquanto que a trealose atuaria na germinação dos mesmos (Panek & Bernardes, 1983). Diversos pesquisadores têm relacionado a estabilidade das células com seus teores de carboidratos de reserva.

Estudos comparando perda de viabilidade durante jejum aeróbico, entre células crescidas aeróbica e anaerobicamente, revelaram que a viabilidade em ambos os tipos permanece alta por 24 horas. Porém, após esse período, o decréscimo na viabilidade é maior nas células crescidas em anaerobiose. Foi inferido que tal perda da viabilidade está diretamente ligada ao maior consumo de reservas observado nessas células, devido ao processo de adaptação respiratória (Ball & Atkinson, 1975). Estes resultados foram

corroborados por Wilson & Mcleod (1976), os quais sugeriram ainda que além do consumo das reservas, a queda na viabilidade também decorreu da deficiência estrutural da membrana provocada pela carência de esterol e ácido graxo como consequência do crescimento anaeróbico.

Segundo Panek et al. (1981), linhagens mutantes de *S.cerevisiae* possuindo baixa atividade da enzima trealose-6-fosfato sintase, são mais frágeis quando mantidas em suspensão na ausência de crescimento.

Tem sido proposto que a sobrevivência de organismos durante a dessecação está relacionada com os seus teores de trealose (Zikmanis et al., 1982). Da mesma forma, a termotolerância em leveduras e a manutenção das estruturas citoplasmáticas sob condições de estresse foram designadas como características de células produtoras de elevadas quantidades de trealose (Keller et al., 1982).

O mecanismo pelo qual a trealose promove a estabilidade das células sob estresse não foi ainda devidamente esclarecido. Conforme sugerido por Crowe et al. (1979) a trealose interagiria com os fosfolípidos da membrana celular prevenindo danos nesta durante a reidratação de células submetidas previamente à dessecação. Desta forma seria excluída a fase transitória da membrana aumentando a estabilidade da mesma. Wienken (1990) inferiu que a função primária da trealose seria da proteção dos componentes do citossol contra condições desfavoráveis. Com relação à substituição das moléculas de água por trealose durante a desidratação foi verificado por Crowe et al. (1991) que a *Saccharomyces cerevisiae* possui um transportador para trealose. Eleutherio et al. (1993) em estudo a mesma espécie de levedura verificaram a existência da trealose nos dois lados da bicamada dos lípidos. Segundo os autores, para que a trealose ficasse presente nos dois lados da membrana havia necessidade de um carregador, já que esse dissacarídeo é produzido no citossol da célula. Observaram nesse

trabalho que mutantes que não possuíam o carregador apesar de acumularem trealose possuíam baixa sobrevivência à desidratação.

Com base nos aspectos abordados, conclui-se que os carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, atuam como reservas de carbono e energia nos diferentes estágios de ciclo de vida da levedura. Porém, além dessa função, a trealose aparece envolvida em mecanismo que aumentam a estabilidade das células em condições distintas daquelas ótimas para seu desenvolvimento. Essa segunda função da trealose poderia justificar a presença de dois tipos diferentes de carboidratos de reserva num mesmo organismo. Benchekroun & Bonaly (1992) associaram a viabilidade celular ao alto teor de ergosterol e baixo teor de lanosterol na membrana plasmática da levedura, e ainda segundo eles, os recírculos celulares conferem mais resistência à autólise enzimática.

2.4.7 - Mobilização e Acúmulo dos Carboidratos de Reserva Durante a Fermentação Alcoólica

Os teores de trealose e glicogênio sofrem alterações consideráveis expressas pela queda sofrida logo no início da fermentação (30 minutos) e se repõem durante o período subsequente, atingindo no final da fermentação teores superiores àqueles do início do processo (Basso & Amorim, 1989a). Esses autores explicaram que a diminuição de reservas de trealose e glicogênio correspondem estequiometricamente a produção de glicerol (0,25g/100ml de vinho) e ácidos orgânicos (800mg/l de vinho) até a primeira hora da fermentação. As quedas nos teores de ambas as reservas coincidem com a fase de maior velocidade de produção de álcool (etanol)(Basso & Amorim, 1989a). Foi constatado a mobilização da trealose e a formação

contínua de etanol até 72 horas com o fermento Fleischmann suspenso em água destilada (Basso & Amorim, 1994).

D'amore et al. (1991) examinaram 12 cepas de leveduras de várias espécies e compararam-nas quanto a capacidade de produzirem etanol a partir de concentrações elevadas de glucose. Verificaram que as células que possuíam altas concentrações iniciais de trealose produziam maior quantidade de etanol e tinham melhor viabilidade celular quando estocadas em baixas temperaturas (-20°C) ou em vinho com 5% (V/V) de etanol a 4°C durante 30 dias. Maiores teores alcoólicos do meio parecem acelerar a mobilização das reservas, mas o rendimento em etanol (que pode ser maior ou menor do que permite a estequiometria das reservas mobilizadas), depende muito das condições fisiológicas nas quais a levedura inicia o processo (Amorim et al., 1994).

Gutierrez, (1993) em estudo de alterações provocadas por ácido octanóico ao teor de trealose de levedura de panificação afirmou que o mesmo inibe a fermentação alcoólica e o acúmulo de trealose nessa levedura, no entanto não afeta a degradação endógena de trealose. Explicou que esta inibição teria ocorrido pela ligação do ácido octanóico a hexoquinase ou outra proteína da membrana plasmática, as quais não são necessárias para a fermentação endógena; a degradação teria sido pela ativação da trealase.

Diversos fatores afetam o teor de trealose das leveduras; condições anaeróbicas provocaram redução na quantidade de trealose, mas o decréscimo foi mais acentuado quando as leveduras perderam as mitocôndrias (Panek, 1975). Entretanto, Chester & Byrne (1968) relataram que em meio anaeróbico, quanto maior a concentração de glucose, mais glicogênio e trealose foram armazenados, confirmado por Panek (1975) para trealose. A deficiência de nitrogênio induziu ao acúmulo de trealose em leveduras (Kuenzi & Fiechter, 1972; Lillie & Pringle, 1980), enquanto que Trevelyan & Harrison (1956), relataram que a formação de carboidratos pelas leveduras foi também

reduzida por altas concentrações de fosfato. Simultaneamente ao consumo das reservas de fermento ocorre um incremento no teor de nitrogênio do mesmo de até 32% (Basso & Amorim, 1990). Os autores observaram a coincidência dos picos de máxima produção de etanol com o de maior teor de nitrogênio no fermento. Tal efeito se reveste de grande importância prática quando da remoção do fermento do processo para a produção de ração (fermento com maior concentração protéica).

A adição do inibidor 2,4 - dinitrofenol provocou redução no teor de trealose (Berke & Rothstein, 1957; Amim et al., 1984), confirmado por Gutierrez (1990), com 18 ppm de dinitrofenol, enquanto que Panek (1962), relatou que a isoniazida e fluoreto de sódio não afetaram a fermentação de trealose em condições aeróbicas.

2.4.8 - Efeito da Temperatura e do pH na Fermentação Endógena

Ao aumentar a temperatura incrementa-se a formação do etanol proveniente da fermentação endógena até o limite crítico da qual acontecerá autólise das células e conseqüentemente a perda da viabilidade celular (Basso & Amorim, 1991).

Gutierrez (1990) estudando o efeito da temperatura no acúmulo da trealose observou o maior acúmulo na faixa de 25 a 34°C para *Saccharomyces cerevisiae* linhagem M-300-A, confirmando observações de Grba et al. (1975). Segundo Panek (1962) a trealose é sintetizada quando cessa a síntese de aminoácidos. Parada & Acevedo (1983), verificaram redução de RNA das células de leveduras a 35°C. Ao diminuir o crescimento celular aumenta a síntese de trealose como descreveu Gutierrez (1990). As temperaturas 35 e 40°C tornam menos acentuada a queda nos teores de trealose que geralmente ocorre no início da fermentação. Os seus teores são sempre mais elevados durante o transcorrer da fermentação em temperaturas

mais elevadas até 6 horas, mas após 24 horas ocorre drástica redução nos mesmos (Basso & Amorim, 1989b). Segundo os autores, o incremento na síntese de trealose em temperaturas elevadas, possivelmente seja um mecanismo para proteger as membranas da levedura, tanto contra os efeitos adversos do calor como da ação tóxica do etanol. Os teores de glicogênio sofrem alterações menos significativas, contudo a biossíntese é prejudicada. No entanto os teores de trealose e a viabilidade se mostram elevados até 24 horas a 35°C e até 6 horas a 40°C, mas após 24 horas a 40°C ocorre redução significativa nos teores de trealose e na viabilidade.

Hottiger et al. (1987a,b) trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae* encontraram que com a elevação da temperatura de 27 para 40°C havia um acúmulo de trealose e é notado o aumento de seis vezes na atividade da enzima trealose fosfato sintase. Quando diminuíram novamente à temperatura para 27°C verificaram a diminuição no nível de trealose. Concluíram que o acúmulo de trealose ocorrido nas células quando submetidas à temperaturas superiores à normal do seu crescimento, está relacionado com a aquisição de termotolerância das mesmas. Gutierrez (1990), verificou maior acúmulo de trealose a pH 4,5 do que em pH 3,0.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem JA -1 submetida ao tratamento térmico a 42°C degradou mais rapidamente a trealose quando em meio mais ácido (pH inicial 2,2 e 2,4, comparado com pH 4,7), enquanto mantém elevado teor de glicogênio, o qual representa de 5 a 25% da matéria seca da levedura (Amorim et al., 1994). Segundo os mesmos autores a produção de etanol se mostra maior (56 e 81 l/t. de levedura seca em meios com pH 4,7 e 2,4, respectivamente), quando a levedura apresenta o teor inicial elevado de trealose (7%). Já levedura com menor valor de trealose inicial (4%) apresenta menor rendimento em etanol (20 l/t, tanto em pH 4,7 como pH 2,4).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados no experimento as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e VR-1. As duas linhagens foram isoladas no processo fermentativo industrial, respectivamente na Usina da Pedra, região Serrana-SP e na Usina Vale do Rosário, Orlandia-SP e caracterizadas pelo método de cariotipagem empregada pela FERMENTEC S/C LTDA no Departamento de Química - Bioquímica - ESALQ - USP - Piracicaba - SP. A coleção é mantida no Setor de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - ESALQ/USP.

3.2 Multiplicação da Levedura

Material: balde de mistura de 20L; erlemmeyer de 2L, 3L e 6L; frasco de 20L.

Foi utilizado para multiplicação da levedura o melaço proveniente da Usina Vale do Rosário com 61,51% de ART %P/P (açúcares redutores totais). O melaço foi diluído até a concentração de 6% de ART %P/V. Foram adicionados ao mosto os sais minerais e formulação composta de vitaminas conforme apresentado na Tabela 2, segundo Zago (1982).

Tabela 2 - Concentração de sais e formulação composta de vitaminas adicionadas ao mosto.

Compostos	Concentração	
	g/L	mM
K ₂ HPO ₄	0,87	5
(NH ₄)SO ₄	0,66	5
URÉIA (NH ₂ CONH ₂)	0,30	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	2
ZnSO ₄ .H ₂ O	0,03	0,1
MnSO ₄ .H ₂ O	0,02	0,1
Vitaminas "Roche"	0,25	
Ácido linoleico (mL/L)	1,00	0,03g/mL de CH ₃ CH ₂ OH

Obs: A concentração dos compostos foi baseada pela composição da levedura em condições adequadas a uma boa fermentação em cujo o rendimento fermentativo ultrapassa 90%.

Após a adição dos minerais e vitaminas o mosto foi esterilizado em autoclave à temperatura de 120°C à 1 atmosfera de pressão.

O mosto esterilizado foi adicionado ao inóculo primeiro um volume aproximadamente de 1L, depois dobrou-se o volume a cada final de fermentação até obtenção no frasco de multiplicação de 600g de fermento. O tempo entre uma fermentação e outra variou entre 6 a 8 horas e a multiplicação foi conduzida a temperatura ambiente.

3.3 - Fermentação Prévia

Material: Erlenmeyer de 6L e estufa.

A fermentação prévia tem como objetivo aumentar a concentração dos carboidratos da reserva (trealose e glicogênio) da levedura antes da fermentação endógena propriamente dita.

Foi utilizado nesta fermentação o caldo misto com a proporção de 70% do caldo de cana-de-açúcar fresco diluído a 10,8 % de ART e 30% de mosto de melaço com a mesma concentração de ART. Esta concentração de açúcar dá no final um teor alcoólico de 7% V/V. A concentração do fermento na suspensão foi de 10% (200g de fermento em 2000mL do meio) e a fermentação prévia ocorreu em estufa com a temperatura de 30-32°C. O tempo médio da fermentação prévia foi de 6 horas.

3.4 - Fermentação Endógena

Material: Erlenmeyer de 1L e Banho Maria.

Após a fermentação prévia o fermento já está pronto para proceder a fermentação endógena. A fermentação endógena foi feita na suspensão de 30% P/V de fermento (210g de fermento em 700mL do meio) com o teor alcoólico de 3 a 4% V/V.

O álcool formado com a contribuição de AR durante a fermentação endógena é representado esquematicamente como se segue de acordo com Basso et al. (1992) considerando valor mínimo, médio e máximo:

0,0005%AR $\longrightarrow$ 0,00032375% CH₃CH₂OH

0,01%AR $\longrightarrow$ 0,006475% CH₃CH₂OH

0,0225%AR $\longrightarrow$ 0,0145687% CH₃CH₂OH

Com esse resultado conclui-se que a contribuição de AR para a formação de álcool durante a fermentação endógena é insignificante em relação a contribuição das reservas.

3.5 - Tratamentos

Os tratamentos foram realizados isoladamente observando-se o efeito de 1 e 4 ciclos fermentativos, de diferentes pH iniciais e de diferentes temperaturas, na fermentação endógena. Foi determinado em cada tempo dentro do intervalo de 0 a 24 horas as variáveis etanol, pH da suspensão, teor do fermento úmido, matéria seca, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose, glicogênio e a viabilidade celular.

3.5.1 - 1 Ciclo Fermentativo

Foi feita uma fermentação prévia e o fermento resultante foi submetido a fermentação endógena com 30% de fermento úmido e teor alcoólico de 3 a 4% V/V à temperatura de 40°C em Banho Maria.

3.5.2 - 4 Ciclos Fermentativos

Foram feitas quatro fermentações prévias e em cada intervalo de foi feita a correção do pH para 2,50. O fermento resultante foi submetido a fermentação endógena com 30% de fermento úmido e teor alcoólico de 3 a 4% V/V à temperatura de 40°C em Banho Maria.

3.5.3 - Efeito de diferentes pH iniciais: 2,50; 3,50 e 4,50.

Fermento de 1 ciclo fermentativo. Três suspensões com 30% de fermento úmido e teor alcoólico de 3 a 4% V/V foram ajustadas a pH de tratamento com H₂SO₄ 2N e NaOH 10% respectivamente e submetidas a fermentação endógena à temperatura de 40°C em Banho Maria.

3.5.4 - Efeito de diferentes temperaturas: 35, 40 e 45°C.

Fermento de 1 ciclo fermentativo. Três suspensões com 30% de fermento úmido e teor alcoólico de 3 a 4% V/V foram submetidas a fermentação endógena em Banho Maria de acordo com a temperatura de tratamento.

3.5.5 - Tempo em horas: 0:00, 1:00, 2:00, 4:00, 6:00, 8:00 e 24:00.

Em cada tempo de fermentação endógena foram pipetadas as amostras na suspensão para determinação das variáveis: Etanol, pH da suspensão (diretamente no Erlenmeyer), teor do fermento úmido e seco, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose, glicogênio e viabilidade celular.

3.6 - O Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi Inteiramente ao acaso com 2 repetições (Gomes, 1985). Foi utilizado o Programa Estatístico SANEST¹ para a análise estatística dos dados, cujo esquema de análise de variância é apresentado na Tabela 3. A comparação de médias foi feita através do teste de Tukey ao nível de significância de 5 e 1% respectivamente.

¹ Publicação do Centro de Informática na Agricultura da Universidade de São Paulo, Campus "Luiz de Queiroz".

Tabela 3 - Esquema de análise de variância.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L. (Grau de Liberdade)
Ciclos	1
Tempos	6
Ciclos x Tempos	6
Resíduo (a)	14
Total	27
pH	2
Tempos	6
pH x Tempos	12
Resíduo (b)	21
Total	41
Temperatura	2
Tempos	5
Temperatura x Tempos	5
Resíduo (c)	12
Total	23

A Tabela 4 mostra a amostragem efetuada na suspensão em diferentes tratamentos em cada tempo.

Tabela 4 - Amostragem em cada tempo para a determinação de etanol, trealose, glicogênio, teor de fermento, matéria seca, viabilidade celular, nitrogênio no fermento e no vinho.

Variáveis	Volume (ml)	Repetição	Total
Etanol	25	2	50
Trealose e Glicogênio	4,0	2	8
Teor de Fermento			
Matéria Seca	10,0	2	20
Nitrogênio no fermento e no vinho			
Viabilidade Celular	1,0	2	2

3.7 - Determinação de Etanol

O etanol foi determinado com a destilação prévia de 25mL da amostra no microdestilador Kjeldhal adaptado para álcool. Com o destilado obtido foi feita a leitura do grau alcoólico no densímetro digital Anton-Paar DMA-48 após a introdução do destilado (Amorim et al., 1982).

3.8 - Extração e Determinação dos Carboidratos de Reserva

4 mL da suspensão foram centrifugados para a separação do vinho do fermento. Deste fermento foi feito uma suspensão de 12% P/V. Da suspensão foi tomado um volume de 0,5mL para a extração de trealose e 0,5mL para glicogênio, correspondente a 25% da matéria seca da levedura.

A trealose foi extraída com ácido tricloroacético - CCl_3COOH 0,5 M (TCA) a frio segundo Trevelyan & Harrison (1956) e determinado pelo método de Antrona, segundo Brin (1966) e a leitura foi feita no colorímetro a 620 nm.

O glicogênio foi extraído com carbonato de sódio (Na_2CO_3 0,25M) também a frio e determinado pelo método enzimático empregando-se glicose oxidase, peroxidase. A leitura foi feita no espectrofotômetro como glicose à 525nm (Sigma, 1996).

3.9 - Determinação do pH da suspensão e do nitrogênio total no fermento e no vinho

O pH foi determinado em pHmetro digital mod. 601, Orion Research.

O nitrogênio total foi determinado pelo Método Kjeldhal que consiste na digestão de 100mg de amostra de fermento seco e 1mL da amostra de vinho em um blocodigestor a temperatura de 350°C por 2 a 3 horas; após a digestão fez-se a destilação utilizando o microdestilador Kjeldhal. O destilado deve borbulhar na solução de ácido bórico com a mistura indicadora (vermelho de metila e verde de bromocresol na proporção de 1:10) até a obtenção de um volume equivalente ao dobro do volume inicial no erlenmeyer; depois titulou-se com a solução padronizada de H_2SO_4 0,01N e 0,1N respectivamente para vinho e fermento (Zago et al., 1996).

3.10 - Determinação do teor de fermento úmido e seco (g/100mL do meio)

Foi tomado 10 mL da suspensão de células e transferido para um tubo de centrífuga. Em seguida foi feita a centrifugação para a separação de células do vinho com a centrífuga Excelsa Baby Mod. 208N à 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação do nitrogênio total no vinho. O tubo com precipitado de células foi pesado para obtenção do peso úmido. O fermento úmido foi transferido para frasco de vidro de boa resistência térmica de peso conhecido, onde foi feita a secagem na estufa a 105-110°C até a obtenção do peso constante. Com o peso do fermento úmido e seco, calculou-se respectivamente o teor do fermento úmido e seco.

3.11 - Determinação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada com a utilização de eritrosina para colorir as células de levedura, segundo Bonneu et al., (1991). A contagem foi efetuada ao microscópio ótico através da câmara de Neubauer. A técnica consiste em se misturar em proporções iguais a suspensão da levedura (amostra) devidamente diluída, com a solução corante. As células viáveis não

ficam coloridas enquanto as células inviáveis ou inativas fisiologicamente (mortas) apresentar-se-ão coloridas de rosa intenso. A porcentagem de células viáveis por ml foi determinada transferindo-se com a pipeta de Pasteur a amostra já colorida para a câmara de Neubauer. Nesta foram contadas as células incolores e as coloridas, em microscópio de campo claro com a utilização da objetiva de imersão (100X). Foram contadas no mínimo 500 células por câmara.

3.12 - Determinações na indústria

Na indústria foi feita a fermentação endógena com amostra do final da fermentação do mosto, onde foram determinados as variáveis etanol, pH da suspensão, nitrogênio no fermento e no vinho e a trealose, em cada tempo no intervalo de 0 a 24 horas. Foram recolhidas as amostras antes do tratamento ácido, após o tratamento ácido, uma e três horas de alimentação e no final da fermentação para determinação da trealose e nitrogênio no fermento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A Influência dos Ciclos Fermentativos na Fermentação Endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagens PE-2 e VR-1

4.1.1 Linhagem PE-2

Em ambos os tratamentos (1 e 4 ciclos) constata-se o aumento progressivo do álcool na suspensão com o tempo até 8 horas da fermentação (Figura 1a e 3a). Na primeira hora de fermentação o aumento deve-se a mobilização de trealose e glicogênio (Figura 1a e b); de 1 a 2 horas a mobilização do glicogênio foi responsável por aumento de álcool, de 2 a 6 horas as duas reservas contribuíram para o incremento do álcool na suspensão, de 6 a 8 horas só a trealose foi responsável pelo aumento de álcool (Figura 1a e b). No tratamento com 1 ciclo foi produzido pela fermentação endógena 0,87% de álcool e no tratamento com 4 ciclos foi produzido 0,72% de álcool, em média com 22% de matéria seca da levedura. O que representa cerca de 40 litros de álcool por tonelada de matéria seca considerando o valor obtido em 1 ciclo.

Dos componentes determinados (etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio) foram encontrados maiores valores decorrentes do tratamento com 1 ciclo com o nível mínimo de significância de 5% pelo teste de Tukey (Tabela 6). Esta superioridade possivelmente seja devido ao maior valor inicial (0 horas) da viabilidade celular (94%) obtido com 1 ciclo fermentativo (Figura 1b) em relação a 4 ciclos que começou com 80% (Figura

3b). Com 4 ciclos a mobilização das reservas no decorrer da fermentação endógena foi gradual, o que pode ser notada pela menor produção de etanol na suspensão (Figura 3a) e da menor variação da viabilidade celular ao longo do tempo (Figura 3b). O pH da suspensão aumentou no transcorrer do tempo, variando entre 4,50 a 5,70 para 1 ciclo (Figura 2a) e 4,50 a 5,60 para 4 ciclos (Figura 4a). O incremento do álcool na suspensão com a mobilização das reservas seria responsável pelo aumento do pH. Os teores do fermento úmido e seco decrescem com a fermentação endógena (Figura 2a e 4a) em detrimento a produção de álcool também devido ao metabolismo anaeróbico das reservas da levedura.

Houve aumento do nitrogênio no fermento até 6 horas de fermentação no tratamento de 1 ciclo e até 8 horas com 4 ciclos. Nestes tempos foram obtidos as maiores concentrações de nitrogênio no fermento (Figura 2b e 4b) e o máximo da produção de álcool (Figura 1a e 3a) proveniente da mobilização das reservas. Depois do intervalo entre 6 e 8 horas conforme o ciclo, ocorreu a autólise celular verificado pelo aumento brusco e contínuo de nitrogênio no vinho decorrente da massa celular da levedura em suspensão (Figura 2b e 4b). No tratamento com 1 ciclo em 6 horas foi obtido um ganho de 1,96% de nitrogênio no fermento, que corresponde 12,25% de proteína, ou seja, um acréscimo de 25% de proteína. No tratamento com 4 ciclos em 8 horas de fermentação o acréscimo foi de 18% de proteína ao fermento. É importante frisar a necessidade de terminar a fermentação no tempo de máximo acúmulo de nitrogênio no fermento, assim sendo ter-se-á um fermento com alta concentração de proteína, pela diminuição significativa das reservas. Este resultado é de suma importância quando da comercialização da levedura seca para fins de suprimento protéico em ração animal ou até mesmo para enriquecimento de certos alimentos deficientes em proteína e que são consumidos pelo homem. Nesta última hipótese o manuseio deve ser adequado as normas de consumo humano.

Constatou-se a redução da viabilidade celular ao longo do tempo, aproximou-se de 0% durante 8 horas no tratamento com 1 ciclo (Figura 1b). Com 4 ciclos a redução da viabilidade celular foi mais discreta e atingiu o valor de 0% em 24 horas como pode ser observada na Figura 3b.

Figura 1 - Efeito de 1 ciclo fermentativo na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação de etanol e trealose no transcorrer do tempo. (b) a variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo.

Figura 2 - Efeito de 1 ciclo fermentativo na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do pH da suspensão, teor do fermento úmido e seco no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no fermento e no vinho com o tempo.

Figura 3 - Efeito de 4 ciclos fermentativos na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação de etanol e trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo.

Figura 4 - Efeito de 4 ciclos fermentativos na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do pH da suspensão, teor do fermento úmido e seco no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no fermento e no vinho com o tempo.

Tabela 5. Efeito dos ciclos fermentativos na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio.

QUADRADO MÉDIO (Q. M.)						
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	Etanol	N Ferm.	N Vinho	Trealose	Glicogênio
ciclos	1	0,20232**	3,67213**	74263**	8,68029 **	25,93939**
Tempos	6	0,45273**	2,07712**	1621937 **	19,79313 **	20,97233**
ciclos x Tempos	6	0,01046**	0,31639 ns	27870 **	1,93673 **	0,25161**
Resíduo	14	0,00184	0,15595	453	0,07160	0,04645
TOTAL	27					
Coefficiente de Variação		1,813%	6,353%	4,199%	7,934%	3,924%

(**)= significativo pelo teste F, ao nível de 1%.

(*) = significativo pelo teste F ao nível de 5%.

ns = não significativo considerando-se um nível mínimo de significância de 5%.

Observa-se pela Tabela 5 que foram detectadas diferenças significativas pelo teste F entre ciclos e entre tempos, para todas as variáveis. Entre a interação ciclos x tempos, só foi detectada a diferença não significativa para a variável nitrogênio no fermento.

O detalhamento de análise pelo teste de Tukey pode ser observado na Tabela 6 para médias dos ciclos.

Tabela 6. Comparação de médias dos ciclos (em 7 tempos) entre os tratamentos na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, para as variáveis: etanol (%V/V), nitrogênio no fermento (%) e no vinho(mg/l), trealose e glicogênio (%MS).

Ciclos	Etanol	N Fermento	N Vinho	Trealose	Glicogênio
1	5,36 aA	6,58 aA	558 aA	3,93 aA	6,46 aA
4	5,19 bB	5,85 bB	455 bB	2,82 bB	4,53 bB
D.M.S. 5%	0,03475	0,31979	17,23429	0,21669	0,17454
D.M.S. 1%	0,04828	0,44434	23,9460	0,30108	0,24251

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

4.1.2 Linhagem VR-1

Verificou-se uma diferença marcante do comportamento da curva de trealose entre tratamentos. Com 1 ciclo a trealose começou a ser acumulada logo no início do processo (Figura 5a), ao contrário, com 4 ciclos iniciou-se a sua mobilização até 4 horas de fermentação (Figura 7a). No primeiro tratamento (1 ciclo) os níveis de trealose sofreram poucas alterações de 1 a 6 horas (Figura 5a), o mesmo aconteceu com a viabilidade celular, com pouca variação de 2 até 8 horas (Figura 5b). Nesta linhagem, com 1 ciclo houve o aumento linear do teor alcoólico até 6 horas de fermentação, manteve uma ligeira estabilidade até 8 horas, quando iniciou o novo incremento até 24 horas (Figura 5a). O álcool produzido durante a fermentação endógena parece provir essencialmente da mobilização de glicogênio, no tempo compreendido entre 0 e 8 horas como pode ser visto na Figura 5a e b. Das 8 a 24 horas a produção deve estar relacionada com a utilização de trealose (Figura 5a). Este álcool representa 1,52% e 0,78% respectivamente com 1 ciclo e 4 ciclos em

22,45% de levedura seca. O que equivale cerca de 68 litros de álcool por tonelada de levedura seca, considerando o maior valor obtido.

Assim como a linhagem anterior o tratamento com 1 ciclo teve a maior média final em todos os componentes analisados com o nível mínimo de significância de 5% pelo teste de Tukey (Tabela 8).

O glicogênio com 1 ciclo foi extremamente mobilizado, a viabilidade no entanto acompanhou a diminuição da reserva (Figura 5b). Com 4 ciclos o glicogênio variou pouco e seu valor final manteve-se praticamente igual ao valor inicial (0 horas), (Figura 7b). O pH da suspensão aumentou nos tempos sucessivos e os teores do fermento úmido e seco diminuíram continuamente até 24 horas como mostra a Figura 8a, seguindo a lógica da degradação dos carboidratos endógenos da levedura. O nitrogênio no fermento aumentou sucessivamente até 6 horas de fermentação no tratamento com 4 ciclos (Figura 8b) e até 8 horas no tratamento com 1 ciclo (Figura 6b). Após esses pontos, como foi observado, aconteceu a ruptura da membrana plasmática da célula da levedura, ocasionando o escoamento do conteúdo celular para o vinho, e foi percebida pelo escurecimento da suspensão ou analiticamente pela grande quantidade de nitrogênio no vinho (Figura 6b e 8b). No tratamento com 1 ciclo foi verificado o aumento de 1,68% de nitrogênio no fermento em 8 horas de fermentação, que corresponde cerca de 10,50% de proteína bruta, representando um acréscimo de 27% de proteína ao fermento. No tratamento com 4 ciclos em 6 horas o acréscimo foi somente 2% de proteína. Não há portanto a necessidade de efetuar mais de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia pois o ganho obtido com 1 ciclo antes da fermentação endógena foi mais representativo sem considerar a economia de tempo proporcionada, já que pela questão operacional é feito 1 ciclo por dia.

Nesta linhagem, parece haver uma interconversão entre trealose e glicogênio, o que não foi admitido pelo trabalho de Lillie & Pringle (1980) com

outra linhagem de *S. cerevisiae*, sobre a síntese de glicogênio. Observa-se na Figura 7a e b o pico da concentração de glicogênio em 4 horas coincide com uma depressão na trealose, e a depressão de glicogênio em 6 horas, com o pico de trealose (aumento) e logo em seguida em 8 horas houve o seu decréscimo com a elevação de glicogênio. A interconversão entre trealose e glicogênio foi pouco estudada, mas parece ser dependente da linhagem da levedura.

Figura 5 - Efeito de 1 ciclo fermentativo na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação de etanol e trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo.

Figura 6 - Efeito de 1 ciclo fermentativo na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do pH da suspensão, teor do fermento úmido e seco no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no fermento e no vinho com o tempo.

Figura 7 - Efeito de 4 ciclos fermentativos na fermentação endógena em *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação de etanol e trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação da viabilidade celular e glicogênio com o tempo.

Figura 8 - Efeito de 4 ciclos fermentativos na fermentação endógena em *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do pH da suspensão, teor do fermento úmido e seco no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no fermento e no vinho com o tempo.

Tabela 7. Efeito dos ciclos na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio.

QUADRADO MÉDIO (Q. M.)						
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	Etanol	N Fern.	N Vinho	Trealose	Glicogênio
Ciclos	1	0,18893 **	0,86452 **	401 ns	1,38173 **	0,96202 ns
Tempos	6	0,56853 **	0,67072 **	2401378**	12,51913 **	4,47583 **
Ciclos x Tempos	6	0,06836 **	0,16871 **	37841 **	2,24252 **	6,38406 **
Resíduo	14	0,00250	0,03131	131	0,10066	0,21355
TOTAL	27					
Coeficiente de Variação		1,221%	3,453%	2,176%	7,227%	7,111%

(**)= significativo pelo teste F, ao nível de 1%.

(*) = significativo pelo teste F, ao nível de 5%.

ns = não significativo considerando-se um nível mínimo de significância de 5%.

Pode-se constatar pela Tabela 7 as diferenças significativas pelo teste F, entre ciclos para as variáveis etanol, nitrogênio no fermento e trealose; para as variáveis nitrogênio no vinho e glicogênio não foi detectado a diferença significativa. As diferenças significativas também foram encontradas entre tempos e entre interação ciclo x tempo para todas as variáveis apresentadas.

O detalhamento de análise pelo teste de Tukey pode ser visto na Tabela 8 para as médias de ciclos.

Tabela 8. Comparação de médias dos ciclos (em 7 tempos) entre os tratamentos na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, para as variáveis: etanol (%V/V), nitrogênio no fermento (%) e no vinho(mg/l), trealose e glicogênio (%MS).

Reciclos	Etanol	N Fermento	N Vinho	Trealose	Glicogênio
1	4,18 aA	5,30 aA	530 aA	4,61 aA	6,68 aA
4	4,01 bB	4,95bB	523 aA	4,17 bB	6,31 aA
D.M.S. 5%	0,04049	0,14330	9,27870	0,25692	0,37422
D.M.S. 1%	0,05626	0,19911	12,89219	0,35698	0,51996

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

4.2 Efeito do pH Inicial da suspensão na Fermentação Endógena

O pH do meio exerce uma função importante sobre a vida funcional da célula da levedura porque a concentração dos íons H^+ influenciam o transporte interno e externo de outros íons através do potencial da membrana que com o próton se cria (Armstrong & Rothstein, 1964). Normalmente em pH mais baixo (2,50) a velocidade da fermentação endógena aumenta e diminui no pH alto (>4,50). Este recurso é indispensável quando se quer regular o tempo da fermentação.

A maior produção de etanol foi obtida no tratamento com o pH inicial de 2,50, seguida do pH 3,50 e por último o pH 4,50 considerando o nível mínimo de significância de 5% pelo teste de Tukey (Tabela 10 e 12). Como a fermentação endógena processa em condições estressantes, o efeito combinado de alta temperatura (40°C) e baixo pH (2,50) possivelmente seja o fator principal por essa diferença (Porter & Ough, 1982), como pode ser observado na Figura 9a. Na Figura 14a pode-se observar o final da fermentação endógena em 24 horas com a linhagem VR-1, cujo teores alcoólicos são praticamente iguais, apesar de ter havido diferenças de seus valores nos tempos precedentes. Em todos os tempos estabelecidos houve o aumento crescente do teor alcóolico até 24 horas em diferentes tratamentos.

O álcool produzido no tratamento com pH 2,5 representa 55 litros por tonelada de levedura seca com linhagem PE-2 e 44 litros por tonelada com linhagem VR-1.

O pH da suspensão aumenta ao longo do tempo; foi verificado maior variação por unidade de tempo com o pH 2,50 em relação ao pH 3,50 e 4,50 como mostra a Figura 9b e 14b. Este resultado mostra a capacidade da levedura de equilibrar o pH do meio através do mecanismo de troca iônica entre o meio e a célula (Janacek, 1980; Cooney, 1981; Jones et al., 1981; Slavik & Kotik, 1984). Observa-se nas Figuras 10a,b e 15a,b a diminuição dos

teores do fermento úmido e seco no decorrer da fermentação. Quanto mais baixo for o pH, mais intensa foi a redução de seus teores. O álcool produzido pela mobilização das reservas seria responsável pela queda sucessiva do teor do fermento. Apesar da diferença da cinética das três curvas no final da fermentação foi atingido o mesmo valor entre os tratamentos (Figura 10a e 15a).

Em todos os tratamentos verifica-se o aumento crescente do nitrogênio no fermento com o tempo, até 2 horas para o pH 2,50, 6 horas para o pH 3,50 e 8 horas para o pH 4,50 com a linhagem PE-2 (Figura 11a); até 6 horas para o pH 2,50 e até 8 horas para o pH 3,50 e 4,50 com a linhagem VR-1 (Figura 16a). Com estes resultados pode-se inferir que quando o pH inicial for menor (2,50), há uma intensa mobilização das reservas, consequentemente diminui o tempo da fermentação endógena. Estes dados estão muito coerentes pois, neste intervalo de tempo os resultados estão praticamente lineares. Se deve terminar o processo antes de haver o aumento de nitrogênio no vinho. O maior valor de nitrogênio no fermento em 7 tempos estabelecidos foi encontrado no tratamento com o pH 4,50 com a linhagem PE-2; com o pH 2,50 e 3,50 não foi encontrado a diferença significativa de seus valores de nitrogênio com o nível mínimo de significância de 5% pelo teste de Tukey (Tabela 10). Em 8 horas de fermentação com a linhagem PE-2 foi constatado um acréscimo de 25% de proteína no fermento com o pH inicial de 4,50. A linhagem VR-1 iniciou a fermentação com o teor alto de nitrogênio, cerca de 7%, o aumento verificado em 8 horas foi apenas 16% de proteína. De 1 a 8 horas de fermentação o tratamento com pH 2,50 teve maior teor de nitrogênio no vinho. Com esse pH o aumento começou a partir de 1 hora do início do processo como ilustra a Figura 11b.

Apesar de alguma diferença de concentração inicial de trealose, ao terminar a fermentação foi obtida a mesma concentração entre os tratamentos, contudo a mobilização foi mais intensa na seguinte ordem: pH

2,50 > pH 3,50 > pH 4,50 (Figura 12a e 17a). Na linhagem PE-2 os valores iniciais e finais de glicogênio também não mostraram a diferença significativa (Figura 12b). Nota-se também os picos de mobilização e acúmulo de trealose no pH 3,50 e 4,50 como pode ser visto na Figura 17a para a linhagem VR-1. Com o pH 4,50 a curva de mobilização de glicogênio sofreu diversas oscilações, atingindo diferentes picos de máximos e mínimos. O metabolismo de glicogênio é bastante complexa, além dos fatores bioquímicos, os fatores inerentes ao meio influem consideravelmente direta ou indiretamente na sua síntese e degradação (Berck & Rothstein, 1957). Com o pH 2,50 em PE-2 a queda foi constante ao longo do tempo mantendo maior valor até pouco mais de 8 horas. Os três tratamentos atingiram praticamente o mesmo valor no final do processo assim como foi verificado com trealose. A linhagem VR-1 em pH inicial 2,50 atingiu no final a concentração de glicogênio praticamente o dobro da concentração inicial (Figura 17b).

Parece haver um comportamento diferente entre as duas linhagens, enquanto que a PE-2 com o tempo de tratamento o glicogênio diminuiu (Figura 12b), na linhagem VR-1 houve inicialmente um decréscimo e depois uma elevação na concentração (Figura 17b). Por outro lado no início do ensaio a PE-2 continha o dobro de glicogênio que a VR-1 e a quantidade de trealose, ligeiramente superior. Não se sabe ainda a razão desta diferença.

A queda da viabilidade celular seguiu a ordem decrescente dos tratamentos, caiu intensamente no pH menor (2,50) e gradual no pH maior (4,50). Nas Figuras 13 e 18 pode ser observado a redução da viabilidade celular após o início da fermentação em PE-2 e VR-1 respectivamente, em diferentes pH iniciais da suspensão, sendo que na última linhagem com o pH 4,50 o seu valor não variou praticamente até 8 horas.

Figura 9 - Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do etanol no transcorrer do tempo, (b) a variação do pH da suspensão com o tempo.

Figura 10 - Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. - Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do teor do fermento úmido no transcorrer do tempo, (b) a variação do teor do fermento seco com o tempo.

Figura 11 - Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do nitrogênio no fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no vinho com o tempo.

Figura 12 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação da trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação do glicogênio com o tempo.

Figura 13 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, a variação da viabilidade celular no transcorrer do tempo.

Figura 14 - Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do etanol no transcorrer do tempo, (b) a variação do pH da suspensão com o tempo.

Figura 15 - Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do teor do fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do teor do fermento seco com o tempo.

Figura 16 - Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação do nitrogênio no fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no vinho com o tempo.

Figura 17 - Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, (a) a variação da trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação do glicogênio com o tempo.

Figura 18 - Amostra de 1 ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH inicial na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, a variação da viabilidade celular no transcorrer do tempo.

Tabela 9. Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio.

QUADRADO MÉDIO(Q. M.)						
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	Etanol	N Ferm.	N Vinho	Trealose	Glicogênio
pH	2	2,11939 **	1,36827 **	5385435**	25,04506**	22,68225 **
Tempos	6	0,17241 **	0,83292 **	923422 **	1,12319 **	1,56374 *
pH x Tempos	12	0,08600 **	1,32607 **	626865 **	2,74741 **	0,94155 *
Resíduo	21	0,00565	0,02578	269	0,10875	0,30192
TOTAL	41					
Coeficiente de Variação		1,776%	2,533%	2,817%	12,857%	10,775%

(**)= significativo pelo teste F, ao nível de 1%.

(*) = significativo pelo teste F, ao nível de 5%.

ns = não significativo considerando-se um nível mínimo de significância de 5%.

Observa-se pela Tabela 9 que foram detectadas diferenças significativas, pelo teste F, entre pH iniciais, entre tempos e entre interação pH x tempo para todas as variáveis.

O detalhamento da análise pelo teste de Tukey pode ser observado na tabela 10 para médias de pH.

Tabela 10 . Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Comparação de médias de pH entre tratamentos em 7 tempos durante a fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, para as variáveis: etanol (%V/V), nitrogênio no fermento (%) e no vinho(mg/l), trealose e glicogênio (%MS).

pH	Etanol	N Fermento	N Vinho	Trealose	Glicogênio
2,50	4,49 aA	6,33 bB	1287 aA	1,19 cC	4,25 bB
3,50	4,42 bB	6,20 bB	339 bB	2,65 bB	4,01 bB
4,50	3,79 cC	6,49 aA	120 cC	3,86 aA	7,04 aA
D.M.S. 5%	0,07166	0,15310	15,63712	0,31443	0,73239
D.M.S. 1%	0,09275	0,19816	20,23950	0,40697	0,98105

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

Tabela 11. Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito do pH na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento à temperatura de 40°C. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio.

QUADRADO MÉDIO (Q. M.)						
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	Etanol	N Ferm.	N Vinho	Trealose	Glicogênio
pH	2	1,58563 **	1,28811 **	9734721,50**	7,95436 **	5,48279 **
Tempos	6	0,13649 **	1,46624 **	1698016,94**	2,62471 **	1,93679 **
pH x Tempos	12	0,043497 **	1,28911 **	1307894,64**	3,34204 **	1,49422 **
Resíduo	21	0,00175	0,10177	24278,50	0,009581	0,08278
TOTAL	41					
Coefficiente de Variação		1,172%	4,301%	22,167%	4,939%	8,180%

(**)= significativo pelo teste F, ao nível de 1%.

(*) = significativo pelo teste F ao nível de 5%.

ns = não significativo considerando-se um nível mínimo de significância de 5%.

Observa-se pela Tabela 11 que foram constatadas diferenças significativas pelo teste F, entre pH iniciais, entre tempos e entre interação pH x tempos para todas as variáveis.

O detalhamento de análise pelo teste de Tukey pode ser visto na Tabela 12 para as médias do pH.

Tabela 12. Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Comparação de médias de pH entre tratamentos em 7 tempos durante a fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1, na suspensão de 30% de fermento úmido à temperatura de 40°C, para as variáveis: etanol (%V/V), nitrogênio no fermento (%) e no vinho(mg/l), trealose e glicogênio (%MS).

pH	Etanol	N Fermento	N Vinho	Trealose	Glicogênio
2,50	3,89 aA	7,23 bB	1659 aA	1,17 cC	4,23 aA
3,50	3,61 bB	7,77 aA	320 bB	2,11 bB	3,26 bB
4,50	3,22 cC	7,26 bB	129 cB	2,66 aA	3,06 bB
D.M.S. 5%	0,03994	0,30417	148,56308	0,09333	0,27433
D.M.S. 1%	0,05170	0,39369	192,28872	0,12080	0,35507

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

4.3 Efeito da Temperatura na Fermentação Endógena

A temperatura crescente aumenta a velocidade de produção de álcool durante a fermentação até um ponto crítico em que a viabilidade celular se torna comprometida. O tempo necessário para terminar a fermentação endógena diminui com o incremento da temperatura além do limite superior necessário ao crescimento da levedura. Com 45°C a linhagem PE-2 terminou a fermentação em 2 horas quando a viabilidade celular atingiu ao valor nulo como pode ser observado na Figura 23. Já com temperaturas de 35 e 40°C terminou-se o processo somente em 24 horas (Figura 23). Com a linhagem VR-1 a viabilidade celular foi nula em 4 horas com a temperatura de 45°C como mostra a Figura 28. Considerando o álcool produzido durante 24 horas constatou-se a maior média com a temperatura de 40°C e menor média com a temperatura de 35°C com o nível mínimo de significância de 5% pelo teste de Tukey (Tabela 13). É provável que a diferença seja devido a mobilização considerável da trealose (Figura 22a) e glicogênio (Figura 27b) à 40°C. O álcool produzido pela linhagem PE-2 no final da fermentação nesta temperatura representa 36 litros de álcool por tonelada de matéria seca. Com a linhagem VR-1 a maior média de álcool foi obtida com a temperatura de 45°C, considerando o nível mínimo de significância de 5% pelo teste de Tukey (Tabela 16), cuja produção final representa 55 litros de álcool por tonelada de matéria seca.

A Figura 19b e 24b indicam a variação do pH da suspensão com o tempo em diferentes temperaturas de tratamento. O pH da suspensão aumenta no decorrer da fermentação, mas foi mais acentuado com a temperatura de 45°C logo no início do processo. Nas temperaturas de 35 e 40°C na linhagem PE-2 não foi verificada grandes variações de pH da suspensão até 24 horas (Figura 19b). Na linhagem VR-1 porém o pH não alterou praticamente nas duas temperaturas até 4 horas, tendo seus valores similares dentro deste intervalo

(Figura 24b). O teor do fermento diminuiu acentuadamente em pouco tempo de fermentação com a alta temperatura (45°C), esse comportamento é comum nas duas linhagens estudadas, PE-2 e VR-1. A Figura 20a,b e 25a,b mostram a cinética da fermentação endógena em três temperaturas, através da redução do teor do fermento no decorrer da fermentação.

Em todas as linhagens houve o aumento do nitrogênio no fermento no intervalo de 0 a 1 hora (Figura 21a e 26a). De 1 a 2 horas na PE-2 houve a redução do nitrogênio no fermento nas temperaturas de 35 e 45°C (Figura 21a) enquanto que à temperatura de 40°C (Figura 21a) a inflexão da curva ocorreu depois de 2 horas. À temperatura de 35°C na mesma linhagem, não variou praticamente a concentração de nitrogênio de 2 a 8 horas, mas no final do processo houve o incremento na concentração como pode ser observado na Figura 21a. Na linhagem VR-1 o aumento da concentração na primeira hora foi bastante expressiva e representa um aumento de 26% de proteína no fermento (Figura 26a). O tratamento com a temperatura de 35°C em 24 horas atingiu o nível alto de nitrogênio no fermento (8,31%), cujo o ganho representa 25% de proteína no fermento. À 40°C, o ponto máximo de acúmulo atingido por esta linhagem foi em 6 horas (Figura 26a). Depois de 6 horas de fermentação iniciou-se a perda do nitrogênio para o vinho (Figura 26b).

A maior média de nitrogênio com linhagem PE-2 foi observado à 35 °C considerando o nível mínimo de significância de 5% pelo teste de Tukey (Tabela 13). O máximo de aumento conseguido foi em 2 horas de fermentação à temperatura de 40°C, que corresponde um ganho de apenas 9% de proteína no fermento. Este pequeno aumento deve ter sido devido a alta concentração inicial (0 horas) de nitrogênio no fermento (7,56%) (Figura 21a). Com a linhagem VR-1 não foi observado a diferença significativa de suas médias considerando o nível mínimo de significância de 5% pelo teste de Tukey (Tabela 16).

Nas Figuras 21b e 26b observa-se o aumento proporcional de nitrogênio no vinho de acordo com a temperatura de tratamento. Não foi encontrado o aumento significativo com a temperatura de 35°C até 8 horas de fermentação para a linhagem PE-2 (Figura 21b) e até 24 horas para a linhagem VR-1 (Figura 26b). Esta última mesmo com 40°C a quantidade de nitrogênio no vinho foi insignificante até praticamente 6 horas de fermentação endógena (Figura 26b). O tratamento com 45°C, logo na primeira hora de fermentação percebe-se o aumento acentuado e linear de nitrogênio no vinho até o término do processo fermentativo em duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* estudadas (Figura 21b e 26b).

Normalmente as temperaturas elevadas bem acima da normal para o crescimento da levedura causam a autólise em pouco tempo do início da fermentação provocando o escoamento do material celular para o vinho.

A variação do conteúdo de trealose no fermento é bem característico de acordo com a temperatura. O acúmulo e degradação de trealose está relacionada as condições as quais as células são submetidas. Assim comparando as diferentes temperaturas observa-se que à 35°C é mantido no final da fermentação um nível maior de trealose em relação aos demais tratamentos (Figura 22a e 27a). Com as temperaturas de 40 e 45°C a trealose é praticamente esgotada quando a viabilidade atingir o valor nulo. As maiores oscilações entre acúmulo e degradação de trealose acontecem principalmente no tempo compreendido entre 0 e 4 horas de fermentação (Figura 27a).

O metabolismo de glicogênio não foi devidamente esclarecida na literatura. Eaton (1961) em estudo cinético sobre o metabolismo endógeno de glicogênio revelou que as cadeias externas da molécula são metabolizadas por fermentação endógena, enquanto que as cadeias internas são mobilizadas por via oxidativa. As Figuras 22b e 27b mostram o comportamento de glicogênio em linhagem PE-2 e VR-1 respectivamente, quando foram submetidas a

diferentes temperaturas. O comportamento de glicogênio na levedura sob diferentes condições de meio é muito variável, assim em diferentes temperaturas a síntese e a mobilização se alternaram ao longo da fermentação endógena de acordo com a linhagem da levedura e da temperatura aplicada (Figura 22b e 27b). Algumas vezes acontece acúmulo no final do processo, noutras o seu nível reduz-se significativamente (Figura 22b e 27b). Lillie & Pringle (1980) demonstraram que o padrão de acúmulo de trealose e glicogênio não são idênticos em condições de carência nutricional, sugeriram que a trealose tivesse outra função adicional além de carboidrato de reserva. A função suplementar da trealose possivelmente seja de manter a integridade das células perante as condições adversas de temperatura, acidez e de concentrações elevadas de álcool (D'amore et al., 1991). Perante estas condições a trealose desaparece facilmente na célula da levedura, no instante em que a sua viabilidade fica afetada. A viabilidade celular diminui intensamente, a medida que aumenta a temperatura. Assim durante a fermentação endógena com a linhagem PE-2 atingiu-se o valor nulo da viabilidade celular em 2 horas à 45°C (Figura 23). Com VR-1 à 35°C em 24 horas da fermentação não foi observado uma redução significativa da viabilidade celular (Figura 28).

Em linhas gerais a maior temperatura acelera a fermentação endógena, aumenta rapidamente o pH, diminui principalmente a trealose, mas também pode diminuir o glicogênio, se eleva a concentração de nitrogênio intracelular, provoca a autólise celular, que faz com que haja a perda de nitrogênio para o vinho, ocasionando a queda da viabilidade celular.

Figura 19 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação do etanol no transcorrer do tempo, (b) a variação do pH da suspensão com o tempo.

Figura 20 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação do teor do fermento úmido no transcorrer do tempo, (b) a variação do teor do fermento seco com o tempo.

Figura 21 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação do nitrogênio no fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no vinho com o tempo.

Figura 22 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação de trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação do glicogênio com o tempo.

Figura 23 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido, a variação da viabilidade celular no transcorrer do tempo.

Figura 24 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação de etanol no transcorrer do tempo, (b) a variação do pH da suspensão com o tempo.

Figura 25 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação do teor do fermento úmido no transcorrer do tempo, (b) a variação do teor do fermento seco com o tempo.

Figura 26 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação do nitrogênio no fermento no transcorrer do tempo, (b) a variação do nitrogênio no vinho com o tempo.

Figura 27 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, (a) a variação de trealose no transcorrer do tempo, (b) a variação de glicogênio com o tempo.

Figura 28 - Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito de diferentes temperaturas ($T.^{\circ}\text{C}$) na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, a variação da viabilidade celular com o tempo.

Tabela 13. Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito da temperatura na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio.

QUADRADO MÉDIO(Q. M.)						
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	Etanol	N Ferm.	N Vinho	Trealose	Glicogênio
Temperatura	1	2,44482 **	0,41343 **	4136721**	41,55402 **	23,01042 **
Tempos	5	0,05762 **	0,07131 **	873772 **	4,01097 **	4,95162**
Temperatura x Tempos	5	0,04586 **	0,51143 **	662739 **	4,51165 **	3,42845 **
Resíduo	12	0,00108	0,02075	138	0,00531	0,08196
TOTAL	23					
Coefficiente de Variação		1,088%	1,859%	1,863%	1,915%	4,430%

(**)= significativo pelo teste F, ao nível de 1%.

(*) = significativo pelo teste F ao nível de 5%.

ns = não significativo considerando-se um nível mínimo de significância de 5%.

Observa-se pela Tabela 13 que foram detectadas diferenças significativas pelo teste F, entre temperaturas, entre tempos e entre interação temperatura x tempos, para todas as variáveis.

O detalhamento da análise pelo teste de Tukey pode ser observado na Tabela 14 para as médias de temperaturas.

Tabela 14. Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Comparação de médias de temperaturas entre tratamentos em fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2 na suspensão de 30% de fermento úmido, para as variáveis: etanol (%V/V), nitrogênio no fermento (%) e no vinho(mg/l), trealose e glicogênio (%MS).

Temperaturas	Etanol	N Fermento	N Vinho	Trealose	Glicogênio
40°C	3,34 aA	7,62 bB	1046 aA	2,49 bB	5,48 bB
35°C	2,71 bB	7,88 aA	216 bB	5,12 aA	7,44 aA
D.M.S. 5%	0,02926	0,12809	10,44794	0,06478	0,25454
D.M.S. 1%	0,04105	0,17966	14,65426	0,09086	0,35702

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

Tabela 15. Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Efeito da temperatura na fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido. Análise de variância e do teste F para as variáveis: etanol, nitrogênio no fermento e no vinho, trealose e glicogênio.

QUADRADO MÉDIO(Q. M.)						
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	Etanol	N Ferm.	N Vinho	Trealose	Glicogênio
Temperaturas	2	1,33268 **	0,07529 ns	7118366**	8,85629**	43,00435**
Tempos	5	0,18172 **	0,79057 **	2319023**	5,83614**	9,63524**
Temperatura x Tempos	5	0,20589 **	1,34023 **	1351557**	1,07442**	12,57707**
Resíduo	12	0,00134	0,04057	778	0,0170	0,21940
TOTAL	23					
Coefficiente de Variação		1,109%	2,877%	3,811%	5,992%	5,187%

(**)= significativo pelo teste F, ao nível de 1%.

(*) = significativo pelo teste F ao nível de 5%.

ns = não significativo considerando-se um nível mínimo de significância de 5%.

Observa-se pela Tabela 15 que foram constatadas pelo teste F, diferenças significativas entre temperaturas, entre tempos e entre interação

temperatura x tempos. Entre temperaturas não foi verificado a diferença significativa para a variável nitrogênio no fermento.

O detalhamento da análise pelo teste de Tukey pode ser observado na Tabela 16 para as médias de temperaturas.

Tabela 16. Amostra de um ciclo fermentativo durante a fermentação prévia. Comparação de médias de temperaturas entre tratamentos em fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VR-1 na suspensão de 30% de fermento úmido, para as variáveis: etanol (%V/V), nitrogênio no fermento (%) e no vinho(mg/l), trealose e glicogênio (%MS).

Temperaturas	Etanol	N Fermento	N Vinho	Trealose	Glicogênio
45°C	3,69 aA	7,08 aA	1598 aA	1,20 cC	6,96 cC
40°C	3,08 cC	7,01 aA	475 bB	2,50 bB	10,68 aA
35°C	3,15 bB	6,92 aA	123 cC	2,82 aA	9,45 bB
D.M.S. 5%	0,03821	2,20990	29,05807	0,13587	0,48813
D.M.S. 1%	0,04975	0,27328	37,83184	0,17690	0,63552

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 e 1%, respectivamente.

4.4 - Acúmulo e mobilização de trealose e nitrogênio no fermento durante a fermentação do mosto e tratamento do fermento no processo industrial de produção de álcool carburante e anidro.

A Figura 29 mostra o histograma do processo de fermentação do mosto e de tratamento do fermento na Usina da Pedra.

No processo industrial os níveis da trealose e de nitrogênio no fermento variam de acordo com a composição do meio, tratamento e tipo de tratamento. O teor de trealose aumentou na medida em que processava a fermentação do mosto, com um valor no final superior a do início (Basso & Amorim, 1987).

Na Usina da Pedra foi determinado a trealose em alguns pontos no processo de fermentação do mosto e no tratamento do fermento (Figura 30). Durante a fermentação observou-se o aumento do teor de trealose no fermento, principalmente no final da mesma. Neste ponto foi detectado 20% de trealose, um valor nunca visto antes. Uma vez terminada a fermentação o vinho bruto é bombeado para a dorna pulmão, desta para a centrífuga para proceder a separação do vinho do fermento. O vinho separado vai para destilaria e o creme de levedo é bombeado para a cuba de tratamento ao mesmo tempo com a água, como mostra o histograma da Figura 29. Esta mistura demora em torno de 10 a 15 minutos. O ácido concentrado é adicionado a mistura água mais o creme num tempo aproximado de 5 minutos, quando então o creme tratado vai para a cuba de tratamento final aonde permanece em torno de 2 horas antes de ser bombeado para a dona de fermentação. O creme de levedo tratado tem aproximadamente o pH 2,50. Dos 20% de trealose acumulada no final da fermentação, aos 20 minutos de tratamento ácido diminuiu 50%, destacando-se a sua importância na manutenção da integridade da célula perante situações estressantes (Figura 30), de acordo com as suposições de Keller et al., (1982); Zikmanis et al., (1982); wienken, (1990).

A constatação de 20% de trealose no fermento é de valor relevante se for considerado a sua contribuição na formação do álcool durante a fermentação endógena, uma vez que 34 a 72% de álcool produzido nesse processo é devido a mobilização das reservas de carboidratos, o restante de álcool proviria de outros constituintes celulares (Basso et al., 1992).

A Usina Santa Elisa tem dois tipos de processos de tratamento de fermento, um tradicional, convencionada de correção manual de pH e o outro automático convencionada de correção automática de pH (Figura 31).

Correção manual de pH - a cuba de tratamento recebe o creme de levedo centrifugado. A este é adicionado a água na proporção de 1:1 com o intuito de suprimir o efeito tampão do fermento, evitando o gasto excessivo do ácido. Depois da adição de água, o ácido concentrado é adicionado diretamente a cuba de tratamento contendo creme mais água, até a obtenção do pH de aproximadamente 2,50 (Figura 31).

Correção automática do pH - creme de levedo proveniente da centrífuga é bombeado para a cuba de tratamento. A água + ácido é bombeado a cuba através de uma tubulação ao mesmo tempo que o creme de levedo (Figura 31). A quantidade de ácido e água são dosados automaticamente.

A proporção de linhagens de *S. cerevisiae* que fazem parte do processo e que foram identificados pelo método de cariotipagem são as seguintes: Destilaria I - 84% de PE-2 e 8% de VR-1; Destilaria II - 68% de PE-2 e 8% de VR-1.

Na Usina Santa Elisa também foram encontrados os teores altos de trealose durante a fermentação, principalmente em três horas de alimentação (19%) no fermento proveniente da correção manual e 15% de trealose no fermento procedente da correção automática (Figura 32). No final de tratamento ácido, foi verificado a redução de 50% do conteúdo de trealose no fermento assim como na Usina da Pedra, como mostra a Figura 32. No

início do tratamento os dois processos tiveram o mesmo valor de trealose, mas no final, o processo com a correção manual ficou com maior teor. Talvez seja devido ao maior contacto do fermento com o ácido no processo automático, pois a mistura é mais homogênea, o que provocaria a mobilização maior de trealose para suportar a acidez provocada. Na correção manual é possível obter a mesma homogeneidade de acidez por unidade de tempo como na correção automática apesar da agitação contínua do fermento dentro da cuba.

Em dois processos obteve-se a redução acentuada de trealose durante o tratamento ácido e um aumento significativo durante a fermentação e no final da mesma. Com a constatação de 20% de trealose no fermento expressa em matéria seca, a referência sobre o teor alto de trealose sugere uma nova conotação. A nível de laboratório o conteúdo máximo de trealose encontrado no fermento dificilmente ultrapassa 7% em matéria seca. A situação bastante estressante que ocorre no processo industrial (variação do pH, temperatura e concentração de álcool) justificaria o acúmulo tão significativo, uma vez que o conteúdo adequado de trealose é fundamental para a aquisição de uma boa viabilidade celular por parte da levedura (Crowe et al., 1979) como pode ser observado na Tabela 17. O álcool produzido neste processo corresponde a 43 litros de álcool por tonelada de levedura seca, valor baixo, pela quantidade inicial de trealose. Sugere-se que uma parte significativa de trealose seja requerida para outras funções, possivelmente para a manutenção da viabilidade celular. O ganho obtido de proteína no fermento com a fermentação endógena foi de 16%.

Na Figura 33 pode ser visto a concentração de nitrogênio no fermento em alguns pontos do processo durante o tratamento do fermento, com destaque ao final do tratamento ácido (3) onde foi obtido maior valor com a correção automática do pH, justamente no ponto em que foi encontrado menor valor de trealose (Figura 32).

Figura 29 - Histograma de algumas etapas do processo de produção de álcool hidratado e anidro na Usina da Pedra.

Figura 30 - Amostras de fermento coletadas na Usina da Pedra 24/06/97. Teores de trealose expressa em porcentagem da matéria seca em diferentes pontos no processo de produção de álcool hidratado e anidro, 1 - saída da centrífuga; 2 - cuba de tratamento inicial; 3 - cuba de tratamento final; 4 - 1 hora de alimentação; 5 - 3 horas de alimentação; 6 - final de alimentação; 7 - final de fermentação.

Figura 31 - Histograma de algumas etapas do processo de produção de álcool hidratado e anidro na Usina Santa Elisa.

Figura 32 - Amostras de fermento coletadas na Usina Santa Elisa, 24/07/97. Teores de trealose expressa em porcentagem da matéria seca em diferentes pontos no processo de produção de álcool hidratado e anidro, 1 - saída da centrifuga; 2 - início do tratamento; 3 - final do tratamento; 4 - 1 hora de alimentação; 5 - 3 horas de alimentação; 6 - final de alimentação; 7 - final da fermentação.

Figura 33 - Amostras de fermento coletadas na Usina Santa Elisa, 24/07/97. Porcentagem de nitrogênio no fermento em diferentes pontos no processo de produção de álcool hidratado e anidro, 1 - saída da centrífuga; 2 - início do tratamento; 3 - final do tratamento; 4 - final de fermentação.

Tabela 17 - Fermentação endógena com 30% de fermento a 40°C, amostra do final de fermentação, Usina da Pedra.

TEMPO (h)	ALCOOL (% V/V)	N. TOTAL VINHO(ppm)	N. TOTAL FERMENTO(%)	TREALOSE (% MS)	VIABILIDADE CELULAR (%)
0,00	4,18	126,46	5,76	21,00	84,40
2,00	4,56	234,78	6,36	19,14	80,30
4,00	4,84	361,20	6,75	6,64	47,70
6,00	5,12	505,68	6,75	4,84	41,85
8,00	5,12	541,80	6,88	2,77	17,85
24,00	5,12	1977,57	5,96	0,23	0,00

Obs: Média de 2 repetições.

5. CONCLUSÕES

Durante a fermentação endógena das reservas de carboidrato da levedura (trealose e glicogênio) são mobilizadas para produzir álcool até quando for esgotada a trealose ou viabilidade for comprometida. A cinética de mobilização das mesmas foi diferente entre as duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 e VR-1).

O tratamento com 1 ciclo obteve mais ganho em álcool e nitrogênio no fermento no final da fermentação endógena do que com 4 ciclos. A trealose é esgotada durante 24 horas independentemente dos ciclos (1 e 4) e o glicogênio reduzido significativamente somente com o tratamento com 1 ciclo.

A viabilidade celular variou dependendo do conteúdo de trealose e glicogênio da célula da levedura. Com a presença e mobilização da trealose e em 4 ciclos a queda da viabilidade foi mais discreta.

Há uma coincidência entre a concentração máxima de álcool na suspensão e de nitrogênio no fermento, tanto em 1 como em 4 ciclos com a linhagem PE-2. O mesmo aconteceu com VR-1 apenas no tratamento de 1 ciclo.

O tempo ótimo para terminar a fermentação endógena varia de 6 a 8 horas de acordo com a linhagem da levedura, ciclo, pH inicial da suspensão e a temperatura aplicada. Depois desse intervalo acontece a autólise celular com subsequente perda do nitrogênio para o meio.

A taxa de produção de álcool com o metabolismo das reservas aumenta na seguinte ordem de pH inicial da suspensão: 2,50 > 3,50 > 4,50, o

que está coerente com a teoria do estresse, isto é, quanto menor o pH, mais estresse e mais rápido a degradação das reservas.

As concentrações finais das reservas de carboidratos foram praticamente iguais em diferentes pH iniciais, com excessão ao glicogênio na linhagem VR-1.

Altas temperaturas (40°C e 45°C) favorecem a maior produção de álcool por unidade de tempo com uma mobilização maior de trealose e glicogênio. A linhagem VR-1 suportou melhor as condições estressantes de pH e de temperatura do que a linhagem PE-2, nas condições desse experimento.

No processo industrial em duas unidades, um levantamento revelou que a levedura acumula bastante trealose durante a fermentação do mosto, em cerca de 20% em matéria seca, mas com o tratamento ácido reduz-se significativamente até 50% desse valor, enquanto aumenta a concentração de nitrogênio no fermento, destacando a importância desse dissacarídeo para a levedura em situações estressantes do processo industrial.

Com a fermentação endógena nas condições destes ensaios pode ser produzido até 68 litros de álcool por tonelada de levedura seca e com um acréscimo relativo de 30% de proteína no fermento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGRANATI, I.D.; CABID, E. Uridine diphosphate D-glucose-glycogen glucosyl-transferase from yeast. **Journal Biological Chemistry**, v. 237, p. 1007-1013, 1962.
- AMIM, G.; STANDAERT, P.; VERACHTERT, H. Effects of metabolic inhibitors on de alcoholic fermentation by several yeasts in batch or in immobilized cell systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 91-99, 1984.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. **Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. Fermentação endógena com a levedura JA-1. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**. n.14, p.62-70, 1994.
- ARMSTRONG, W. McD.; ROTHSTEIN, A. Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. **Journal of General Physiology**, v. 48, n. 1, p. 61-71, 1964.

- AVIGAD, G. Accumulation of trehalose and sucrose in relation to the metabolism of α - glucosides in yeasts of defined genotype. **Biochemica and Biophysica Acta**, v. 40, p. 124-34, 1960.
- BALL, W.J.; ATKINSON, D.E. Adenylate energy change in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation. **Journal of Bacteriology**, v. 121, p. 3, 975, 1975.
- BARWELL, C.J.; BRUNT, R.V. The effect of H-ion concentration upon aerobic polissacaride synthesis by resting cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archiv fur Mikrobiologie**, v. 64, p. 315-318, 1969.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Estudos dos carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, no transcorrer da fermentação e durante o reciclo do fermento. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 9, p. 39-40. 1989a.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Efeito da temperatura sobre teores de glicogênio e trealose no transcorrer da fermentação. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 9, p. 51-52, 1989b.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Fermentação da trealose endógena: efeito da temperatura. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 11, p. 57-66, 1990.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; BERNADINO, C.D. Fermentação da trealose e do glicogênio endógenos. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 13, p. 1-16, 1993.

- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Fermentação da trealose: efeito da temperatura. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 11, p. 57-66, 1994.
- BECKER, V.J. A method for glycogen determination in whole yeast cells. **Analytical Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 56-64, 1978.
- BENCHEKROUN, K.; BONALY, R. Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in the presence of surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 673-678, 1992.
- BERCK, H.L.; ROTHSTEIN, A. The metabolism of storage carbohydrates in yeasts. Studied with glucose-1-¹⁴C and dinitrophenol. **Archives of Biochemistry**, v. 72, n. 2, p. 380-395, 1957.
- BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct detection of yeast mutants with reduced viability on plates by erythrosine B staining. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p. 225-230, 1991.
- BRADY, T.G.; DUGGAN, P.F.; MCGNAN, C.; TULLY, E. Study of the endogenous fermentation induced in baker's yeast by azide, 2, 4 - dinitrophenol and arsenite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 93, p. 220-230, 1961.
- BRANDT, K.M. Über die Reserve kohlehydrate der hefe. Dasverhalten der trehalose beim wachstum und bei der warmes. **Biochemische Zeitschrift**, v. 39, p. 190-201, 1941.

- BRIN, M. Tranketalose: clinical aspects. **Methods in Enzymology**, v. 9, p. 506-14, 1966.
- CABID, E.; LELOIR, L.F. The biosynthesis of trehalose phosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 231, n.1, p. 259-275, 1958.
- CALAHORRA, M.; RAMIREZ, J.; CLEMENTE, S.M.; PEÑA, A. Electrochemical potencial and ion transport in vesicles of yeasts plasma membrane. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 899, n. 2, p. 229-238, 1987.
- CHARLAB, R. Síntese de trealose em *Saccharomyces*: sistemas I e II. Rio de Janeiro, 1983. 70p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- CHESTER, V.E. The dissimilation of the carbohydrate reserves of a strain of *Sacharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, v. 86, n. 1 p. 153-160, 1963.
- CHESTER, V.E. Endogenous metabolism of freshly harvested cells of a Brewer's yeast. **Nature**, v. 183, n. 4665, p. 902-903, 1959a.
- CHESTER, V.E. Effect on oxygen on endogenous metabolism of a respiratory-deficient Brewer's yeast. **Nature**, v. 187, n. 4703, p. 1956-1957, 1959b.
- CHESTER, V.E. The dissimilation of the carbohydrate reserves of a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical of Journal, London**, v. 86, p. 153-160, 1963.

CHESTER, V.E.; BYRNE, M.J. Carbohydrate composition and UDP-glucose concentration in a normal yeast and mutant deficient in glycogen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 127, p. 556-562, 1968.

CHVOJKA, A.; PADRÃO, G.R.C.B.; PANEK, A.D.; MATOON, J.R. A regulatory mutation in yeast with affects catalase T formation and metabolism of carbohydrate reserves. **Current Genetics**, v. 4, p. 47-50, 1981.

COLONNA, W.J.; MAGEE, P.T. Glicogenolytic enzymes in sporulating yeast. **Journal of Bacteriology**, v. 134, n. 3, p. 844-853, 1978.

CONWAY, E.J.; DUGGAN, F. Action carrier in the yeast cell wall. **Biochemical Journal**, v. 69, n. 2, p. 265-274, 1958.

CONWAY, E.J.; DOWNEY, M. pH values of the yeast cell. **Biochemical Journal**, v. 47, n. 2, p. 355-360, 1950.

CONWAY, E.J.; KERNAN, R.P. The effect of redox dyes on the active transport of hydrogen, potassium and sodium ions across the yeast cell membrane. **Biochemical Journal**, v. 61, n. 1, p. 32-36, 1955.

COONEY, C.L. Growth of microorganisms In: REHM; REED, I.G. Biotechnology. **Microbial fundaments**. Weinheim: Verlag Chemie, 1981. v. 1, cap.2, p. 233-239.

- CROWE, J.H.; O'DEIL, S.J.; ARMSTRONG, D.A. Anhydrobiosis in nematodes: permeability during rehydration. **Journal of Experimental Zoology**, v. 297, p. 431, 1979.
- CROWE, J.H.; PANEK, A.D.; CROWE, L.M.; PANEK, A.C.; ARAUJO, P.S. Trehalose transport in yeast cell. **Biochemistry International**, v. 24, n. 4, p. 721-730, 1991.
- D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G.G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 191-195, 1991.
- DIVJAK, S.; MOR, J.R. On the activity of carbon dioxide fixation in growing yeasts. **Archiv Microbiologie**, v. 94, p. 191-199, 1973.
- EATON, N.R. Endogenous respiration of yeast. I. The endogenous substrate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 88, n. 1, p. 17-25, 1960.
- EATON, N.R. Endogenous respiration of yeast. II. The relationship of molecular structure to glycogen metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 3, p. 464-469, 1961.
- EDDY, A.A. Aspects of the chemical composition of yeast. In: COOK, A.H., ed. **The chemistry and biology of yeasts**. New York: Academic Press, 1958. cap. 5, p.157-240.

- EILAM, Y. Studies on calcium efflux in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbios**, v. 35, n. 140, p. 99-109, 1982. Apud **Chemical Abstracts**, v. 98, n. 14, p. 277-278, 1983.
- ELANDER, M. Trehalose-6-phosphosynthetase aus Bäckerhefe. **Arkive far Kemi**, v. 31, p. 17-30, 1969.
- ELBEIN, A. The metabolism of the α - α -trehalose. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 30 p. 227-256, 1974.
- ELEUTHERIO, E.C.A.; DE ARAÚJO, P.S.; PANEK, A.D. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1156, p. 263-266, 1993.
- FALES, F.W. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 113-124, 1951.
- FONZI, N.A.; SHANLEY, M.; OPHEIM, D.J. Relationship of glycolytic intermediates, glycolytic enzymes, and ammonia to glycogen metabolism during sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 137, n. 1, p. 285-294, 1979.
- FRENCH, D. Control of glycogen metabolism. A Ciba Fondation Symposium, 1964.
- FOULKES, E.C. Cation transport in yeast. **Journal of General Physiology**, v. 39, n. 5, p. 687-705, 1956.

- GAMBIRASIO, A. Fermentos auxiliam indústria. **Química & Derivados**, v. 2, n. 16, p. 43-46, 1967.
- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 11 ed. Piracicaba: Nobel, 1985. 466p.
- GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. Piracicaba, 1988. 206p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GRBA, S.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H. On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. **European Journal Applied Microbiology**, v. 2, p. 29-37, 1975.
- GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces*, durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v. 47, n. 2, p. 597-608, 1990.
- GUTIERREZ, L.E. Changes in trehalose content of baker's yeast as affected by octanoic acid. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 3, p. 460-463, out/dez., 1993.
- HARRIS, S.D.; COTTER, D.A. Vacuolar (lysosomal) trealose of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 247-249, 1987. **Apud Chemical Abstrac**, v. 107, n. 5, p. 395, oct., 1987.
- HARRISON, J.S. Yeast production. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 10, p. 129-177, 1971.

- HENLE, K.J.; WARTERS, R.L. Heat protection by glycerol in vitro. **Cancer Research**, v. 42, p. 2171, 1982.
- HOEFELER, R.; JENSEN, D.; PIKE, M.M. Sodium transport and phosphorus metabolism in sodium-loaded yeast: simultaneous observation with sodium-23 and phosphorus-31 NMR spectroscopy in vitro. **Biochemistry**, v. 26, p. 4958-4962, 1987.
- HOTTIGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. **FEBS Letters**, v. 220, n. 1, p. 113-115, 1987a
- HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5518-5522, 1987b.
- JANACEK, K. Experimental pH change and constant buffering capacity in algal and yeast suspension. **Dev. Plant. Biology**, v. 4, p. 577-578, 1980.
- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, v. 16, p. 42-49, 1981.
- KANE, S.M.; ROTH, R.J. Carbohydrate metabolism during ascospores development in yeast. **Journal of Bacteriology**, v. 118, n. 1, p. 8-14, 1974.

- KELLER, F.; SCHELLEMBERG, M.; WIEMKEN, A. Localization of trehalose in vacuole and of trehalose in cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Archives of Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 298, 1982.
- KELLY, P.I.; CATLEY, B.J. Purification of trehalose from *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 353-358, 1976.
- KOTYK, A.; SIGLER, K. Trans-membrane movements of protons in sample eukaryotic cells. **Study Biophysics**, v. 84, n. 1, p. 55-56, 1980. Apud **Chemical Abstracts**, v. 95, v. 11, p. 388, nov. 1981.
- KOVAC, L.; SUBIK, J.; RUSS, G.; KOLLAR, K. On the relationship between respiratory activity and lipid composition of the yeast cell. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 144, p. 94-101, 1967.
- KUENZI, M.T.; FIECHTER, A. Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. **Archiv Mikrobiologie**, v. 84, p. 254-265, 1972.
- LEÃO, M.H.M.R. Metabolismo de trealose e glicogênio em levedura de cerveja. Rio de Janeiro, 1972. 58p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- LEÃO, M.H.M.R.; PANEK, A.D.; CARVALHO, C.V.L.A. Glycogen accumulation during growth of *Saccharomyces cerevisiae* catabolite repression effects. **IRCS Medical Science**, v. 12, p. 411-412, 1984.

- LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, v. 143, n. 6, p. 1384-1394, 1980.
- LELOIR, L.F.; CABID, E. The enzymic synthesis of trehalose - phosphate. **Journal American Chemistry Society**, v. 75, p. 5445-5446, 1953.
- LEWIS, M.T.; KUIPER, H.A. Effect of growth temperature and glucose on thermal injury of *Saccharomyces calshbergensis*. **Journal of institute Brewing**, v. 78, n. 5, p. 465-471, 1972.
- LIMA, U.A Contribuição ao estudo da influência do manganês sobre o desenvolvimento e atividade da *Saccharomyces cerevisiae*, Hansen. Piracicaba, 1954. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- LONDESBOROUGH, J.; VARIMO, K. Characterization of trehalosis in baker's yeast. **Biochemical Journal**, v. 219, n. 2, p. 511-518, 1984.
- MANDL, R.H.; PIENDL, A. Technical effects of the glycogen metabolism of bottom fermentation yeast. Proceedings of the European Brewery Convention, p. 317-330, 1973. Apud **Journal of Institute Brewing**, v. 80, p. 311-318, 1974.
- MERDINGER, E.; KOHN, P. Isolation and identification of trehalose from *Pullularia pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 1126-1128, 1967.

- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-148, 1961.
- NORTHCOTE, D.H.; HORNE, R.W. The chemical composition and structure, of the yeast cell wall. **Biochemical Journal**, v. 51, p.232-236, 1952.
- OESTREICHER, E.G.; PANEK, A.D. Effect of Mg^{2+} on the activity of yeast trehalose-6-phosphate synthase. **IRCS Medical Science**, v. 10, p. 418-419, 1982.
- ORTIZ, C.H.; MAIA, J.C.C.; TENAN, M.N.; PADRÃO, B.G.R.; MOTOON, J.R.; PANEK, A.D. Regulation of yeast trehalose by a monocyelic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system. **Journal of Bacteriology**, v. 153, n. 2, p. 644-651, 1983.
- OURA, E.; TANNER, R. Cellular material and water pools in baker's yeasts during storage. In: STEWART, G.G.; RUSSELL, I. Eds **Current Developments of yeasts Research**, Toronto: Pergamon Press, 1971. p. 47.
- PÁCA, J. Metabolic responses of baker's yeast to glucose addition during aerobic starvation. **Journal of Institute Brewing**, v. 87, p. 163-168, 1981.
- PANEK, A.D. Synthesis of thehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 98, n.3, p. 348-355, 1962.

- PANEK, A.D. Function of trehalose in baker's (*Saccharomyces cerevisiae*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 100, n. 3, p. 422-425, 1963.
- PANEK, A.D. Trehalose synthesis during starving of baker's yeast. **European Journal Applied Microbiology**, v. 2, n.1, p. 39-46, 1975.
- PANEK, A.D. Metabolismo de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*. Rio de Janeiro, 1975. 115p. Tese (Titular) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- PANEK, A.D.; BERNARDES, E.J.; ORTIZ, C.H.; BAKER, S.; MATOON, J.R. Biochemical genetics, of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 53, p. 165-72, 1981.
- PANEK, A.D.; BERNARDES, E.J. Trehalose: Its role germination of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 7, p. 393-397, 1983.
- PANEK, A.C.; MANSURE, J.J.A.; PASCHOALIN, M.F.; PANEK, A.D. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperature shifts. **Biochimie**, v. 72, p. 77-79, 1990.
- PARADA, G.; ACEVEDO, F. On the relation of temperature and RNA content to the specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 2785-2788, 1983.

- PARIS, S.; PRINGLE, J.R. *Saccharomyces cerevisiae*: Heat and glucose sensitivities of starved cells. **Annales des L'Institute Pasteur**, v. 134B, p. 379-390, 1983.
- PEÑA, A. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 167, p. 397-409, 1975.
- PEPPLER, H.J. Food yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. eds **The Yeasts**. London: Academic Press, 1970. cap. 8, p. 421-57.
- PLAAT, J.B. Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 66, v. 3, p. 580-587, 1974.
- PLESSET, J.; PALMC Mc LAUGHLIN, C.S. Induction of heat shock protein and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 108, n.3, 1340-1346, 1982.
- PORTER, L.J.; OUGH, C.S. The effects of ethanol, temperature, and dimethyl dicarbonate on viability of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet n° 522 in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 33, n. 4, p. 222-228, 1982.
- PRINGLE, J.R. Induction, selection anal experimental using of temperature - sensitive and other conditional mutants of yeast. **Methods Cell Biology**, v. 11, p. 13-164, 1975.

- QUAIN, D.E.; HAWLAM, J.M. Changes in glucose-6-phosphate and storage carbohydrates during catabolite derepression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal General Microbiology**, v. 113, p. 195-198, 1979.
- RAMOS, S. Coupling of protons and K^+ gradient in yeasts. **FEMS Symposium**, v. 23 p. 351-7, 1985. Apud **Chemical Abstracts**, v. 103, n. 5, p. 267-273, aug., 1985.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-8, 1962.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, A.; RAMOS, J. Dual system of potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 59, n. 3, p. 940-945, 1984.
- ROTH, R. Carbohydrate accumulation during the sporulation of yeast. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 1, p. 53-57, 1970.
- ROTHMAN, L.B.; CABID. E. Regulation of glycogen synthesis in the intact yeast cell. **Biochemistry**, v. 8, n. 8, p. 3332-3341, 1969.
- ROTHMAN. L.B.; CABID, E. Two forms of yeast glycogen synthase and their role in glycogen accumulation. **Proceedings National Academic Science**, v. 66, p. 967-974. 1970.
- ROTHSTEIN, A.; ENNS, L. H. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. **Journal Cellular Comparative Physiology**, v. 28, p. 231-252, 1946.

ROTHSTEIN, A.; BRUCE, M. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. **Journal Cellular Comparative Physiology**, v. 51, n. 3, 439-455, 1958.

ROUSSEAU, P.; HALVORSON, H.O.; BULLA, L.A.; JULIAN, G.S. Germination and outgrowth of single spores of *Saccharomyces cerevisiae* viewed by scanning electron and phase-contrast microscopy. **Journal of Bacteriology**, v. 109, n. 3, 1232-1238, 1972.

SCOTT, G.; JACOBSON, M.A.; RICE, M.E. The influence of glycolytic factors on the potassium and sodium content of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry**, v. 30, n. 2, 282-291, 1951.

SEASTON, A.; CARR, G.; EDDY, A.A. The concentration of glycine by preparations of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* depleted of adenosine triphosphate: Effects of proton gradients and uncoupling agents. **Biochemical Journal**, v. 154, n. 3, p. 669-676, 1976.

SIGLER, K.; KOTYK, A.; KNOTKOVA, A.; OPEKAROVA, M. Processes involved in the creation of buffering capacity and in substrate induced proton extrusion in the yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 643, n. 3, p. 583-592, 1981.

SLAPACK, G.E.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Thermophilic microbes in ethanol production. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 99-107.

- SLAVIK, J.; KOTIK, A. Intracellular pH distribution and transmembrane pH profile of yeasts cells. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 766, n. 3, p. 679-684, 1984.
- SIGMA. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. St. Louis, 1996, p. 2391.
- SMEDLEY, M.; HOFFERT, D. Carbohydrate and fat metabolism in yeast. **Biochemical Journal**, v. 17, n. 6, p. 720-741, 1923.
- SMITH, Z.G.; SMITH, E.E. Evidence for the peroplasmic location of glycogen in *Saccharomyces*. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 56, n. 3, 588-592, 1974.
- SOUZA, N.O.; PANEK, A.D. Location of trehalose and trehalose in cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 22-28, 1968.
- SPIEGELMAN, S.; NOZAWA, M. On the inability of intact yeast cell to ferment their carbohydrate reserves. **Archives Biochemistry**, v. 6, n. 2, p. 303-322, 1945.
- STICKLAND, L.H. Endogenous respiration and polysaccharide reserves in baker's yeast. **Biochemical Journal**, v. 64, n. 3, p. 498-503. 1956.
- STIER, T.J.B.; STANNARD, J.N. Akinetic analysis of the endogenous respiration of baker's yeast. **Journal of General Physiology**, v. 19, p. 461-477, 1936a.

- STIER, J.S.B.; STANNARD, J.N. The metabolic systems involved in dissimilation of carbohydrate reserves yeast. **Journal of General Physiology**, v. 19, p. 479-494, 1936b.
- SUOMALAINEN, H.; PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. **Journal of Institute Brewing**, v. 67, p. 249-254, 1961.
- SUOMALAINEN, H.; OURA, E. Yeast nutrition and solute uptake. In: Rose, A.A.; HARRISON, J.S. **The Yeast**. 3. ed. London: Academic Press, v.2, cap.2, p. 127-144, 1971.
- TREVELYAN, W.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. III. the intracellular level of piruvate during yeast fermentations. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 4, p. 556-561, 1954.
- TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. V. The trehalose content of baker's yeast during a anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, v. 62, n. 2, p. 177-183, 1956.
- VASCONCELLOS, A.M.H.; PANEK, A.D. Trehalose metabolism during the "lag"phase of growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **IRCS Medical Science**, v. 6, p. 57-64, 1978.
- VILLALOBO, A. Energy dependent and potassium translocations by the reconstitute yeast plasma membrane ATPase. **Canadian Journal Cellular Biology**, v. 62, n. 9, p. 865-877, 1984. Apud **Chemical Abstracts**, v. 101, n. 17, p. 282-296, dec., 1984.

- VON MEYENBURG, H.K. Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose limited aerobic growth. **Archive fur Microbiologie**, v. 66, p. 289-303, 1969.
- WATSON, K.; CAVICCHIOLI, R. Acquisition ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 793-803, 1984.
- WIENKEN, A.; SCHLLENBERG, M. Does a cyclic AMP- dependent phosphorylation initiate the transfer of trehalose from the cytosol into the vacuolos in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 150, p. 329-331, 1982.
- WIENKEN, A. Trehalose in yeast, stress protection rather than reserve carbohydrate. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 58, 209-217, 1990.
- WILSON, K.; McLEOD, B.J. The influence of conditions of growth on the endogenous metabolism of *Saccharimycetes cerevisiae*: effect on protein, carbohydrate, sterol and faty acid content and on viability. **Antonie van Leewenhoek**, v. 42, n. 4, p. 397-410, 1976.
- WILSON, N.L.; McLEOD, B.J.; COOPER, R. The influence of conditions of growth on the endogenous metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: effect on respiratory activity. **Antonie van Leewenhoek**, v. 43, n. 314, p. 233-244, 1977.
- ZAGO, E.A. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba, 1982. 125p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ZAGO, E. A.; SILVA, L. F. L. F.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H. V.

Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar.

Piracicaba: ESALQ/FERMENTEC, 1996. 194p.

ZIKMANIS, P.B.; LAIVENIEKS, M.G.; AUZINYA, L.P; KULAEU, I.S.; BEKER, M.E. Relationship between the content of high molecular-weight polyphosphate and trehalose and viability of populations following dehydration of the yeast *Saccharomyces*. **Microbiologie**, v. 23, n.3, p. 406-409, 1982.