

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

**Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol
em leveduras *Saccharomyces cerevisiae***

Matheus Abreu Sampaio Leme Monaco

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

**Piracicaba
2007**

Matheus Abreu Sampaio Leme Monaco
Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em
leveduras *Saccharomyces cerevisiae***

Orientador:
Prof. Dr. **ANDRÉ RICARDO ALCARDE**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2007**

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

Monaco, Matheus Abreu Sampaio Leme

Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras
Saccharomyces cerevisiae / Matheus Abreu Sampaio Leme Mônaco. - - Piracicaba, 2007.
63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Fermentação industrial 2. Leveduras 3. Magnésio 4. Microbiologia industrial I. Título

CDD 660.62

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

*Aos meus queridos pais, Danilo e Anália
que proporcionaram a possibilidade dessa realização,
pelas oportunidades que me ofereceram
e carinho que me transmitiram*

*às minhas tias Nelly, Sofia e Maria Helena
que sempre me incentivaram*

*e ao meu avô Jorge Leme Jr. que através de
seu pioneirismo em tecnologia de alimentos
pode nos deixar sua contribuição na área*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição;

Ao meu orientador Prof. Dr. André Ricardo Alcarde, aumentando um pouco a carga, pesada, porém agradável, de gratidão que tenho por ele;

Aos professores e amigos do setor de Açúcar e Alcool da ESALQ/USP, Dr. Jorge Horii e Dra. Sandra Helena da Cruz, e aos funcionários que sempre se disponibilizaram ajudar Fábio, Rose, Sylvino, Pedro, Vana, Gil, Dito, Regina, Joana, Daniela;

Ao Prof. Dr. Arnaldo Antonio Rodella e técnica de laboratório Janaina, do Departamento de Ciências Exatas da USP/ESALQ, pelas análises realizadas;

Aos funcionários da biblioteca, por auxiliarem na formatação;

Aos ex-alunos do programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Antonio e André, que nunca se desvincularam do Departamento, oferecendo amizade e conhecimento;

Aos estagiários e alunos de mestrado do Departamento que me acompanharam de alguma forma e contribuíram, Nilo, Tais, Vivian, Giuliano, Pamela, José Rubens;

Aos meus queridos amigos André, Cleber, Eudes, Fernando, Fábio, Gabriel, Juliano, José Ricardo, Marcelo, Osmar, Rafael, Sidney, Tiago, Camila, Elisa, Mariana que me inspiraram;

Às minhas irmãs, Daniela e Cristina, que ofereceram apoio e compreensão nos momentos difíceis;

Em especial, a querida Priscila que além da amizade e companheirismo, prestou grande contribuição na realização deste trabalho

“Sem dúvida você vai descobrir que o maior prazer da vida é ser amado, e isso depende mais de ter modos agradáveis do que ser bom e ter modos graves e ríspidos”.

Charles Darwin – Carta ao seu filho na escola.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Efeito da temperatura sobre as leveduras.....	13
2.2 Efeito do etanol na fisiologia e metabolismo celular de leveduras.....	15
2.3 Influência do magnésio nas atividades fisiológicas e metabólicas da levedura.....	16
2.4 Efeito protetor do magnésio em células de levedura.....	18
2.5 Interação entre cálcio e magnésio em leveduras.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Cultura de levedura.....	23
3.2 Meios de Cultura.....	23
3.3 Teste para crescimento da levedura em meio sólido com diferentes concentrações de Mg ⁺²	24
3.4 Reativação das células de levedura e enriquecimento com magnésio.....	24
3.5 Determinação da concentração de magnésio.....	27
3.6 Condições de estresse.....	27
3.6.1 Térmico.....	27
3.6.2 Etanólico.....	27
3.6.3 Estresse térmico e etanólico.....	27
3.7 Determinação da viabilidade celular.....	28
3.8 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Crescimento da levedura em meio sólido (YEPD – Agar) com diferentes concentrações de Mg ⁺²	28
4.2 Enriquecimento dos meios de cultivo e das células de levedura com magnésio....	30
4.3 Efeito do estresse térmico sobre a levedura cultivada no meio sintético (YEPD)...	31
4.4 Efeito do estresse etanólico sobre a levedura cultivada no meio sintético (YEPD)	34
4.5 Efeito dos estresses térmico e etanólico conjuntos sobre a levedura cultivada no meio sintético (YEPD).....	37

4.6 Efeito do estresse térmico sobre a leveduras cultivadas em caldo de cana-de-açúcar (meio complexo).....	42
4.7 Efeito do estresse etanólico sobre a leveduras cultivadas caldo de cana-de-açúcar (meio complexo).....	45
4.8 Efeito da coexistência de estresse térmico e etanólico sobre leveduras cultivadas em caldo de cana-de-açúcar (meio complexo).....	48
5 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

O objetivo desse estudo foi investigar o efeito protetor do íon magnésio em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas aos estresses térmico e etanólico. No processo industrial de fermentação as leveduras estão sujeitas ao estresse térmico, originado pelo calor produzido pela própria fermentação, e ao estresse pelo etanol, originado pelos efeitos adversos do álcool etílico produzido pelo catabolismo dos açúcares pelas leveduras. O magnésio tem a capacidade de atenuar os efeitos nocivos de estresse em leveduras *S. cerevisiae*, principalmente através da estabilização da membrana celular. Foi cultivada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y-904, a 30°C por 24h sob agitação de 80 rpm em meio YEPD e em meio à base de caldo de cana-de-açúcar, acrescido ou não de 20 mmol de magnésio, na forma de sulfato de magnésio hepta-hidratado. As culturas foram expostas ao estresse térmico, através da elevação da temperatura de incubação de 30 para 42°C e/ou ao estresse etanólico, em meio com 10% (v/v) de etanol. A viabilidade celular da levedura foi determinada por microscopia ótica às 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24 e 48 horas do período de incubação sob as condições de estresse. A concentração de magnésio nas células e nos meios foi determinada por espectroscopia de absorção atômica. Os resultados foram analisados estatisticamente através de Análise de Variância, com posterior aplicação de Teste de Tukey. O enriquecimento do meio YEPD e/ou das células da levedura com magnésio proporcionou maior população e viabilidade celular da levedura. Em meio à base de caldo de cana o enriquecimento com magnésio não influenciou a população ou a viabilidade celular da levedura, provavelmente porque tal meio de cultivo já apresentava concentração suficiente de magnésio para a proteção da levedura contra os estresses térmico e etanólico.

Palavras-chaves: Magnésio; Proteção; Levedura; Estresse térmico; Estresse etanólico

ABSTRACT

Protective effect of Magnesium in yeast *Saccharomyces cerevisiae* under heat shock and ethanolic stress.

The aim of this study was to investigate the protective effect of the ion magnesium in cells of *Saccharomyces cerevisiae* under thermal and ethanolic stresses. In the industrial process of fermentation the yeasts might be submitted either to thermal stress, originated from the heat produced by fermentation, or to ethanol stress, originated from the damages effect of ethylic alcohol produced by the catabolism of the sugars by the yeasts. Magnesium has the capability to attenuate harmful effects of stresses in yeast, mainly through the stabilization of the cellular membrane. The strain Y-904 of *Saccharomyces cerevisiae* was cultivated at 30°C during 24h under 80 rpm agitation in medium YEPD or in a broth from sugar cane, both added or not with 20 mmol of magnesium from magnesium sulphate hepta-hydrated ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). The cultures were exposed either to heat shock, by rising of the temperature of incubation from 30 to 42°C, either/or to ethanol shock, in broth with 10% (v/v) of ethanol. The cellular viability of the yeasts was determined by optical microscopy at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24 and 48 hours of the period of incubation under the stress conditions. The magnesium concentration in the cells and in the mediums was determined for atomic absorption spectroscopy. The results were statistically analyzed by variance analysis and Tukey test. The yeast population and cell viability were higher in the medium YEPD enriched with magnesium (intra or extracellular) compared the same medium without magnesium supplementation. However it was not observed difference in population or viability of the yeasts in the broths from sugar cane enriched or not with magnesium. This happened probably because the broth from sugar cane already presented a concentration of magnesium enough to protect the yeast cells against the thermal and ethanolic stresses.

Keywords: Magnesium, Protection, Yeast, Thermal stress, Ethanolic stress

1 INTRODUÇÃO

As leveduras industriais estão sujeitas a uma variedade de injúrias físicas, químicas e/ou biológicas, referidas como estresse (WALKER, 1998), que podem causar uma diminuição na taxa de crescimento e na atividade metabólica das células. As leveduras respondem as injúrias sub-letais através do desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse. Essa resposta é uma propriedade geral de todos os organismos vivos (CRAIG, 1985; LINDQUIST, 1986), e representa uma reprogramação transitória das atividades celulares para garantir a sobrevivência durante o estresse; protegendo componentes celulares essenciais e permitindo que a célula reassuma rapidamente suas atividades normais durante o período de recuperação (WATSON, 1990; PIPER, 1993; PARSELL; LINDQUIST, 1994; MAGER; DEKRUIJFF, 1995; RUIS; SCHÜLLER, 1995).

As respostas de leveduras ao estresse são caracterizadas pela síntese de proteínas de choque térmico (LINDQUIST; CRAIG, 1988; WATSON, 1990; SANCHEZ et al., 1992; PARSELL et al., 1993; PARSELL; LINDQUIST, 1994), aumento do nível de trealose intracelular (HOTTINGER et al., 1987; WIEMKEN, 1990; NEVES; FRANÇOIS, 1992) e glicerol (OMORI et al., 1996), alterações na composição lipídica da membrana (MISHRA; PRASAD, 1989) e modulação do processo da troca de íons (PETROV; OKOROKOV, 1990). A combinação desses fatores confere tolerância ao estresse, sendo a importância relativa de cada fator variável de acordo com o tipo de estresse e o estado fisiológico das culturas de levedura (BIRCH; WALKER, 2000).

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes que regulam o crescimento e o metabolismo de leveduras. Com relação ao desenvolvimento de leveduras, existe uma correlação entre a fase de crescimento e a sensibilidade ao estresse, tal que, células crescendo rapidamente (fase log) em um meio rico em glicose são mais sensíveis ao calor e a outros estresses quando comparadas com células em fase estacionária (ELLIOT; FUTCHER, 1993).

O termo choque térmico se refere a um aumento de até 20°C na temperatura padrão de crescimento (HEIKKILA, 1993). Estudos biofísicos têm mostrado que o choque térmico leva a alterações no conteúdo de água intracelular e no estado físico da membrana celular, em relação a lipídios e composição protéica, resultando em aumento

da permeabilidade da membrana (PIPER, 1993). Essas alterações celulares e o acúmulo de proteínas nas células levam ao estímulo da resposta ao choque térmico, a qual corresponde a uma resposta de sobrevivência das células às condições ambientais estressantes (BIRCH; WALKER, 2000).

Em fermentações industriais empregando *Saccharomyces cerevisiae*, caso não seja aplicado processo de resfriamento do mosto, o calor metabólico do próprio processo fermentativo pode aumentar a temperatura do sistema de 15 a 30°C durante a fermentação (FLEET; HEARD, 1993).

Quando o estresse térmico ocorre, a sensibilidade de *S. cerevisiae* ao etanol aumenta, levando ao término prematuro da fermentação (VAN UDEN, 1989). A elevação dos níveis de etanol durante a fermentação de substratos ricos em açúcar por *S. cerevisiae* em batelada alimentada causou redução na taxa específica de crescimento, na taxa de fermentação e na viabilidade celular da levedura (CASEY; INGLEDEW, 1986). No caso de cepas industriais de *S. cerevisiae* o mais importante estresse químico é a toxicidade do etanol, sendo assim, de grande significado comercial a habilidade ou a inabilidade das leveduras em tolerar os efeitos tóxicos do etanol (BIRCH; WALKER, 2000).

Como o etanol se acumula em nível suficiente para inibir a fermentação (BROWN et al., 1981; CYSEWSKI; WILKE 1977; GRAY, 1941), nota-se normalmente que este acúmulo causa um declínio progressivo na atividade fermentativa das leveduras (BAZUA; WILKE, 1977; GHOSE; TYAGI, 1979; LUONG, 1985).

Os efeitos tóxicos do etanol podem ser verificados na inibição das enzimas glicolíticas e em numerosos processos biológicos, muitos dos quais estão associados com os lipídios da membrana celular (PETROV; OKOROKOV, 1990; INGRAM; BUTTKE, 1984; DOMBEK; INGRAM, 1987). Muitas das mudanças induzidas em leveduras pela exposição a níveis estressantes de etanol são idênticas àquelas causadas pelo estresse térmico (PIPER, 1993; PIPER et al., 1994). As respostas de proteção induzidas por choque térmico e etanol também mostram um alto grau de similaridade (PLESSET et al., 1982). Por exemplo, as proteínas de choque térmico Hsp 90 e Hsp 70 induzidas pelo calor são idênticas àquelas induzidas pelo etanol (PIPER et al., 1994). Esses dois estresses também têm efeitos indutivos similares nos níveis das

duas principais proteínas integrantes da membrana plasmática, a ATPase e a Hsp 30. Na realidade, o álcool e a temperatura exercem um efeito sinérgico na resposta das células ao choque térmico, com álcoois mediando a redução nas mínimas e máximas temperaturas requeridas para a indução da resposta ao estresse em *S. cerevisiae* (CURRAN; KHALAWAN, 1994).

Tanto o estresse térmico como o etanólico pode causar rompimento da homeostase iônica celular, levando à redução da atividade metabólica e eventual morte da célula (BIRCH; WALKER, 2000).

Os íons magnésio foram indicados em muitos estudos como atenuantes dos efeitos nocivos de estresse em leveduras *S. cerevisiae* (DOMBEK; INGRAM, 1986b; KARAMUSHKA; GLAD, 1994; BIRCH; WALKER, 1996; CIESAROVÁ et al., 1996; BLACKWELL et al., 1997).

Como um íon inorgânico essencial, o magnésio está envolvido em muitas funções fisiológicas, incluindo crescimento, divisão celular e atividade enzimática (WALKER, 1994). Através da interação com os fosfolípidos da membrana celular, os íons magnésio diminuem a permeabilidade do plasmalema a cátions e, principalmente, a ânions, resultando na estabilização da bi-camada da membrana (PETROV; OKOROKOV, 1990). Observações do efeito protetor do magnésio em resposta a níveis tóxicos de etanol têm sugerido que o magnésio desempenha um importante papel na proteção da célula e no restabelecimento celular após o estresse (BIRCH; WALKER, 2000).

Rees e Stewart (1997) mostraram que o magnésio atua principalmente intracelularmente, sendo requerido como cofator de mais de 300 enzimas, incluindo todas as sintetases, fosfatases e quinases. O magnésio também tem sido indicado como regulador metabólico do piruvato e tem sido apontado como envolvido na estabilização de ácido nucléico, ribossomos, polissacarídeos e lipídios da membrana celular (REES; STEWART, 1997).

Birch e Walker (2000) mostraram que o magnésio atua como protetor contra estresse em leveduras, tais como os causados por etanol ou elevada temperatura. Pode ainda influenciar diretamente no desempenho fermentativo de leveduras. Em consideração ao catabolismo de carboidratos e fermentação, íons de magnésio são

requeridos como cofator chave para a atividade glicolítica e de enzimas alcoogênicas (WALKER, 1994; WALKER; MAYNARD; JOHNS, 1990).

Dombek e Ingram (1987) demonstraram que deficiências de magnésio em meios de fermentação foram primariamente responsáveis pelo declínio na atividade fermentativa de leveduras. Em adição, uma maior produção de etanol por leveduras é observada quando meios de cultivo, tais como melaços e mostos para vinho e cerveja, são suplementados com magnésio, indicando que tais meios podem ser deficientes em magnésio disponível para a performance ótima de fermentação.

Walker e Maynard (1997) concluíram que a absorção de magnésio e a subsequente utilização destes íons por células de leveduras parecem ser pré-requisitos para a ocorrência de atividade fermentativa máxima.

Por esses motivos, o objetivo do presente trabalho foi estudar a participação de íons de magnésio na reação contrária aos efeitos danosos dos estresses gerados pelo calor e pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

A hipótese testada foi a de que o magnésio protege células de leveduras contra o estresse causado por altas temperaturas e concentrações elevadas de etanol. Nos processos de fermentação industrial há uma concentração gradativa do etanol no meio, promovendo estresse e certo grau de letalidade às leveduras responsáveis pela fermentação. Isso pode ocasionar declínio prematuro da fermentação, com conversão apenas parcial em etanol dos carboidratos presentes no mosto. Ainda, a energia dissipada pelo processo de fermentação pode elevar a temperatura do mosto a ponto de ocasionar estresse térmico às células de leveduras. A suplementação do mosto com magnésio poderia promover maior tolerância das células ao etanol e ao choque térmico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Efeito da temperatura sobre as leveduras

A temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam o crescimento e o metabolismo das leveduras (ESTRUSH, 2000). A temperatura ótima de crescimento

das leveduras, bem como sua termo-tolerância, varia de uma espécie para outra, podendo este valor ser acima de 40°C para algumas espécies.

Diferentes temperaturas afetam a atividade metabólica e o crescimento das leveduras. Isso pode ser atribuído não somente à genética das diferentes cepas, mas também à composição do meio de crescimento e a outros parâmetros, tais como pH, agentes químicos, desidratação osmótica, estado nutricional e fase de crescimento.

A maioria dos componentes das células, como proteínas e membrana plasmática, são drasticamente afetadas quando as células são expostas a altas temperaturas (BENEY; GERVAIS, 2001).

A membrana plasmática das leveduras é composta de lipídeos, que sofrem mudanças de acordo com as variações de temperatura. Em presença de altas temperaturas há menor número de insaturações nos lipídeos que compõem a membrana (WATSON, 1987).

Os danos térmicos para as células de leveduras resultam do rompimento das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas, promovendo desnaturação das proteínas e ácidos nucleicos. Obviamente há meios fisiológicos e metabólicos de regulação da temperatura interna da levedura, porém, invariavelmente, há um aumento da injúria celular, promovendo um rápido declínio da viabilidade do microrganismo (WALKER, 1998).

Estudos têm demonstrado que os danos à membrana plasmática parecem ser o principal fator de morte celular. Danos na integridade da membrana poderiam afetar a atividade funcional das proteínas constituintes da membrana (LEE; CHAPMAN, 1987), assim como ocasionar mudanças na fluidez da membrana, que é dependente do grau de saturação dos fosfolipídios (BENEY; GERVAIS, 2001).

Carratu et al. (1996) propuseram que a composição da membrana, mais precisamente o padrão de saturação e insaturação dos seus ácidos graxos, pode apresentar envolvimento com a resposta das células ao choque térmico. Outros autores também demonstraram que a composição lipídica da membrana plasmática afeta a resposta da levedura ao estresse térmico (CHATTERJEE; KHALAWAN; CURRAN, 1997; CURRAN et al., 2000).

Segundo Gervais et al. (2003) o choque térmico promove aumento da permeabilidade da membrana celular, facilitando a liberação de íons e de água intracelulares, podendo levar a célula à morte.

A exposição das células de leveduras à temperatura acima da considerada ótima de crescimento proporciona aumento da síntese de proteínas (ESTRUCH, 2000). Fernandes, Moradas-Ferreira e Sousa (1993) descreveram o aparecimento de proteínas de 37 KDa na parede celular de leveduras quando submetidas a um aumento de temperatura de crescimento de 26°C para 40°C.

Watson e Cavicchioli (1983), trabalhando com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces sake* a 37°C e submetidas a choque térmico de 52°C por 5 minutos ou crescidas em temperaturas de 23°C e submetidas ao choque térmico de 37°C por 30 minutos, notaram que as leveduras adquiriram maior tolerância ao etanol, sugerindo que houve produção de proteínas de choque térmico pelas mesmas.

Muitas das modificações que ocorrem nas células de leveduras ocasionadas por choque térmico são idênticas às causadas pela exposição das células ao estresse etanólico (BIRCH; WALKER, 2000). Segundo Ruis, Schuller (1995) e Estruch (2000) a reprogramação da funcionalidade das células em resposta a estresses é semelhante para condições de estresse térmico, osmótico, oxidativo ou etanólico.

2.2 Efeito do etanol na fisiologia e metabolismo celular de leveduras

Um problema encontrado na fermentação ou na biotecnologia da levedura é o acúmulo de etanol na fermentação, o qual representa um potente estresse químico às suas células. Desse modo, a introdução de substâncias que possibilitem uma maior capacidade de resposta da levedura ao estresse tóxico do etanol tem grande relevância para a indústria alcooleira.

O etanol é um componente que aumenta a permeabilidade da membrana plasmática tanto para íons como para metabólitos de pequeno peso molecular (COWAN, 1995). Além disso, reduz a disponibilidade de água celular, promovendo instabilidade à membrana e às enzimas.

Ingram (1976) concluiu em seu experimento com células de *Escherichia coli* que o etanol causa diminuição da fluidez da membrana celular ao intercalar-se na bicamada lipídica, restringindo assim a movimentação das cadeias de ácidos graxos ou preenchendo os espaços deixados pelos ácidos graxos insaturados.

Piper et al. (1994), em estudo sobre a inibição da síntese de proteínas de choque térmico em *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram estímulo da atividade da ATPase da membrana plasmática em resposta ao estresse etanólico e térmico.

Marques e Serra (2004), em experimento com reciclo fermentativo utilizando *S. cerevisiae* IZ-1904, observaram um aumento gradual da concentração alcoólica do vinho com o decorrer de oito reciclos. Esse acúmulo interferiu no desempenho do processo fermentativo pelas leveduras, sugerindo o estudo de métodos que atenuassem os efeitos degenerativos do álcool sobre a levedura.

Claro, Rijsbrack e Soares (2006), trabalhando com levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC – 1195) em meio YEPD, sob efeito estressante do etanol em diferentes concentrações, concluíram que a concentração de etanol de 10% (v/v) induziu 10 e 40% de letalidade nas células de levedura após 8 e 24 horas de interação, respectivamente.

2.3 Influência do magnésio nas atividades fisiológicas e metabólicas da levedura

Os íons metálicos são substâncias de extrema importância para a fermentação alcoólica e apresentam grande influência na fisiologia das células de leveduras. Os metais considerados mais importantes no processo de fermentação são potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, cobre e zinco (WALKER, 2004).

Os íons metálicos são responsáveis pelo crescimento das células de *Saccharomyces cerevisiae*, atuando principalmente no transporte através da membrana plasmática, na estrutura celular e na funcionalidade das células.

Dentre as diversas funções estruturais e metabólicas, os íons de magnésio atuam como nucleotídeos e cofatores de enzimas glicolíticas, de transporte e daquelas que participam de processos como replicação, transcrição e tradução de DNA. Por meio de uma maior quantidade de magnésio acessível às células de levedura obtém-se um

prolongamento do crescimento exponencial, concedendo grande acúmulo de massa celular, aumento da conversão de carboidratos em álcool e redução do tempo requerido para essa conversão (WALKER et al., 2003).

O magnésio está envolvido na estabilização e preservação da permeabilidade celular (BROCK, 1962), sendo que o cátion Mg^{+2} apresenta maior envolvimento na estabilidade dos lipopolissacarídeos do exterior da membrana plasmática microbiana (HUGHES; POOLE, 1989). Não se limitando às funções de estabilização da membrana, o magnésio apresenta-se como indispensável para a estabilidade de estruturas sub-celulares e organelas, principalmente os ribossomos (MEERS; TEMPEST, 1969) e as mitocôndrias (DOW et al., 1970; WALKER, et al., 1982).

Uma deficiência de magnésio no meio pode ocasionar uma menor produção de álcool, conseqüentemente com uma menor concentração deste no vinho, limitação do crescimento celular e da conversão de carboidrato em etanol. Assim, a adição de magnésio na fermentação prolonga a fase de crescimento exponencial das células de levedura, concedendo maior acúmulo de massa celular sem afetar a sua viabilidade. Deste modo, a presença de magnésio tende a proporcionar uma diminuição do tempo requerido para conversão de glicose em álcool em cerca 1/3 comparada a um meio não suplementado. Além disso, células suplementadas com magnésio promovem aumento da velocidade de fermentações (DOMBEK; INGRAM, 1986b).

Blazeajak et al. (2003) em estudo com levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* (cepa No. 102), cultivada em meio enriquecido com $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e contendo $1,25 \text{ g L}^{-1}$ de íons Mg^{+2} , constataram aumento significativo de magnésio na parede celular e no protoplasma, maior quantidade total de proteínas localizadas no protoplasma e aumento da absorção dos íons de magnésio durante a fase logarítmica de crescimento. Do total de magnésio absorvido, 85% se encontrava localizado na parede celular. Trabalhando com a mesma cepa de levedura e com o mesmo meio de cultivo enriquecido com magnésio, Gniewosz et al. (2006) também observaram aumento da concentração de magnésio intracelular e maior quantidade de magnésio na parede celular, ressaltando a ocorrência desse fenômeno com maior intensidade nas 6 primeiras horas após a inoculação da levedura no meio enriquecido.

O magnésio é um cátion bi-valente metálico, intracelularmente encontrado em alta concentração, podendo apresentar-se em duas formas: livre e ligado. O último predomina em ligações intracelulares de alta afinidade (CAMPBELL, 1983), podendo formar diferentes ligações, tais como protéicas e aniônicas (ELIN, 1987). O magnésio ligado é indisponível para processos fisiológicos e bioquímicos, sendo assim a forma livre a mais ativa. Porém, a forma livre representa uma fração muito pequena (1 a 10%) do magnésio intracelular total. Isto representa aproximadamente 1 a 10 mM em células procariontes e eucariontes de microrganismos e 0,2 a 1 mM em células animais não musculares. Mesmo em alta concentração extracelular de Mg^{+2} , o teor interno deste tende a se manter em valores milimolares (FRAUSTO DA SILVA; WILLIAMS, 1991).

Nas plantas os íons de magnésio são absorvidos no solo pelo sistema radicular, por fluxo de massa e interceptação radicular. Os fatores que condicionam a marcha de absorção dos cátions é a umidade do solo e as características genéticas varietais que regulam o desenvolvimento do sistema radicular da planta. Cesar et al. (1990), analisando elementos de composição mineral de diversas variedades de cana-de-açúcar, constataram para o magnésio, na forma de MgO, valores que variaram de 200 a 285 mg L⁻¹ de caldo. Observaram que o teor de magnésio no caldo não se alterou significativamente de uma variedade para outra e relataram que esses valores encontravam-se abaixo do nível mínimo ideal para uma satisfatória fermentação do mosto (320 mg L⁻¹ de caldo de cana-de-açúcar).

2.4 Efeito protetor do magnésio em células de levedura

A otimização da concentração dos íons metálicos em meios complexos industriais encontra uma dificuldade, pois muitas vezes estes meios apresentam composições, cujas propriedades quelantes e de grande poder de adsorção, anulam o desempenho funcional dos íons metálicos em atividades celulares. Na indústria de bebidas, como tentativa de contornar este fato e visando um elevado nível intracelular de magnésio ao inóculo para atingir uma máxima condição fisiológica antes do processo de fermentação, Birch, Ciani e Walker (2003) utilizaram, previamente ao processo de fermentação, um pré-condicionamento das células de leveduras em meios

com altas concentrações de magnésio. Essa técnica foi originalmente estabelecida por Smith e Walker (2000) para leveduras cervejeiras, porém Birch (1997) já testara técnica similar, a qual utilizando cepas de leveduras viníferas pré-condicionadas em meio contendo de 0,05 a 0,8 g. L⁻¹ de Mg obteve um aumento da concentração intracelular do íon metálico.

Smith (2001) utilizando *S.cerevisiae* pré-condicionada por 48h em meio rico em magnésio, na forma de acetato de magnésio, obteve maior quantidade de magnésio intracelular na levedura, com conseqüente aumento da produtividade de etanol e da tolerância das células de leveduras ao estresse etanólico (10% v/v) durante a fermentação (Figura 1).

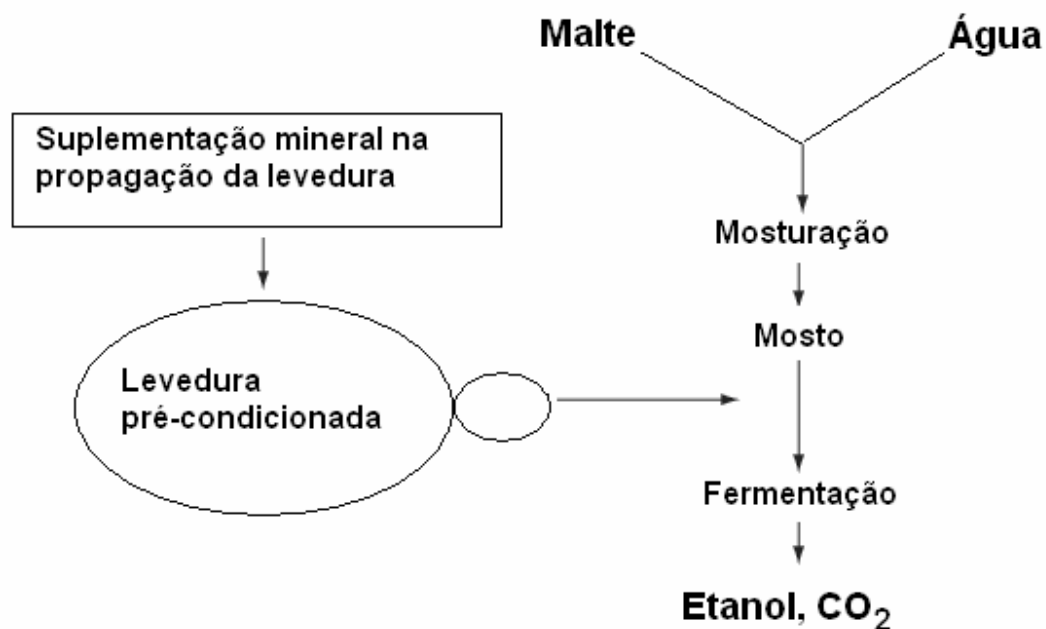


Figura 1 - Concepção de levedura pré-condicionada para fermentação de mosto de malte (Fonte: Walker; Smith; Hall, 2003)

Nessa mesma linha de pesquisa, Birch, Ciani e Walker (2003), trabalhando com *S. cerevisiae* L-2226 e DBVP2168 pré-condicionadas com íons Mg, obtiveram um melhor desempenho fermentativo da levedura, com maior consumo de glicose e maior produção de álcool (7%v/v na pré-condicionada contra 5,3%v/v na não condicionada).

Esse pré-condicionamento diminuiu o tempo de fermentação. Os referidos autores sugeriram ainda, de maneira hipotética, que esse fenômeno ocorreu devido ao estímulo de enzimas glicolíticas e a maior estabilidade da membrana plasmática.

Estudos demonstraram que os íons de Mg apresentam efeitos de preservação da viabilidade celular de leveduras, podendo apresentar primariamente uma função de estabilidade da membrana plasmática, através de atuações estruturais e funcionais. Estruturalmente o Mg pode estabilizar a membrana impedindo ligações cruzadas entre os fosfolípidios e grupos carboxílicos constituintes da membrana. Em termos funcionais o íon metálico Mg promove a ação da bomba de H-ATPase, a qual é vital para manter a funcionalidade da fisiologia da célula da levedura (WALKER, 1998).

Em trabalhos com pré-condicionamento ou suplementação com magnésio em leveduras sob processos biotecnológicos de fermentação pode-se encontrar a utilização de magnésio principalmente nas formas de sulfato, acetato, cloreto e lactato. No entanto, a forma mais comumente utilizada nesses estudos é o sulfato de magnésio. A suplementação da levedura com esse sal apresentou resultados como estimulação da fermentação (REES; STEWART, 1997; WALKER, 1996), maior tolerância ao estresse térmico e etanólico (WALKER, 1998), aumento da biomassa, elevação da produção de etanol, maior tolerância ao efeito nocivo do etanol (CHUN-KENG; FENG-WU; LI-JIA, 2003), estímulo às enzimas glicolíticas e maior estabilidade da membrana celular (BIRCH, 2003), efeitos organolépticos ao produto final (BIRCH; CIANI; WALKER, 2003) e prolongamento da fase exponencial de crescimento da levedura (DOMBEK; INGRAM, 1986a).

2.5 Interação entre cálcio e magnésio em leveduras

O magnésio é biologicamente um elemento único, insubstituível devido a suas propriedades de alta densidade e extrema agilidade em difusão. Não participa de reações de oxi-redução em células, possui propriedades iônicas e covalentes e apresenta alta biodisponibilidade. Devido às características acima mencionadas o magnésio atua como regulador do metabolismo, cofator de enzimas e estabilizador de ribossomos, dentre outras funções (WALKER, 1999).

Em contraste com o magnésio, o cálcio é conhecido por ter relativamente poucas e específicas funções bioquímicas, como por exemplo, a manutenção (SALTUKOGLU; SLAUGHTER, 1983) e o crescimento celular, porém sendo necessário em quantidades muito menores do que as exigidas para o magnésio (YOVATT, 1993).

Cabe ressaltar que, mesmo pertencendo ao mesmo grupo da tabela periódica (II A), cálcio e magnésio demonstram funções biológicas, inorgânicas, estruturais, termodinâmicas e cinéticas distintas. Em relação à troca de ligações dos cátions livres no sistema biológico, o cálcio apresenta reações repentinas, no entanto o magnésio proporciona ações mais lentas, tal como a regulação metabólica (GRUBBS; MAGUIRE, 1987).

As diferenças entre esses dois elementos são tão acentuadas que, além de apresentarem frequentemente funções antagônicas no metabolismo celular, podem ainda assim ser diretamente concorrentes pelo mesmo sítio de ligações em ATPs ou complexos biológicos (JONES; GADD, 1990). Essa ação antagônica pode também proporcionar, em situações de alta concentração de cálcio, inibição de muitas das funções essenciais dependentes do magnésio (WALKER, 1999). Como exemplo, no caso de enzimas glicolíticas e piruvato quinase, nas quais o magnésio exerce a função de ativação, o íon de cálcio proporciona a inibição, devido à competição pela ligação química (KAIM; SCHWEDERSKI, 1994).

Em células de leveduras o magnésio está associado a grupos fosfatos, enquanto que o cálcio se liga a proteínas e a uma quantidade limitada de enzimas. Na atividade de transporte diferem-se tanto em tamanho quanto em conformação e no crescimento e divisão celular há uma grande necessidade de íons magnésio, o que já não ocorre com íons cálcio (WALKER, 1999).

As atividades celulares eliminam íons de cálcio e captam íons de magnésio, formando um gradiente perpendicular à membrana plasmática de saída de cálcio no sentido contrário à entrada de magnésio. Deste modo, os níveis de cálcio no citoplasma são mantidos em concentrações submicromolares, quantidades estas suficientes para a regulação protéica e o controle de transporte da membrana plasmática.

Intracelularmente o cálcio livre representa aproximadamente 0.01% do cálcio total. O magnésio apresenta níveis totais de 10 mM, sendo 0,5 a 1,0 mM intracelulares

(COWAN, 1995). Ambos estão ligados à parede celular, membrana plasmática, proteínas e enzimas, mas somente o magnésio se liga aos ácidos nucleicos, RNA e DNA, sendo fundamental para expressão gênica (WALKER, 1999).

Apesar da necessidade celular por magnésio, parte do conteúdo desse elemento no meio de cultivo encontra-se em formas indisponíveis. Íons metálicos, tais como o magnésio, apresentam-se ligados a grupos não específicos os quais não podem ser assimilados pela parede celular da levedura (SALTUKOGLU; SLAUGHTER, 1983). Essa situação influencia tanto as características intrínsecas da via de transporte do magnésio pela célula, como as características do meio de cultivo que apresenta propriedade quelante ou de adsorção. Desta forma, a composição do meio influencia o nível necessário de magnésio para o crescimento e fermentação da levedura (BIRCH; CIANI; WALKER, 2003).

Walker et al. (1996) estudando a influência do cálcio e magnésio na fermentação alcoólica, constataram que, ao aumentar a quantidade de magnésio, nos meios de fermentação, ocorreu um melhor desempenho na produção de álcool pelas leveduras. Porém, a quantidade de suplementação e a relação entre os dois íons variaram para os diferentes meios estudados (meio sintético, caldo de cana-de-açúcar, mosto de uva e de malte de cevada).

Rees e Stewart (1999) também comprovaram melhor desempenho dos parâmetros de fermentação (produção de álcool, viabilidade e massa celular) com o aumento de magnésio em relação ao cálcio no meio de fermentação com leveduras cervejeiras *S. cerevisiae*.

Estas informações são relevantes porque a indústria alcooleira no Brasil utiliza hidróxido de cálcio para a clarificação e purificação do caldo de cana-de-açúcar no preparo do mosto, podendo assim proporcionar às leveduras um meio fermentativo com maior concentração de íons cálcio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório do Setor de Açúcar e Alcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP).

3.1 Cultura de levedura

No experimento foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa Y-904, da AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda (Pederneiras-SP, Brasil). A cultura permaneceu estocada sob refrigeração (4°C) em meio YEPD líquido.

3.2 Meios de Cultura

Para reativação, crescimento e armazenamento da cultura de levedura foi utilizado o meio de cultivo YEPD (Yeast Extrat – Peptone - Dextrose), cuja composição foi:

Extrato de levedura -----	10g
Peptona -----	10g
Glicose -----	20g
Água destilada -----	1000 mL

Para o cultivo das células de levedura sob as condições de estresse foi utilizado o meio YEPD conforme formulado acima, porém com 15% de glicose ao invés de 2%, com o intuito de manter a fonte de glicose durante o período de incubação. Também foi testado um meio à base de caldo de cana-de-açúcar. No preparo deste meio foi utilizada cana-de-açúcar da variedade SP-83-2847, a qual se encontrava no quarto corte, em área cultivada nas dependências do próprio departamento. Os colmos foram cortados sem queima, despalhados e submetidos à moagem em um terno de moenda, sem embebição. O caldo foi peneirado para eliminar impurezas grosseiras, fervido para floculação, coagulação e precipitação de colóides e após resfriamento, filtrado em algodão. Após correção do brix para 18° com água destilada, o meio foi esterilizado em autoclave (1 atm, 120°C, 15 min).

3.3 Teste para crescimento da levedura em meio sólido com diferentes concentrações de Mg^{+2}

Este teste visou avaliar o desenvolvimento das colônias da levedura em meio YEPD sólido formulado com diferentes concentrações de magnésio, a fim de selecionar a concentração que apresentasse o melhor desempenho para posterior utilização no experimento.

A cultura de levedura foi reativada pela transferência de uma alíquota (0,3 mL) da cultura estoque para 5 mL de meio YEPD, com posterior incubação a 30°C por 48h. Em seguida, transferiu-se uma alíquota (0,3 mL) da cultura reativada para tubos de ensaios contendo 10 mL de meio YEPD, sendo incubado a 30°C por 48h.

Da cultura de levedura reativada foi retirada uma alíquota para plaqueamento em superfície em placas de Petri contendo YEPD sólido enriquecido com diferentes concentrações de Mg (0, 20, 40, 60, 80, 100 mmol), proveniente de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). As placas foram incubadas a $30 \pm 2^\circ C$ e monitoradas para avaliação do crescimento das colônias.

3.4 Reativação das células de levedura e enriquecimento com magnésio

A cultura de levedura foi reativada pela transferência de uma alíquota (0,3 mL) da cultura estoque para 10 mL de meio YEPD, com posterior incubação a 30°C por 48h. Em seguida, transferiu-se uma alíquota (0,3 mL) da cultura reativada para tubos de ensaios contendo 10 mL de meio YEPD enriquecido ou não com magnésio, sendo incubado a 30°C por 48h. Posteriormente transferiu-se a totalidade do conteúdo dos tubos de ensaio para Erlenmeyers de 250mL, contendo 150 mL de meio YEPD/caldo de cana-de-açúcar (enriquecido ou não com magnésio), com posterior incubação a 30°C, por 24 h, sob agitação de 80 rpm.

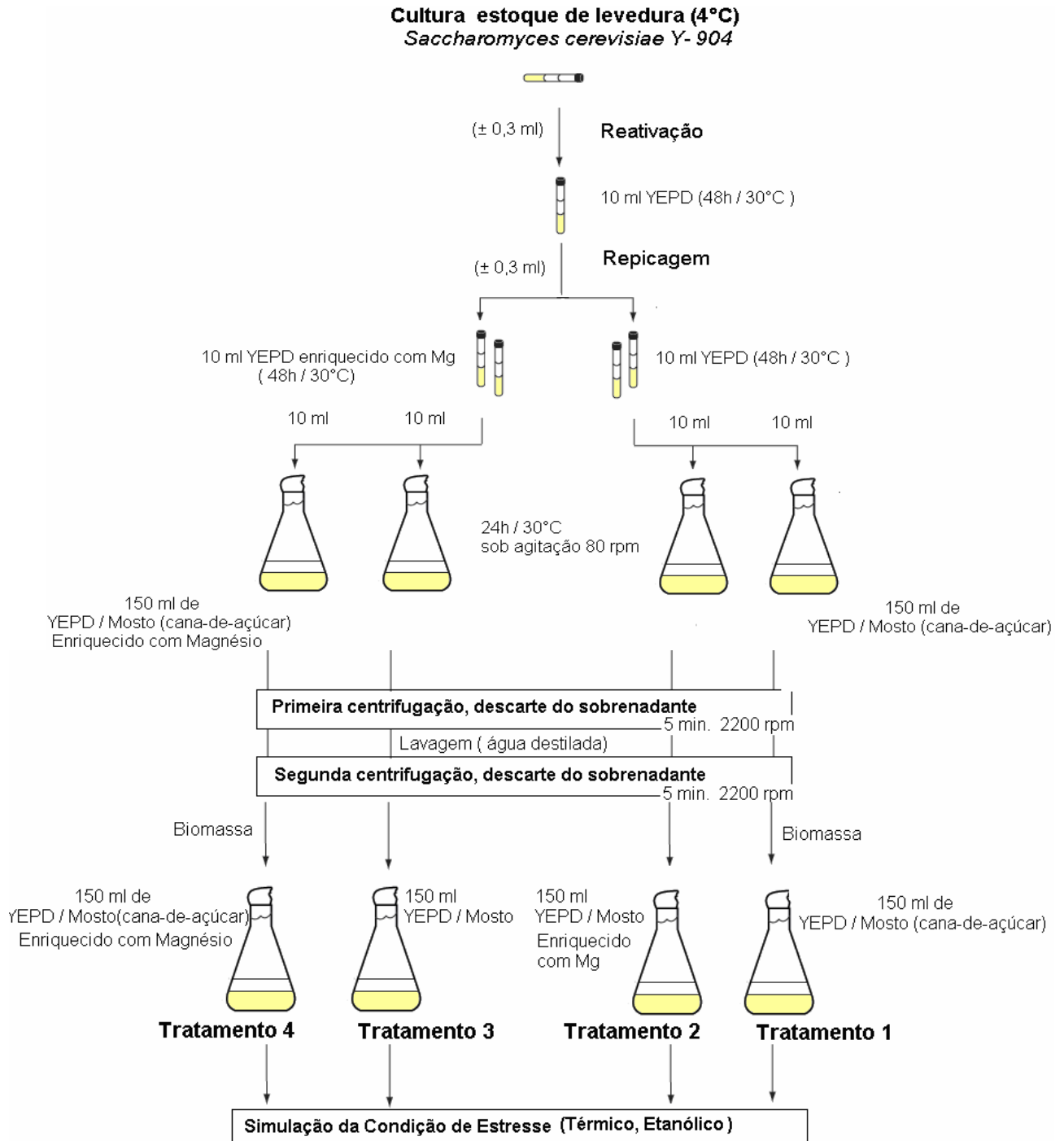
Em seguida os meios foram centrifugados a 590 G por 5 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado e a massa celular sedimentada foi ressuspensa em água

destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições. Repetiu-se duas vezes essa operação de lavagem das células de levedura.

A massa celular foi transferida para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio YEPD/caldo cana-de-açúcar enriquecido ou não com magnésio. Após homogeneização, a suspensão foi mantida em repouso por uma hora antes do início dos tratamentos de estresses térmico ou etanólico.

A conjugação da utilização dos meios enriquecidos ou não com magnésio permitiu a obtenção de 4 tratamentos em cada um dos meios de cultivo (YEPD e caldo cana-de-açúcar), sendo Tratamento 1 (sem magnésio intracelular e extracelular) – células reativadas e cultivadas em meio YEPD/caldo de cana-de-açúcar não enriquecido com magnésio; Tratamento 2 (sem magnésio intracelular e com extracelular) – células reativadas em meio YEPD/caldo de cana-de-açúcar não enriquecido com magnésio e cultivadas em meio YEPD/caldo cana-de-açúcar enriquecido com magnésio; Tratamento 3 (com magnésio intracelular e sem extracelular) – células reativadas em meio YEPD/caldo de cana-de-açúcar enriquecido com magnésio e cultivadas em meio YEPD/caldo cana-de-açúcar não enriquecido com magnésio; e Tratamento 4 (com magnésio intracelular e extracelular) – células reativadas e cultivadas em meio YEPD/caldo de cana-de-açúcar enriquecido com magnésio.

Os meios de cultivo enriquecidos com magnésio receberam suplementação de 20 mmol de Mg, proveniente de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).



Obs.: YEPA / Mosto (cana-de-açúcar) corresponde a utilização de um ou outro meio de cultivo; ao iniciar o procedimento com um determinado meio subentende-se que o mesmo foi perpetuado até o final.

Figura 2 - Ilustração dos procedimentos utilizados no desenvolvimento de formação dos tratamentos

3.5 Determinação da concentração de magnésio

A concentração de magnésio nos meios de cultivo e nas células da levedura foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (Gemini AA 12/1475), após digestão nitro-perclórica das amostras (Caldas, 1999). Os pesos secos das leveduras foram medidos após secagem das células a 60°C por 4h. Esta análise foi realizada no Setor de Química Analítica do Departamento de Ciências Exatas da USP/ESALQ e contou com a gentil colaboração do Prof. Dr. Arnaldo Antonio Rodella, docente do referido Departamento.

3.6 Condições de estresse

3.6.1 Térmico

A temperatura do meio de cultivo contendo a suspensão de células de levedura foi elevada de 30°C para 42°C, com incubação por um período de 48h, sob agitação de 80rpm.

3.6.2 Etanólico

As culturas de levedura foram submetidas ao estresse etanólico através da elevação da concentração de etanol do meio de cultivo para 10% (v/v) com etanol absoluto, com posterior incubação a 30°C por 48h, sob agitação de 80rpm.

3.6.3 Estresse térmico e etanólico

As culturas foram submetidas aos dois estresses (itens 3.6.1 e 3.6.2) concomitantemente, isto é, elevação da temperatura e da concentração de etanol do meio de cultivo para 42°C e 10% (v/v), respectivamente, com incubação por 48h, sob agitação de 80rpm.

3.7 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular da levedura foi determinada às 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24 e 48 h do período de incubação sob as condições de estresse térmico e/ou etanólico. Após coloração com eritrosina, as células vivas e mortas da levedura foram contadas em microscópio ótico (Olympus BH), usando câmara de Neubauer (OLIVEIRA et al., 1996).

3.8 Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado foi em blocos casualizados, com 3 repetições por bloco. Os resultados das análises foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey (nível 5%) (PIMENTEL-GOMES, 2002). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, 1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento da levedura em meio sólido (YEPD – Agar) com diferentes concentrações de Mg^{+2}

O meio suplementado com 20 mmol de magnésio permitiu o maior crescimento de células da levedura dentre as diferentes concentrações testadas (Tabela 2), porém não diferiu significativamente do meio não suplementado, o qual continha 0,11 mmol de magnésio (Tabela 1).

Os meios suplementados com 40 mmol de magnésio ou mais apresentaram resultados similares de crescimento celular da levedura, porém inferiores ao crescimento no meio suplementado com 20 mmol. O menor crescimento de células de levedura foi observado no meio suplementado com 80 mmol de magnésio.

Portanto, optamos nesse experimento pela concentração de 20 mmol de magnésio para suplementação dos meios de cultivo testados. Walker et al. (2003)

também sugerem a concentração de 20 mmol de magnésio para suplementação em meio de caldo de cana-de-açúcar.

Birch e Walker (2000) demonstraram em estudo utilizando *Saccharomyces cerevisiae* a influência do íon magnésio na síntese de proteínas de choque térmico. Os autores relatam que valores de magnésio no meio acima de 50 mmol promovem a síntese de proteínas de choque térmico supostamente devido ao efeito associado do estresse térmico e do estresse osmótico causado pela alta concentração de magnésio, fato não constatado em concentrações mais baixas (5 a 20 mmol).

No mesmo estudo, Birch e Walker (2000), analisando a influência do magnésio em *Saccharomyces cerevisiae* sob choque térmico, verificaram que células crescidas em meio contendo 20 mmol de magnésio, ao serem expostas ao choque térmico prolongado (5 horas), apresentaram menor taxa de mortalidade, mantendo a viabilidade celular em torno de 60%.

Em relação à toxicidade do magnésio, alguns estudos demonstraram que doses acima de 25 g L⁻¹ de Mg no meio de cultivo representam efeitos indesejáveis ao desenvolvimento das células (REES; STEWART, 1997, 1999). Essa concentração equivale a aproximadamente 1 mol de magnésio no meio.

Tabela 1 - Contagem celular da levedura (10⁷ufc mL⁻¹) cultivada em meios com concentrações crescentes de magnésio

Suplementação de magnésio no meio	Contagem celular da levedura (10⁷ufc mL⁻¹)
0 mmol (0 ppm)	8.23 ab
20 mmol (484 ppm)	8.73 a
40 mmol (968 ppm)	5.20 bc
60 mmol (1452 ppm)	5.93 b
80 mmol (1936 ppm)	4.66 c
100 mmol (2420 ppm)	5.43 bc

4.2 Enriquecimento dos meios de cultivo e das células de levedura com magnésio

Nota-se que nos resultados das análises realizadas por meio de espectroscopia de absorção atômica para determinação de magnésio houve confirmação quantitativa das expectativas de suplementação, pois se detectou um aumento de 474 mg Kg^{-1} (aproximadamente 20 mmol) de magnésio do caldo de cana-de-açúcar suplementado em relação ao caldo sem suplementação. No meio sintético YEPD o aumento foi semelhante ao do meio complexo (cana-de-açúcar), tendo como suplementação a adição de 480 ppm de Mg no meio suplementado (Tabela 2).

Em relação às leveduras, computou-se $2,19 \text{ mg g}^{-1}$ de Mg nas células de levedura cultivadas em caldo de cana-de-açúcar original e $3,26 \text{ mg g}^{-1}$ de Mg nas células de levedura cultivadas no caldo de cana-de-açúcar suplementado. No caso das leveduras cultivadas em meio sintético (YEPD), a quantidade de Mg encontrada foi de $0,575 \text{ mg g}^{-1}$ em meio não suplementado e $1,800 \text{ mg.g}^{-1}$ para o meio suplementado (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração de magnésio nos meios de cultivo e nas células de levedura

	Mg
Caldo de cana-de-açúcar	182 ppm
Caldo de cana-de-açúcar suplementado	656 ppm
Levedura cultivada em caldo de cana-de-açúcar	$2,19 \text{ mg g}^{-1}$
Levedura cultivada em caldo de cana-de-açúcar suplementado	$3,26 \text{ mg g}^{-1}$
Meio -YEPD	2,72 ppm
Meio -YEPD suplementado	482,5 ppm
Levedura cultivada em meio YEPD	$0,575 \text{ mg g}^{-1}$
Levedura cultivada em meio YEPD suplementado	$1,800 \text{ mg g}^{-1}$

Obs.: considera-se como meio suplementado a adição de 484 ppm (20 mmol) de magnésio no mesmo. Foram realizadas cinco repetições para cada análise.

Aumento da concentração de magnésio intracelular em leveduras cultivadas em meios suplementados também foi constatado por Blazejak et al. (2002), os quais detectaram duas a três vezes mais magnésio absorvido pelas células de leveduras cultivadas em meios enriquecidos com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como fonte de magnésio. Gniewosz et al. (2006) observaram aumento de três a quatro vezes na

concentração de magnésio em células de levedura cultivadas por 24 a 48 horas em meio suplementado com magnésio.

4.3 Efeito do estresse térmico sobre a levedura cultivada no meio sintético (YEPD)

Nos Tratamentos 1, 3 e 4 houve uma diminuição da viabilidade celular da levedura durante as cinco primeiras horas sob estresse térmico. Porém, apenas nos Tratamentos 1 e 3 esse decréscimo foi estatisticamente significativo. No Tratamento 2 a viabilidade celular da levedura se manteve constante nesse período. As células de levedura do Tratamento 3 apresentaram as maiores taxas de viabilidade nesse mesmo período, mantendo-se ao redor de 90%. As células de levedura do Tratamento 1 apresentaram as menores taxas de viabilidade nas primeiras 5 horas sob estresse térmico (Tabela 3).

Entre 5 e 48 horas de incubação sob estresse térmico foi observado em todos os tratamentos uma diminuição acentuada da viabilidade celular das leveduras. Essa diminuição foi distinta para cada tratamento, porém não se constatou diferença estatística significativa entre eles (Tabela 3, Figura 3).

Tabela 3 - Viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	81,43	B ab	82,83	B a	97,27	A a	94,22	A a
1	83,95	A a	84,94	A a	95,47	A a	92,20	A a
2	79,70	B ab	85,99	AB a	96,56	A a	91,26	Aba
3	78,78	A ab	84,67	A a	94,70	A ab	86,42	A a
4	75,69	A b	83,80	A a	91,94	A b	83,14	A a
5	79,64	A ab	83,90	A a	88,49	A c	78,75	A a
24	24,05	A c	39,24	A b	16,68	A d	31,03	A b
48	1,73	A d	3,64	A c	1,06	A e	2,94	A b

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

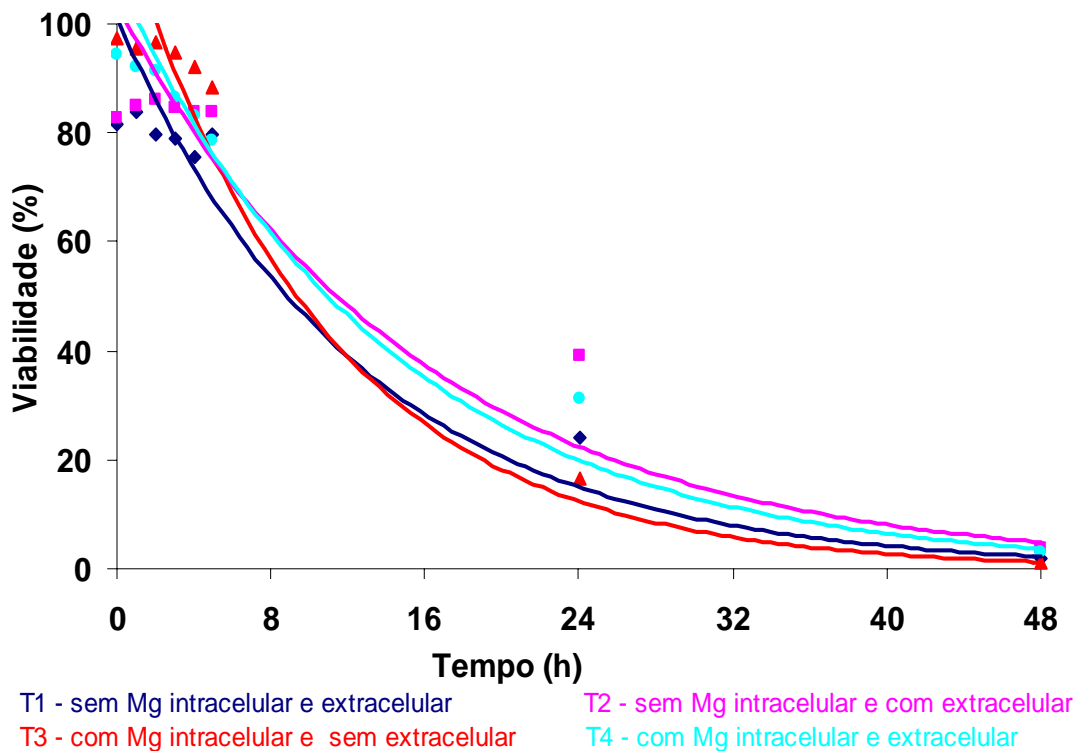


Figura 3 - Variação da viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico

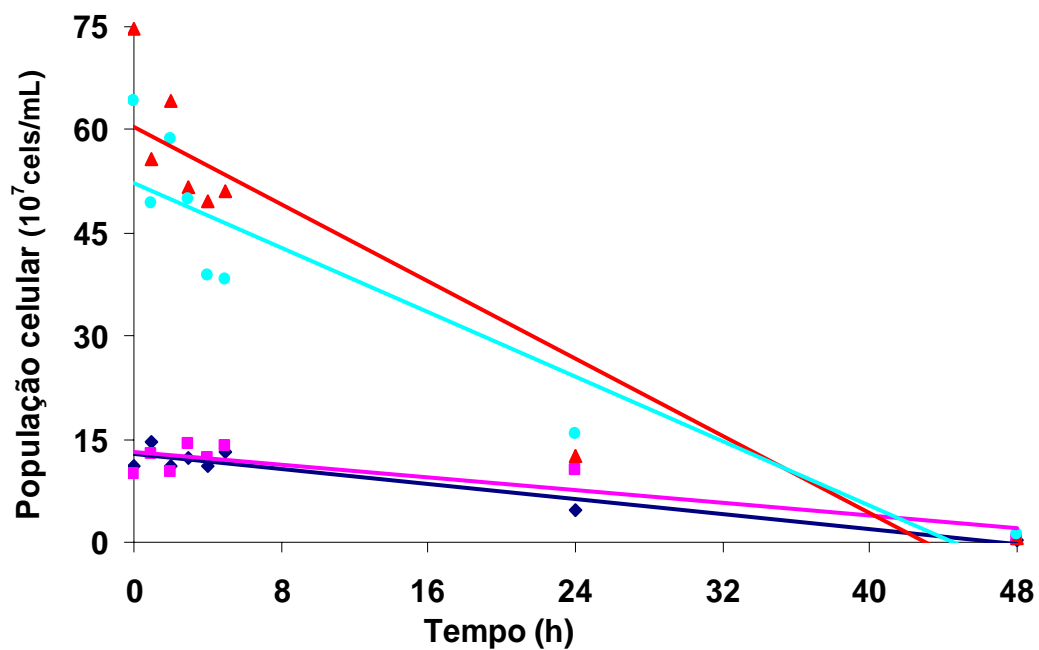
Em relação à população de células de leveduras, os tratamentos condicionados com Mg antes do estresse térmico (Tratamentos 3 e 4) apresentaram uma população celular inicial significativamente maior do que os tratamentos não condicionados com Mg (Tratamentos 1 e 2). No período de 24 h sob estresse térmico, as leveduras em todos os tratamentos apresentaram populações equivalentes estatisticamente. Porém, às 48 h constatou-se diferença estatística entre as populações dos Tratamentos 1 e 4, sendo que a população de células no Tratamento 1 apresentou o menor valor em relação aos demais tratamentos (Tabela 4).

Nas cinco primeiras horas de incubação, as populações de leveduras nos Tratamentos 1 e 2 apresentaram constante, diminuindo significativamente às 24 h para o Tratamento 1 e às 48 h para o Tratamento 2 (Tabela 4). As populações de leveduras nos Tratamentos 3 e 4 apresentaram declínio ao longo do período sob estresse térmico (Figura 4).

Tabela 4 - População celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	11,02	B a	9,97	B ab	74,83	A a	64,08	A a
1	14,65	B a	12,88	B a	55,63	A a	49,29	A ab
2	11,12	B a	10,18	B ab	64,08	A a	58,79	A ab
3	12,40	B a	14,32	B a	51,63	A a	49,83	A ab
4	11,00	B a	12,23	B ab	49,75	A ab	38,83	A ab
5	13,05	B a	13,95	B ab	51,04	A ab	38,29	A abc
24	4,58	A b	10,47	A ab	12,63	A bc	15,79	A bc
48	0,22	B b	0,43	AB b	0,56	AB c	1,13	A c

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.



T1 - sem Mg intracelular e extracelular T2 - sem Mg intracelular e com extracelular
T3 - com Mg intracelular e sem extracelular T4 - com Mg intracelular e extracelular

Figura 4 - Variação da população celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico

4.4 Efeito do estresse etanólico sobre a levedura cultivada no meio sintético (YEPD)

Nas cinco primeiras horas de cultivo sob estresse etanólico, os valores de viabilidade celular das leveduras dos Tratamentos 3 e 4 foram maiores que aqueles dos Tratamentos 1 e 2. Porém, após 24 h houve uma inversão desse comportamento, predominando maior viabilidade nas células de levedura dos Tratamentos 1 e 2 (Figura 5).

A cultura de levedura do Tratamento 4 foi a única que nas cinco primeiras horas de exposição ao estresse etanólico não apresentou queda significativa de sua viabilidade, mantendo-se com valores superiores a 90%. Contudo, essa mesma cultura (Tratamento 4) apresentou o menor percentual de células viáveis às 24 e 48 h sob estresse etanólico, 18,7% e 8,9% respectivamente (Tabela 5 e Figura 5).

Tabela 5 - Viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio sintético (YEPD), sob condição de estresse etanólico

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	86,03	B a	84,30	B a	97,83	A a	96,99	A a
1	83,26	B a	82,36	B a	94,86	A ab	96,21	A a
2	77,21	B a	82,15	B a	92,17	A ab	95,10	A a
3	76,91	C a	84,79	BCa	90,72	AB b	95,32	A a
4	74,77	B a	80,41	B a	91,72	A ab	92,02	A a
5	72,80	B ab	75,15	B ba	92,40	A ab	91,08	A a
24	57,15	A b	61,91	A b	28,52	B c	18,68	B b
48	40,21	A c	44,07	A c	24,93	A c	8,88	B c

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

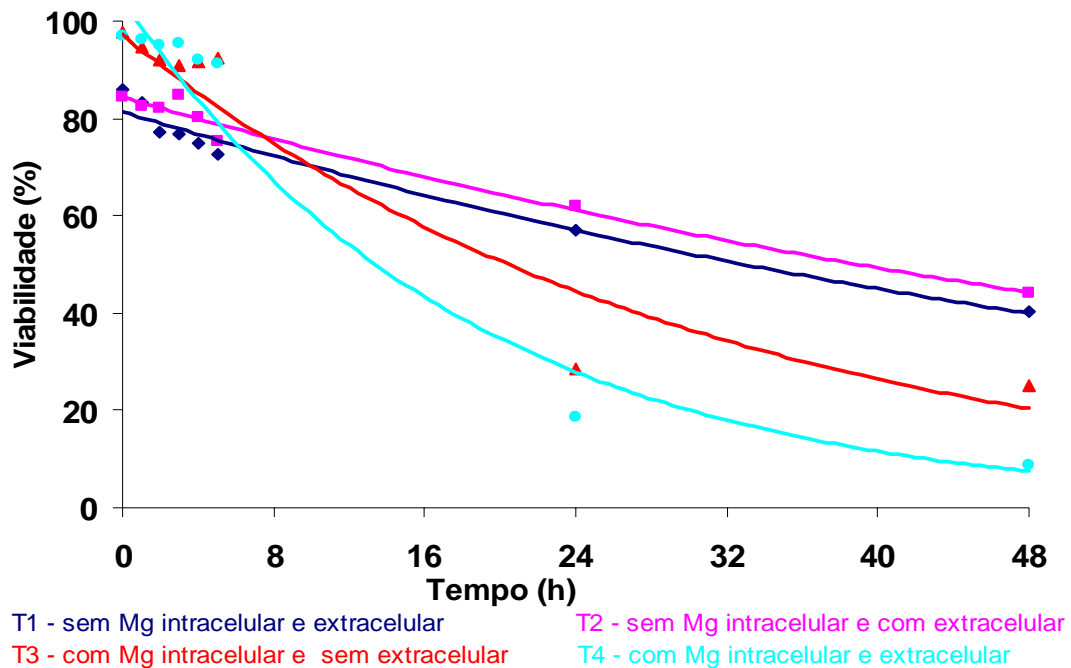


Figura 5 - Variação da viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio sintético (YEPD), sob condição de estresse etanólico

Em relação à população de células da levedura, os tratamentos condicionados com Mg antes do estresse etanólico (Tratamentos 3 e 4) apresentaram uma população celular inicial significativamente maior que os tratamentos não condicionados com Mg (Tratamentos 1 e 2).

No período de 24 h sob estresse etanólico, as leveduras em todos os tratamentos apresentaram populações equivalentes estatisticamente, pois a diminuição das populações de células de levedura nos Tratamentos 3 e 4 no período de 5 a 24 horas foi acentuada. Às 48 h de incubação sob estresse etanólico o Tratamento 4 apresentou a menor população de células da levedura e os Tratamentos 1 e 3 as maiores, sendo inclusive estatisticamente superiores à população celular do Tratamento 4 (Tabela 6 e Figura 6).

Tabela 6 - População celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio sintético (YEPD), sob condição de estresse etanólico

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratameto 4	
0	14,30	B ab	14,60	B a	55,63	A a	67,38	A a
1	17,52	B a	14,60	B a	45,92	A a	44,33	A b
2	11,25	B ab	13,70	B ab	44,13	A a	50,38	A ab
3	12,05	B ab	11,80	B ab	40,54	A a	49,58	A ab
4	11,97	B ab	12,15	B ab	45,46	A a	46,00	A b
5	11,20	B ab	11,72	B ab	41,13	A a	41,75	A b
24	11,75	A ab	9,72	A bc	11,46	A b	9,00	A c
48	7,22	AB b	5,92	BC c	9,92	A b	2,88	C c

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

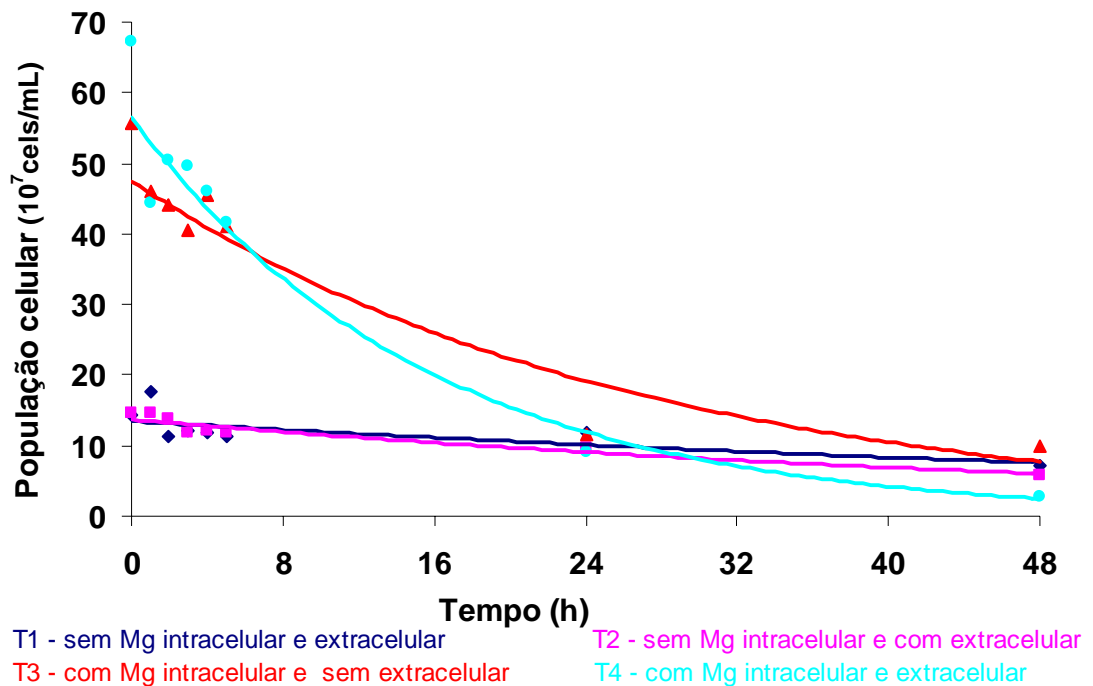


Figura 6 - Variação da população celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio sintético (YEPD), sob condição de estresse etanólico

4.5 Efeito dos estresses térmico e etanólico conjuntos sobre a levedura cultivada no meio sintético (YEPD)

As condições de estresses térmicos e etanólicos simultaneamente proporcionaram um declínio acentuado da viabilidade celular das leveduras em todos os tratamentos (Tabela 7 e Figura 7).

Na primeira hora expostas ao estresse, apenas as células de levedura do Tratamento 1 apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade. Nos demais tratamentos a viabilidade celular das leveduras também apresentou considerável diminuição, porém esse declínio não foi estatisticamente significativo na primeira hora. Com duas horas submetidas ao estresse, apenas a cultura de leveduras do Tratamento 3 manteve sua viabilidade estatisticamente constante, mesmo apresentando diminuição de aproximadamente 30%.

A partir de três horas sob as condições de estresses térmico e etanólico as células de leveduras do Tratamento 4 apresentaram taxas de viabilidade extremamente baixas (4,3% às 4 h e 1,3% às 5 h), destacando-se dos outros tratamentos.

Às 5 h sob os estresses, as culturas de leveduras dos Tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram valores semelhantes de viabilidade, 22,9%, 28,6% e 25,6%, respectivamente.

Em todos os tratamentos, os resultados das análises de viabilidade nos tempos de 24 e 48 horas mostraram-se semelhantes, com valores próximos a zero.

Tabela 7 - Viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico e etanólico conjuntos

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	88,33	B a	90,99	B a	99,02	A a	98,98	A a
1	36,66	B b	52,73	ABab	75,00	A ab	69,25	ABab
2	28,63	A b	42,56	A b	69,39	A abc	44,02	A c b
3	38,08	A b	29,91	A c b	55,59	A dbc	19,19	A c
4	28,72	A b	29,07	A c b	38,58	A d c	4,24	A c
5	22,89	A b	28,59	A c b	25,60	A de	1,26	A c
24	0,00	A b	0,21	A c	0,00	A e	0,00	A c
48	0,00	A b	0,00	A c	0,00	A e	0,00	A c

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

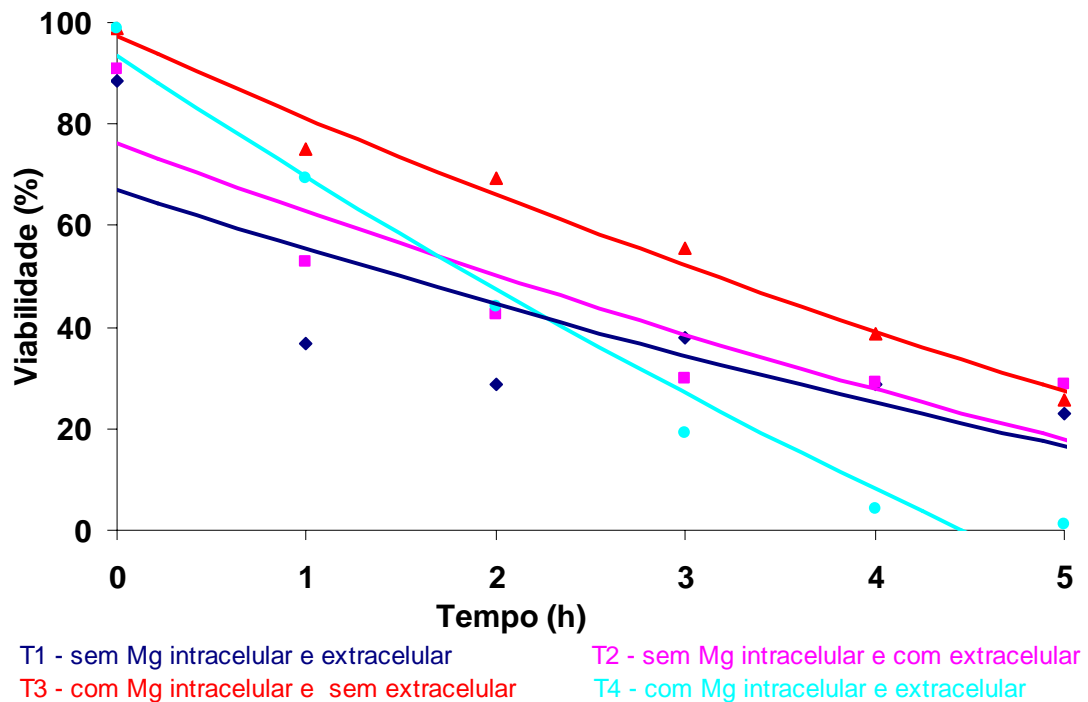


Figura 7 - Variação da viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 5h no meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico e etanólico conjuntos

Novamente aqui, com relação à população celular da levedura, observam-se valores significativamente superiores para os Tratamentos 3 e 4, os quais foram condicionados com magnésio previamente à condição de estresse (Tabela 8). Esta configuração de superioridade dos Tratamentos 3 e 4 permaneceu nas duas primeiras horas sob o estresse térmico e etanólico conjuntos.

As populações celulares das leveduras nos Tratamentos 1 e 2 diminuíram significativamente nas primeiras horas sob esse estresse, permanecendo a seguir constante até às 5 h de cultivo.

A população de células de leveduras do Tratamento 3, apesar de diminuir ao longo do período de incubação, esteve sempre superior às populações celulares dos outros tratamentos (Figura 8). No Tratamento 4, a população de células da levedura manteve-se superior a dos Tratamentos 1 e 2 até a terceira hora do período de incubação.

Tabela 8 - População celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico e etanólico conjuntos

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	14,08	B a	18,88	B a	63,25	A a	53,96	A a
1	4,12	B b	6,83	B b	40,54	A ab	27,75	A b
2	4,88	B b	5,12	B b	36,54	A b	17,79	AB cb
3	3,93	B b	3,45	B b	24,46	A cb	8,33	B cb
4	3,25	AB b	3,50	AB b	19,13	A cbd	1,58	B c
5	2,73	A b	4,37	A b	11,58	A c d	0,54	A c
24	0,00	A b	0,03	A b	0,00	A d	0,00	A c
48	0,00	A b	0,00	A b	0,00	A d	0,00	A c

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

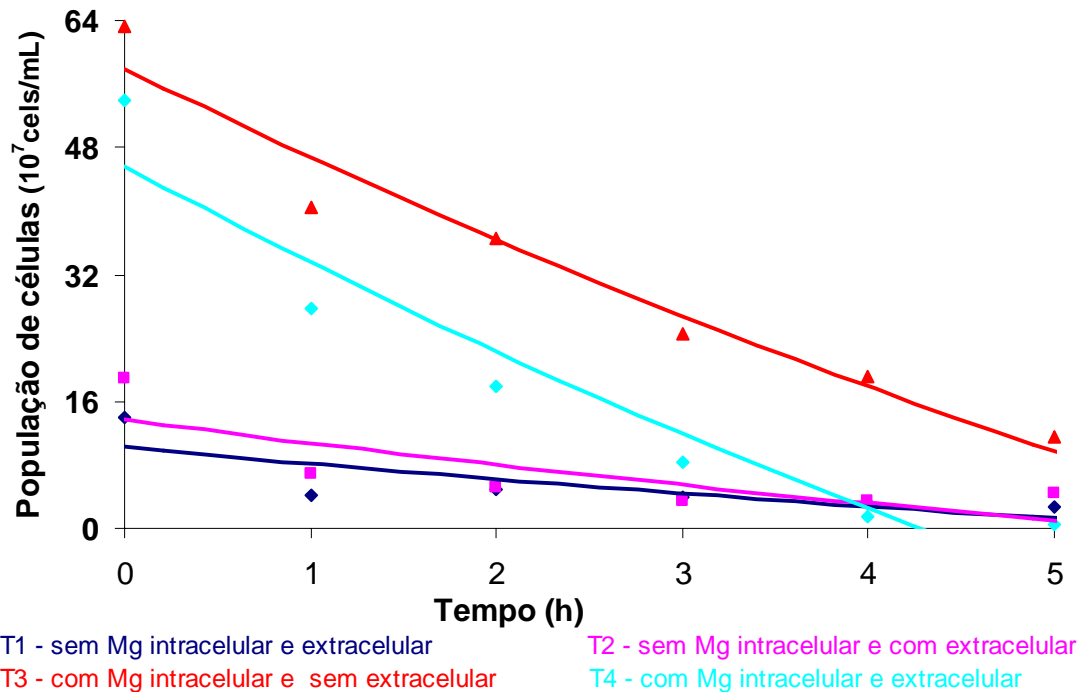


Figura 8 - Variação da população celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 5h em meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico e etanólico conjuntos

A análise dos resultados obtidos com o meio sintético YEPD permite constatar que, em geral, os tratamentos condicionados com magnésio previamente à exposição aos estresses apresentaram uma maior população celular de leveduras. Isso confirma resultados anteriores que relatam que a deficiência de magnésio no meio de cultivo representa um fator limitante ao crescimento de leveduras. Dombek e Ingram (1986b) estudaram o efeito da deficiência de micronutrientes em meio YEPD para crescimento de leveduras do gênero *Saccharomyces* e constataram que, dos constituintes inorgânicos testados, o único nutriente limitante do meio para o crescimento das leveduras foi o magnésio. Ao suplementarem o meio com 0,5 mmol de magnésio, obtiveram aumento de massa celular e maior conversão de carboidratos em etanol.

Resultado semelhante foi encontrado por Chun-Keng, Feng-Wu e Li-Jia (2003), que trabalharam com uma cultura mista de *Schizasaccharomyces pombe* e *S.*

cerevisiae. Ao adicionarem 3,5 mmol de Mg^{2+} no meio de crescimento (YEPD), obtiveram como resposta maior produção de biomassa, aumento da conversão de carboidratos em etanol e maior tolerância das células ao etanol. Segundo os autores, essas respostas foram devido ao magnésio ter induzido uma alteração na membrana plasmática, a qual a tornou menos permeável.

Os resultados do presente estudo mostraram também que, em geral, o enriquecimento do meio e/ou das células de levedura com magnésio proporcionou maior viabilidade das culturas de *Saccharomyces cerevisiae*. Independente da forma de suplementação (intracelular ou extracelular), esses tratamentos apresentaram resultados superiores em relação ao tratamento controle (sem suplementação de magnésio).

Birch e Walker (2000) também constataram essa superioridade de desempenho no processo de fermentação por leveduras *S. cerevisiae* nos tratamentos contendo magnésio, intracelular e/ou extracelular. Mencionaram que, tanto intracelular como extracelularmente, o magnésio desempenha ação protetora às células de leveduras sob condições de estresse. Porém, essa ação foi observada somente nas cinco primeiras horas de cultivo sob estresses térmico e alcoólico. A duração restrita da preservação da viabilidade celular pela ação do magnésio pode ter origens externas aos parâmetros analisados, como, por exemplo, restrição do açúcar no meio, sendo responsável pelo declínio da viabilidade. Dombek e Ingram (1986b) observaram que uma das conseqüências da maior concentração de magnésio no meio de cultivo é o estímulo à conversão de glicose em etanol pelas leveduras, a qual pode ser até 1,3 vez mais rápida comparada à conversão em meios de cultivo com quantidades de magnésio abaixo das requeridas para a fermentação.

4.6 Efeito do estresse térmico sobre leveduras cultivadas em caldo de cana-de-açúcar (meio complexo)

No meio preparado com caldo de cana-de-açúcar, ao contrário do meio YEPD, não se observou diferença entre os tratamentos em relação à viabilidade celular da levedura sob estresse térmico (Tabela 9 e Figura 9), predominando valores próximos de 100% de células viáveis, da primeira hora até 24 h de incubação. Às 48 horas, os valores de viabilidade celular das leveduras dos Tratamentos 1 e 2 diminuíram significativamente.

Tabela 9 - Viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse térmico

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	99,84	A a	99,72	A a	99,62	A a	99,68	A a
1	99,27	A a	99,25	A a	99,36	A a	99,61	A a
2	99,58	A a	99,66	A a	99,35	A a	99,54	A a
3	99,47	A a	99,70	A a	99,37	A a	99,56	A a
4	99,85	A a	99,76	A a	99,62	A a	99,52	A a
5	99,72	A a	99,77	A a	99,38	A a	99,69	A a
24	99,47	A a	99,66	A a	99,30	A a	99,31	A a
48	89,07	A b	94,44	A b	95,70	A a	95,10	A a

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

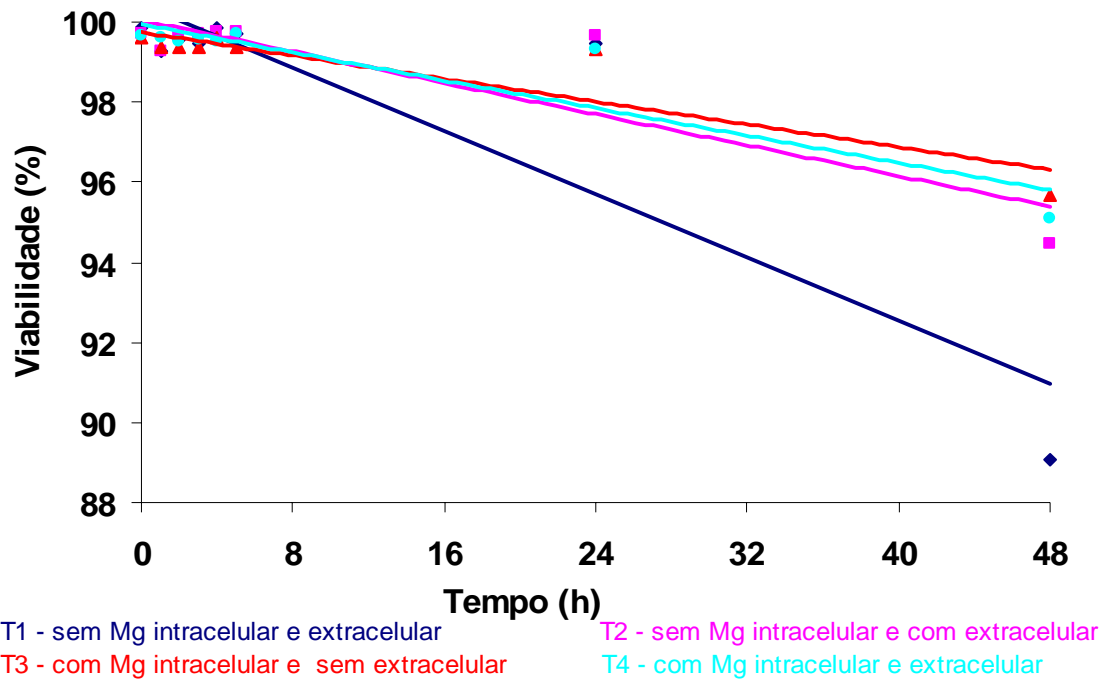


Figura 9 - Variação da viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse térmico

Também não foram observadas diferenças significativas nas populações de células de leveduras sob estresse térmico e submetida aos diferentes tratamentos em meio complexo (Tabela 10, Figura 10).

Tabela 10 - População celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse térmico

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	12,77	A a	19,27	A a	16,51	A a	14,13	A a
1	10,20	A a	14,71	A a	8,53	A b	15,52	A a
2	15,24	A a	11,64	A a	11,35	A ab	15,46	A a
3	14,47	A a	14,40	A a	13,05	A ab	13,23	A a
4	15,08	A a	10,49	A a	14,56	A ab	10,44	A a
5	11,16	A a	12,05	A a	13,43	A ab	16,36	A a
24	15,64	A a	16,62	A a	11,68	A ab	11,03	A a
48	10,08	A a	13,26	A a	11,18	A ab	14,30	A a

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

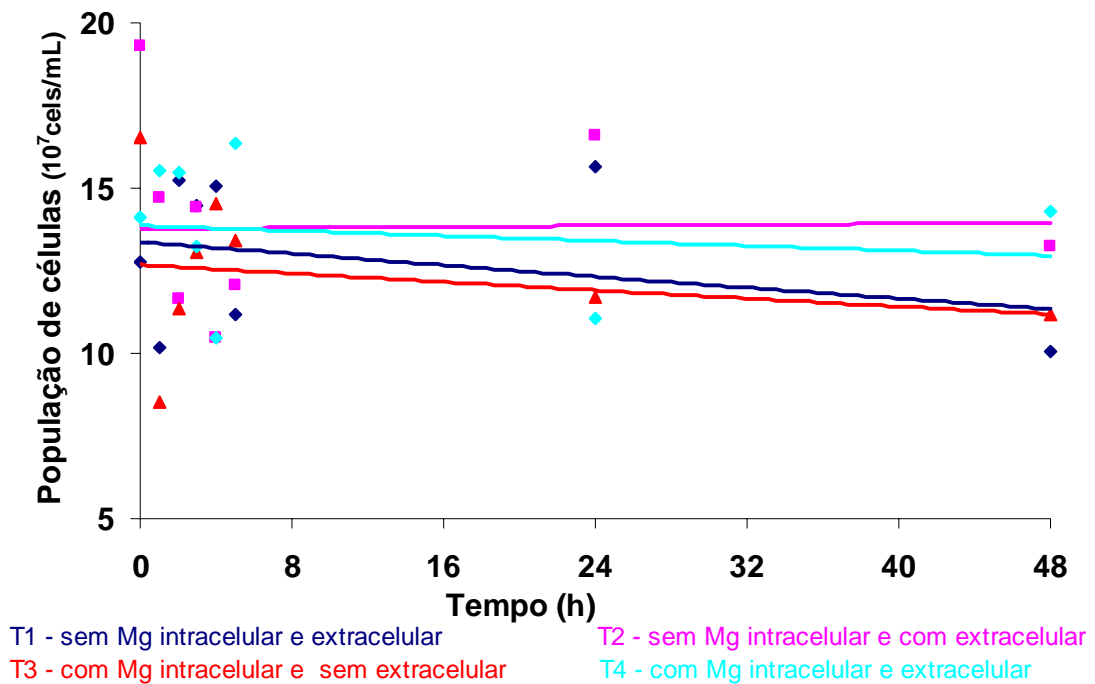


Figura 10 - Variação da população celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse térmico

4.7 Efeito do estresse etanólico sobre leveduras cultivadas em caldo de cana-de-açúcar (meio complexo)

Mesmo considerando que o estresse térmico e etanólico proporcionam danos semelhantes ao metabolismo e estrutura das leveduras (BIRCH; WALKER, 2000), nota-se que no meio complexo o estresse alcoólico proporcionou condições de estresse mais pronunciadas à levedura do que o estresse térmico, fato inverso ao ocorrido no meio sintético (YEPD). O estresse etanólico em meio complexo ocasionou diminuição da viabilidade de 100% para 83% em 48h de cultivo, enquanto que sob estresse térmico, nesse mesmo meio, as células da levedura apresentaram viabilidade de 93% às 48h de cultivo.

Pode-se notar, em geral, uma menor toxidez do etanol às células da levedura nos tratamentos enriquecidos com magnésio, principalmente nas primeiras cinco horas de cultivo. A cultura de levedura do Tratamento 2 foi a que apresentou maior viabilidade celular durante o período de estresse, embora a diferença desse para os demais tratamentos não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 11 e Figura 11).

Tabela 11 - Viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse etanólico

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	99,90	A a	99,30	A a	98,91	A a	99,23	A a
1	97,75	A a	98,57	A a	98,51	A a	97,42	A a
2	92,49	A a	97,90	A a	96,60	A a	98,22	A a
3	95,44	A a	98,30	A a	96,27	A a	96,23	A a
4	91,86	A a	98,06	A a	95,41	A a	95,89	A a
5	90,47	A a	95,10	A a	94,15	A a	94,83	A ab
24	85,89	A a	90,37	A ab	80,25	A b	88,02	A cb
48	79,43	A b	88,21	A b	80,96	A b	83,19	A c

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

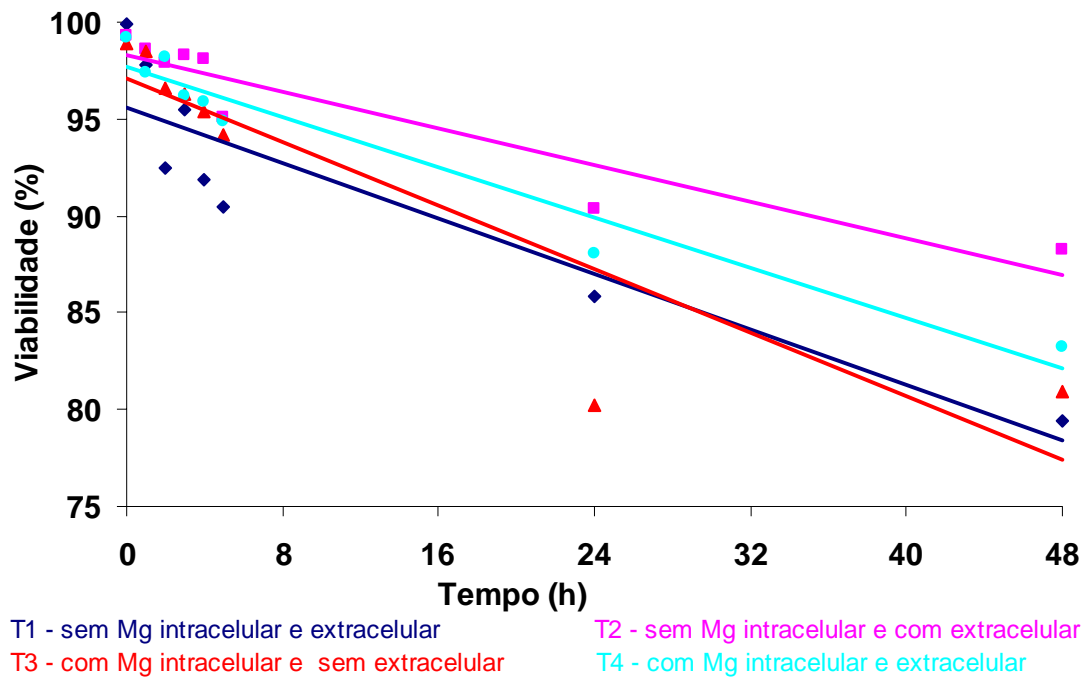


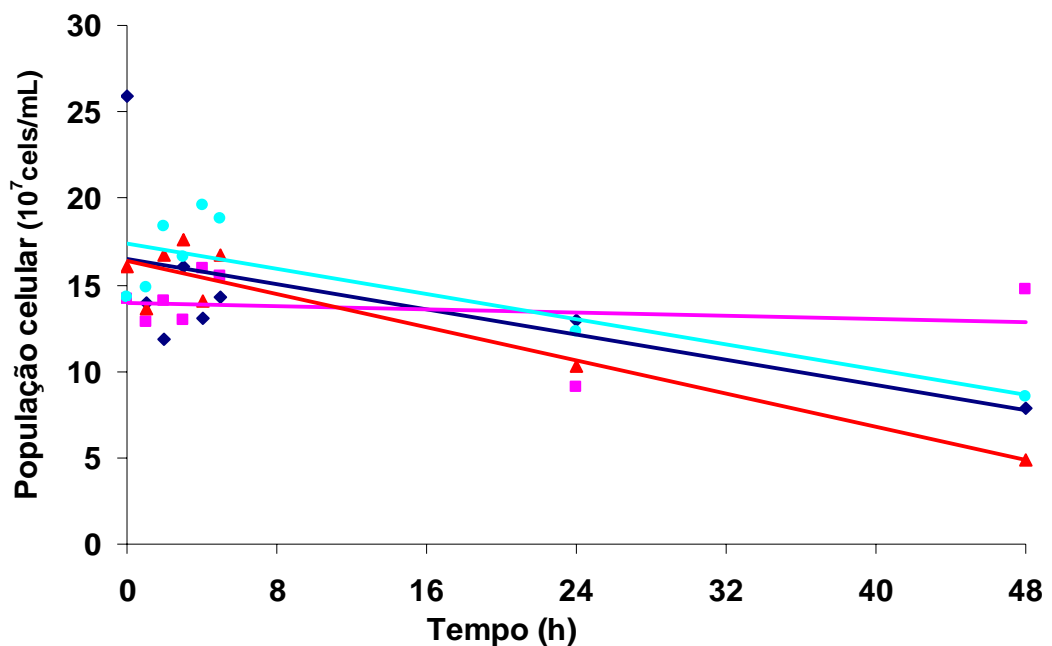
Figura 11 - Variação da viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse etanólico

Os diferentes tratamentos não influenciaram a população celular da levedura submetida ao estresse etanólico no meio complexo. Ao longo do período de incubação houve tendência de diminuição da população celular, com exceção do Tratamento 2, no qual a população de células da cultura de levedura se manteve praticamente constante (Tabela 12 e Figura 12).

Tabela 12 - População celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse etanólico

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	25,95	Aa	14,25	Bab	16,06	Bab	14,30	Ba
1	13,90	Ab	12,86	Ab	13,65	Aab	14,84	Aa
2	11,83	Ab	9,40	Aab	16,73	Aab	18,36	Aa
3	16,08	Ab	12,96	Ab	17,63	Aa	16,60	Aa
4	13,11	Bb	15,98	ABab	14,06	Bab	19,64	Aa
5	14,25	Ab	15,51	Aab	16,73	Aab	18,81	Aa
24	13,00	Ab	9,09	Ab	10,24	Aab	12,31	Aa
48	7,87	Bb	14,72	Aa	4,93	B b	8,53	ABb

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.



T1 - sem Mg intracelular e extracelular

T2 - sem Mg intracelular e com extracelular

T3 - com Mg intracelular e sem extracelular

T4 - com Mg intracelular e extracelular

Figura 12 - Variação da população celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse etanólico

4.8 Efeito da coexistência de estresse térmico e etanólico sobre leveduras cultivadas em caldo de cana-de-açúcar (meio complexo)

A viabilidade celular da levedura cultivada em meio complexo, sob condições de estresses térmico e etanólico conjuntos, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 13 e Figura 13). Em todos os tratamentos houve uma diminuição drástica da viabilidade celular nas duas primeiras horas sob influência dos estresses. Após duas horas de incubação as taxas de viabilidade celular já tinham diminuído dos iniciais 99% para valores próximos de 20%. Às cinco horas do período de estresse a viabilidade atingiu valores abaixo de 10%. Às 24 horas, as culturas de levedura de todos os tratamentos já estavam praticamente inviabilizadas.

Tabela 13 - Viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 48h no meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico e etanólico conjuntos

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	99,47	A a	99,73	A a	98,75	A a	99,08	A a
1	45,59	A b	40,27	A b	43,92	A b	39,63	A b
2	18,75	A c	21,09	A b	21,80	A bc	14,13	A c
3	18,55	A c	15,35	A b	18,68	A bc	12,22	A c
4	4,09	A c	13,94	A b	12,39	A bc	4,24	A c
5	8,01	A c	9,43	A b	8,75	A c	3,35	A c
24	0,14	A c	0,34	A c	0,74	A c	0,94	A c
48	0,00	A c	0,00	A c	0,00	A c	0,00	A c

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.

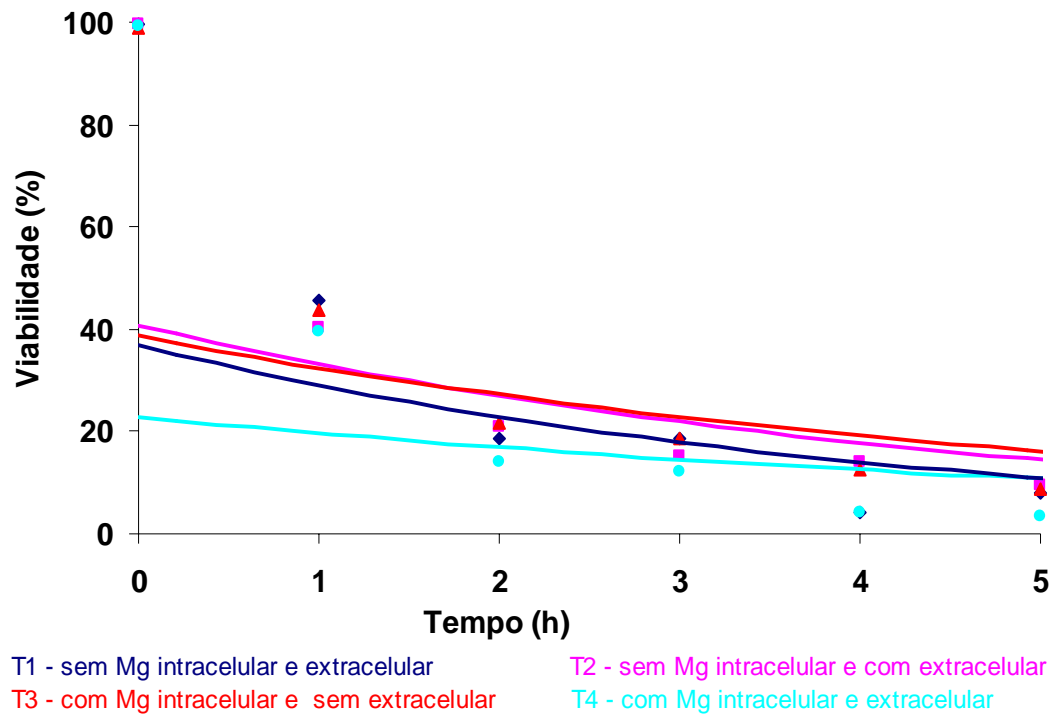


Figura 13 - Variação da viabilidade celular (%) da levedura cultivada por 5h no meio sintético (YEPD), sob condição de estresse térmico e etanólico conjuntos

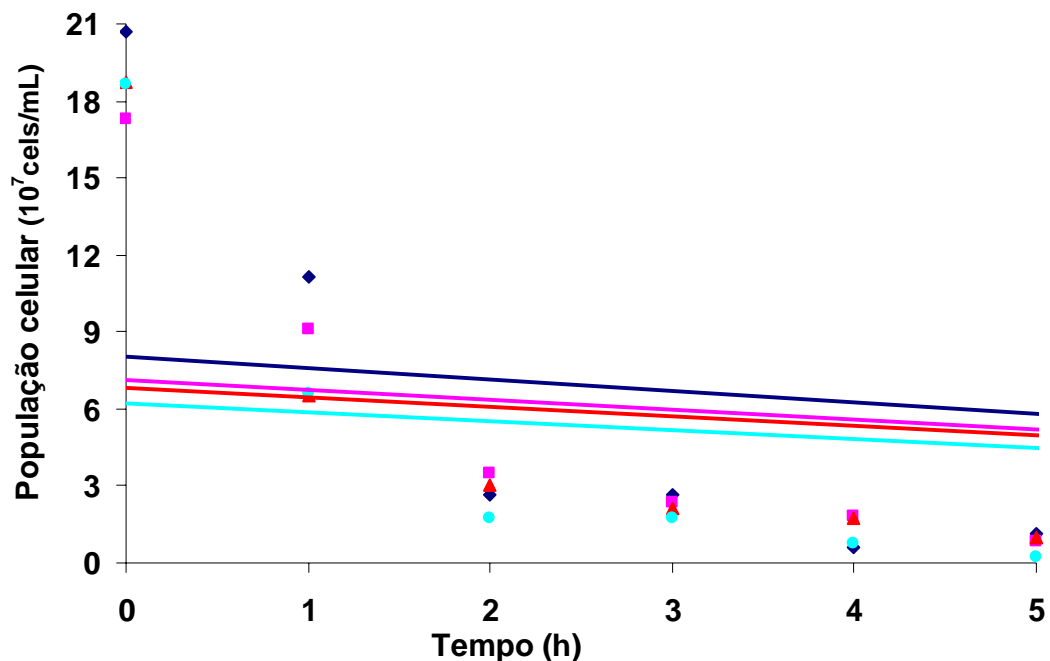
Da mesma forma que para a viabilidade celular, sob condições extremamente adversas de cultivo e sobrevivência, como no caso do estresse térmico concomitante ao etanólico, não se pode notar influência dos tratamentos na população celular da levedura (Tabela 14 e Figura 14).

Em todos os tratamentos as populações de células de leveduras diminuiram rapidamente ao longo do período de estresse, não se detectando contagem celular com 48 horas de incubação.

Tabela 14 - População celular (10^7 cels/mL) da levedura cultivada por 48h em meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse térmico e etanólico conjuntos

Horas	Tratamento 1		Tratamento 2		Tratamento 3		Tratamento 4	
0	20,70	A a	17,29	A a	18,74	A a	18,63	A a
1	11,15	A b	9,08	A ab	6,52	A b	6,60	A b
2	2,63	A c	3,50	A bc	3,00	A bc	1,73	A b
3	2,67	A c	2,32	A bc	2,15	A bc	1,77	A b
4	0,63	A c	1,78	A bc	1,75	A bc	0,77	A b
5	1,13	A c	0,80	A bc	0,98	A bc	0,25	A b
24	0,02	A c	0,03	A c	0,06	A c	0,10	A b
48	0,00	A c	0,00	A c	0,00	A c	0,00	A b

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas linhas, e minúsculas, nas colunas, não apresentaram diferenças estatísticas entre, através da aplicação do teste de Tukey, nível de significância de 5 %.



T1 - sem Mg intracelular e extracelular T2 - sem Mg intracelular e com extracelular
T3 - com Mg intracelular e sem extracelular T4 - com Mg intracelular e extracelular

Figura 14 - Variação da população celular (10^7 cels/ml) da levedura cultivada por 5h em meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), sob condição de estresse térmico e etanólico conjuntos

As leveduras cultivadas em meio complexo (caldo de cana-de-açúcar), enriquecidos ou não com magnésio, desempenharam respostas semelhantes aos estresses térmico e etanólico. Assim, observando os resultados de viabilidade e população da levedura no meio à base de caldo de cana, nota-se, através dos diferentes tratamentos testados, a inexistência de influência do íon magnésio, tanto intracelular como extracelular, na resposta da levedura aos estresses.

Esse comportamento da levedura cultivada em meio complexo, sob influência do íon de magnésio, é diferente do observado na literatura. Birch e Walker (2000) que obtiveram resultados satisfatórios na utilização de magnésio extra e intracelular, em resposta ao estresse, concluindo que ambas as formas são importantes para ação fisiológica das células de leveduras em condições estressantes. Walker et al. (1996) relataram efeito positivo na cinética de fermentação com o pré-condicionamento das células de leveduras com magnésio, destacando elevado nível de Mg^{+2} depositado na membrana celular das leveduras antes da condução da fermentação. Chun-Keng, Feng-Wu e Li-Jia (2003) constataram que o enriquecimento do meio de cultivo com magnésio induziu maior tolerância ao etanol por leveduras *Schizaccharoyces pombe* e *S. cerevisiae*.

Porém, os autores acima citados não trabalharam com meio de caldo de cana-de-açúcar. As diferenças de resultados encontradas no presente trabalho em relação aos resultados da literatura podem estar relacionadas à diferentes composições dos meios de cultivo utilizados. Alguns meios, notadamente aqueles à base de caldo de cana, podem apresentar características quelantes e poder de adsorção acentuados, reduzindo o desempenho funcional dos íons metálicos em atividades celulares (BIRCH; CIANI e WALKER, 2003).

Outro fator que pode ser destacado em relação à composição dos meios é a interação entre os íons metálicos. Como ressaltado anteriormente, o cálcio e o magnésio são íons antagônicos. A relação ótima entre esses dois íons para o desempenho do processo fermentativo varia de um meio para outro. Quando se objetiva a produção de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar, a melhor relação magnésio:cálcio é 0,42:1 (CÉSAR et al., 1990). Contudo, para a produção de vinho a

melhor relação entre magnésio e cálcio no mosto de uva é 10,7 partes de magnésio para 1 parte de cálcio (WALKER; SMITH; HALL, 2003).

O cálcio no caldo de cana-de-açúcar apresenta geralmente concentração variável de 8 a 30 mg. L⁻¹. No entanto, no caldo clarificado essa concentração pode ter um aumento de mais de 200% (DELGADO; CESAR, 1990). Assim, considerando exclusivamente a relação magnésio e cálcio na fisiologia da levedura, e sabendo que a clarificação é um procedimento comumente utilizado na indústria sucroalcooleira, pode-se inferir que o enriquecimento do mosto com magnésio proporcionaria benefícios às células de levedura em caldo de cana-de-açúcar clarificado.

Neste trabalho foi observado que a suplementação do meio complexo (caldo de cana-de-açúcar) com magnésio não proporcionou aumento da população celular da levedura em condições ótimas de cultivo. Já no meio YEPD, a população inicial de leveduras a serem submetidas às condições de estresse foi consideravelmente maior nos meios suplementados com magnésio.

Aumento da população celular de leveduras cultivadas em meio YEPD suplementado com magnésio também foi observado por Dombek e Ingram (1986b), os quais classificaram o magnésio como um elemento limitante para o crescimento de levedura em meio YEPD.

O meio à base de caldo de cana-de-açúcar utilizado no presente experimento apresentava, anteriormente a adição de magnésio, uma concentração de 182 ppm de magnésio, aproximadamente 67 vezes do que a encontrada no meio YEPD (Tabela 2). Apesar dessa concentração, segundo César et al. (1990), não corresponder às necessidades mínimas de magnésio para uma boa fermentação (320 ppm), tal conteúdo de magnésio foi o suficiente para proporcionar crescimento idêntico das células de levedura nos diferentes tratamentos, assim como, enriquecimento suficiente das células com magnésio para proporcionar tolerância aos estresses térmico e etanólico, independentemente da suplementação com 20 mmol de magnésio nesse meio à base de caldo de cana.

5 CONCLUSÕES

O enriquecimento do meio sintético (YEPD) com 20 mmol de magnésio proporciona um aumento significativo da população de células da levedura e promove uma maior manutenção da viabilidade celular, principalmente nas primeiras horas sob o efeito de estresses térmico e etanólico. Nesse meio de cultivo, o magnésio, tanto intracelular quanto extracelular, proporciona benefícios à manutenção da levedura sob as condições de estresse.

O magnésio suplementado no meio à base de caldo de cana-de-açúcar não promove proteção adicional às células de levedura sob as condições de estresse, provavelmente porque a quantidade de magnésio naturalmente disponível no caldo de cana seja suficiente para a proteção das células.

REFERÊNCIAS

BAZUA, C.D.; WILKE, C.R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New York, v. 7, p. 105-118, 1977.

BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, n. 1-2, p. 34–42, Oct. 2001.

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 26, n. 9-10, p. 678-687, June 2000.

_____. The role of magnesium in the yeast stress response. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON YEAST, 9., 1996, Sydney. **Abstracts ...**, Sydney : Abstract Book , 1996. p. 62.

BIRCH, R.M.; CIANI, M.; WALKER, G.M. Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeast. **Journal of Wine Research**, London, v. 14, n. 1, p. 3-15, Apr. 2003.

BLACKWELL, K.J.; TOBIN J.M.; AVERY, S.V. Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 47, n. 2, p. 180-184, Feb. 1997.

BLAZEJAK, S.; DUSZKIEWICZ-REINHARD, W.; GNIEWOSZ, M.; GÓRSKI, K. An attempt to localize magnesium in the cells of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* NO. 102 supplemented with this element. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Cracow, v. 6, n. 2, p.1-10, 2003.

BLAZEJAK, S.; DUSZKIEWICZ-REINHARD, W.; GNIEWOSZ M.; ROSTKOWSA-DEMNER, E.; DOMURAD, E. The study of *Saccharomyces cerevisiae* brewery yeast strain capacity of bonding with magnesium in dynamic conditions. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Cracow, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2002.

BROCK, T.D. Effects of magnesium ion deficiency on *Escherichia coli* and possible relation to the mode of action of Novobicion. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 84, n. 4, p. 679-682, Oct. 1962.

BROWN, S.H.; OLIVER, S.G.; HARRISON, D.E.F.; RIGHELATO, R.C. Ethanol inhibition of yeast growth, and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 11, n. 3, p. 151-155, Sept. 1981.

CALDAS, C. **Manual de análises selecionadas para indústrias sucroalcooleiras**. Maceió: Sindicato da Indústria do Açúcar e do Alcool no Estado de Alagoas, 1998. 423 p.

CAMPBELL, A.K. **Intracellular calcium, its universal role as regulator**. New York: Wiley, 1983. 556 p.

CARRATU, L.; FRANCESHELLI, S.; PARDINI, C.; KOBAYASHI, G.S.; HORVATH, I.; VIGH, L.; MARESCA, B. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 9, p. 3870–3875, Apr. 1996.

CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol tolerance in yeast. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 13, p. 219-80, 1986.

CESAR, M.A.A.; DELGADO, A.A.; SILVA, F.C.; BRESSAN, W. Avaliação da composição de cana-de-açúcar em função de variedades e época do ano. **Usineiro, Sertãozinho**, n. 20, p. 26-32, set. / out. 1990.

CHATTERJEE, M.T.; KHALAWAN, S.A.; CURRAN, B.P.G. Alterations in cellular lipids may be responsible for the transient nature of the yeast heat shock response. **Microbiology**, Reading, v. 143, n. 9, p. 3063–3068, Sept. 1997.

CHUN-KENG, H.; FENG-WU, B.; LI-JIA, A. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 25, n. 14, p. 1191-1194, July 2003.

- CIESAROVÁ, Z.; SMOGROVICOVÁ, D.; DOMÉNY, Z. Enhancement of yeast ethanol tolerance by calcium and magnesium. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 41, n. 6, p. 485-488, 1996.
- CLARO, F.B.; RIJSBRACK, K.; SOARES, E.V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.102, n. 3, p. 693-700, Mar. 2007.
- COWAN, J.A. **The biological chemistry of magnesium**. New York: VCH Publisher, 1995. 254 p.
- CRAIG, E.A. The heat shock response. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v.18, n.3, p. 239-280, 1985.
- CURRAN, B.P.G.; KHALAWAN, S.A. Alcohols lower the threshold temperature for the maximal activation of a heat shock expression vector in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, Reading, v. 140, n. 9, p. 2225-2228, Sept. 1994.
- CURRAN, B.P.G.; KHALAWAN, A.; CHATTERJEE, M.T. Dioctyl phthalate increases the percentage of unsaturated fatty acids with a concomitant decrease in cellular heat shock sensitivity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, Reading, v. 146, n. 10, p. 2679–2684, Oct. 2000.
- CYSEWKI, G.R.; WILKE, C.R. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 19, n. 8, p. 1125-1143, Aug. 1977.
- DELGADO, A.A.; CESAR, M.A.A. **Elemento de tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. Piracicaba: Publique, 1990. 1061 p.
- DOMBEK, K.M.; INGRAM, L.O. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 51, n. 1, p. 197-200, Jan. 1986a.
- _____. Magnesium limitation and its role in the apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 52, n. 5, p. 975-981, Nov. 1986b.

_____. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: Changes in glycolytic enzymes and internal pH. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 53, n. 6, p. 1286-1291, June 1987.

DOW, D.S.; WALTON, K.G.; FLEISCHER, S. Control of mitochondrial swelling by Mg²⁺ - The relation of ion transport to structural changes. **Journal of Bioenergetics**, London, v. 1, n. 3, p. 247-270, Sept. 1970.

ELIN, R.J. Overview of problems in the assessment of magnesium status. In: ALTURA, B.M.; DURLACH, J.; SEELIG, M.S. (Ed). **Magnesium in cellular processes and medicine**. New York: Karger, 1987. p. 67-76.

ELLIOT, B.; FUTCHER, B. Stress resistance of yeast cells is largely independent of cell cycle phase. **Yeast**, Chichester, v. 9, n. 1, p. 33-42, Jan. 1993.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 469-486, 2000.

FERNADES, P. A.; MORADAS-FERREIRA, P.; SOUSA, M. Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. **Yeast**, Chichester, v. 9, n. 8, p. 859-866, Aug. 1993.

FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Yeasts-growth during fermentation. In: FLEET, G.H. (Ed.). **Wine microbiology and biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publisher, 1993. chap. 2, p. 27-54.

FRAUSTO da SILVA, J.J.R.; WILLIAMS, R.J.P. **The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life**. Oxford: Clarendon Press, 1991. 575 p.

GERVAIS, P.; MARTINEZ DE MARANON, I.; EVRAD, C.; FERRET, E.; MOUNDANGA, S. Cell volume changes during rapid temperature shifts. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 269-279, May 2003.

GHOSE, T.K.; TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 21, n. 8, p. 1401-1420, Aug. 1979.

GNIEWOSZ, M.; BLAZEJAK, S.; ROMAN, J.; DUSKIEWICZ-REINHARD, W.A. Study on *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* cell wall capacity for binding magnesium. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 224, n. 1, p. 49-54, Nov. 2006.

GRAY, W.D. Studies on the alcohol tolerance of yeasts. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 42, n. 5, p. 561-574, Nov. 1941.

GRUBBS, R.D.; MAGUIRE, M.E. Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation magnesium. **Magnesium**, New York, v. 6, n. 3, p. 113-127, 1987.

HEIKKILA, J.J. Heat shock gene expression and development. I. An overview of fungal, plant and poikilothermic animal development systems. **Developmental Genetics**, New York, v. 14, n. 1, p. 1-5, 1993.

HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P., WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 169, n. 12, p. 5518-5522, Dec. 1987.

HUGHES, M.N.; POOLE, R.K. **Metals and microorganisms**. New York: Chapman and Hall, 1989. 424 p.

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

INGRAM, L.O.; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganism. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 253-300, 1984.

JONES, R.P.; GADD, G.M. Ionic nutrition of yeast - physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, n. 12, p. 402-418, 1990.

KAIM, W.; SCHEDERSKI, B. Catalysis and regulation of bioenergetic process by the alkaline earth metal ions Mg^{2+} and Ca^{2+} . In: _____. **Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life**. Chichester: Wiley, 1994. p. 286-302.

KARAMUSHKA, V.I.; GADD, G.M. Influence of copper on proton efflux from *Saccharomyces cerevisiae* and the protective effect of calcium and magnesium. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 122, p. 33-38, 1994.

LEE, C.D.; CHAPMAN, D. The effects of temperature on biological membranes and their models. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 41, p. 35–52, 1987.

LINDQUIST, S. The heat shock response. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 55, p. 1151-1191, July 1986.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 631-77, Dec. 1988.

LUONG, J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 27, n. 3, p. 280-285, Mar. 1985.

MAGER, W.H.; DEKRUIJFF, A.J.J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 3, p. 506-531, Sept. 1995.

MARQUES, T.A.; SERRA, G.E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, out. / dez. 2004.

MEERS, J.L.; TEMPEST, D.W. The influence of extracellular products on the behaviour of mixed microbial populations in magnesium-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 52, p. 309-317, 1969.

MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 294-298, Mar. 1989.

NEVES, M.J.; FRANCOIS, J. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 288, n. 3, p. 859-864, Dec.1992.

- OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC/ FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 89 p.
- OMORI, T.; KIYOSHI, O.; UMEMOTO, Y.; YUKI, K.; KAJIHARA, Y.; SHIMODA, M.; WADA, H. Enhancement of glycerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat shock treatment. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 187-190, 1996.
- PARSELL, D.A.; LINDQUIST, S. Heat shock proteins and molecular chaperones. In: MORIMOTO, R.I.; TISSIERES, A.; GEORGOPOULOS, C. (Ed.). **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. p. 457-489.
- PARSELL, D.A.; TAULIEN, J.; LINDQUIST, S.; VIITANEN, P.; JAENICKE, R.; HORWICH, A.; HARTL, F.U.; ELLIS, R.J.; WELCH, W.J. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. **Philosophical transactions: Biological Sciences**, London, v. 339, n. 1289, p. 279-286, Mar.1993.
- PETROV, V.V.; OKOROKOV, L.A. Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. **Yeast**, Chichester, v. 6, n. 4, p. 311-318, July / Aug. 1990.
- PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309 p.
- PIPER, P.W. Molecular events associated with the acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 339-355, Aug. 1993.
- PIPER, P.W.; TALREJA, K.; PANARETOU, B.; MORADAS-FERREIRA, P.; BYRNE, K.; PRAEKELT, U.M.; MEACOCK, P.; RÉCNACQ, M.; BOUCHERIE, H. Induction of major heat shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. **Microbiology**, Reading, v. 140, n.11, p. 3031-3038, Nov. 1994.

PLESSET, J.; PALM, C.; MCLAUGHLIN, C.S. Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 108, n. 3, p. 1340-1345, Oct. 1982.

REES, E.M.R.; STEWART, G.G. The effects of increased magnesium and calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity worts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.103, p. 287-291, 1997.

_____. Effects of magnesium, calcium and wort oxygenation on the fermentative performance of ale and lager strains fermenting normal and gravity worts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 105, n. 4, p. 211-217, 1999.

RUIS, H.; SCHÜLLER, C. Stress signaling in yeast. **BioEssays**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 959-965, Nov. 1995.

SALTUKOGLU, A.; SLAUGHTER, J.C. The effect of magnesium and calcium on yeast growth. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 89, p. 81-83, Mar. / Apr. 1983.

SANCHEZ, Y.; TAULIEN, J.; BORKOVICH, K.A.; LINDQUIST, S. Hsp 104 is required for tolerance to many forms of stress. **European Molecular Biology Organization Journal**, Oxford, v.11, p. 2357-2364, 1992.

SAS INSTITUTE. **The SAS System** (software). Version 8.2. Cary, 1999. 1 CD-ROM.

SMITH, G.D. **Studies into Mg-preconditioning of brewer's yeast**. 2001. 98 p. Tese (PhD) - University of Abertay, Dundee, 2001.

SMITH, G.D.; WALKER, G.M. Fermentation performance of Mg-preconditioned brewing yeast. In: SMART, K.A. **Brewing yeast fermentation performance**. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 92-95.

VAN UDEN, N. Effect of alcohols on the temperature relations of growth and death in yeasts. In: _____. **Alcohol toxicity in yeast and bacteria**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 77-88.

WALKER, G.M. The roles of magnesium in biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 14, n. 4, p. 311-354, 1994.

_____. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. 362 p.

_____. Biotechnological implications of the interactions between magnesium and calcium. **Magnesium Research**, London, v. 12, n. 4, p. 303-309, Dec.1999.

_____. Metals in yeast fermentation processes. In: LASKIN, A.I; BENNETT, J.W.; GADD, G.M. (Ed.) **Advances in Applied Microbiology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. v. 54, p.197-225.

WALKER, G.M.; MAYNARD, A.I. Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 18, n. 1, p. 1-3, Jan. 1997.

WALKER, G.M.; MAYNARD, A.I.; JOHNS, C.G.W. The importance of magnesium ions in yeast biotechnology. In: YU, P.K. (Ed.). **Fermentation technologies: industrial applications**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 233-240.

WALKER, G.M.; SMITH, G.; HALL, N. The importance of metal ions in ethanolic fermentations. In: Bryce, J.; Stewart, G.G. (Ed.). **Proceedings of the 1st Worldwide Conference on Distilled Spirits**. London: Institute of Brewing, 2003. chap. 16, p. 113 - 119.

WALKER, G.M.; BIRCH-ANDERSEN, A.; HAMBURGER, K.; KRAMHOFT, B. Magnesium – induced mitochondrial polymorphism and changes in respiratory metabolism in the fission yeast, *Schizosaccharomyces Pombe*. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v. 47, n. 4, p. 205-214, 1982.

WALKER, G.M.; BIRCH, R.M.; CHANDRASENA, G.; MAYNARD, A.I. Magnesium, calcium, and fermentative metabolism in industrial yeasts. **American Society of Brewing Chemists**, London, v. 54, n.1, p. 13-18, 1996.

WATSON, K. Microbial stress proteins. **Advances in Microbial Physiology**, London, v.31, p. 83-223, 1990.

_____. Temperature relations. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts**. London: Academic press, 1987. chap. 3, p. 14-71.

WATSON, K.; CAVICCHILO, R. Acquisition of ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 5, n. 10, p. 683-688, Oct. 1983.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast. Stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 209-217, Oct. 1990.

YOUATT, J. Calcium and microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 19, p. 83-97, 1993.