

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

Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase

Osmar Parazzi Junior

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

Piracicaba

2006

Osmar Parazzi Junior

Biólogo

Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase

Orientador:

Prof. Dr. **CLAUDIO ROSA GALLO**

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

Piracicaba

2006

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

Parazzi Junior, Osmar

Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividade de invertase / Osmar Parazzi Junior. - - Piracicaba, 2006.
106 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Cana-de-açúcar 2. Enzimas sacarolíticas 3. Fermentação alcoólica 4. Invertase
5. Sacarose I. Título

CDD 663.13

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

A Deus

Agradeço

As minhas irmãs **Lucimara** e **Juciane**,
cunhados **José Carlos** e **André**, em
especial minha namorada **Juliana**, pelo
incentivo

Ofereço

Aos meus pais **Osmar** e **Rosa Ângela**

Dedico

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo pela amizade, oportunidade e pela orientação neste trabalho ;
- Ao prof. Dr. Luiz Carlos Basso pela amizade e, principalmente, por compartilhar todo o seu conhecimento e experiência;
- A Henrique Vianna de Amorim pela confiança e credibilidade;
- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização deste curso;
- À Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ) e FERMENTEC, pela bolsa de estudos;
- Ao professor Boris Stambuk por compartilhar seu conhecimento e ceder as leveduras com transportador de sacarose utilizadas neste trabalho;
- Às minhas companheiras e amigas de Laboratório: Andresa Zago Martins, Juliana, Thaíse e Ariane pela ajuda na condução dos experimentos;
- À Silene C. de Lima Paulilo pela amizade, companheirismo, conselhos na condução de minha vida profissional, e, principalmente, pela ajuda nas análises estatísticas e pelo compartilhamento de seus conhecimentos;
- A Mário Lúcio Lopes pela amizade, confiança, pelas “aulas particulares” de genética e principalmente por compartilhar seu conhecimento;
- A Henrique Berbert de Amorim Neto, pelas valiosas sugestões;

- Ao grande amigo e companheiro de laboratório Luiz Lucatti (Cometa) pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento deste trabalho;
- À minha família, meus pais, irmãs, cunhados, pelos momentos de alegria e diversão, pelo apoio e compreensão;
- À minha namorada Juliana, Gilberto José Colombo (Giba) e Maria Colombo (Mary) pela força e ajuda nos momentos difíceis de minha vida profissional;
- Aos meus pais Osmar e Rosa Ângela, por acreditarem em meu potencial e, principalmente, pelo financiamento dos meus estudos;
- A todos que de alguma forma me ajudaram a realizar mais este sonho.

Muito Obrigado.

“Entendemos que a sorte não é uma divindade, como a maioria das pessoas acredita - pois um deus não faz nada ao acaso – nem algo incerto, o sábio não crê que ela proporcione aos homens nenhum bem ou nenhum mal que sejam fundamentais para uma vida feliz, mas, sim, dela pode surgir o início de grandes bens e de grandes males. A seu ver, é preferível ser desafortunado e sábio, a ser afortunado e tolo; na prática, é melhor que um bom projeto não chegue a bom termo do que chegue a ter êxito um projeto mau.”

(Epicuro)

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	13
1.INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Invertase.....	19
2.2 Fisiologia e atividade de invertase das leveduras	22
2.3 Transportador de sacarose	25
2.4 Glicogênio: formação e função.....	26
2.5 Trealose: formação e função.....	28
2.6 Glicerol: formação e função.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	32
3.2 Manutenção das linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	33
3.3 Multiplicação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> para o ensaio de invertase	33
3.4 Ensaio de invertase.....	34
3.5 Multiplicação das leveduras para o ensaio de metabolização de açúcares em diferentes meio formulados	34
3.6 Ensaio de metabolização de açúcares em diferentes meios formulados	34
3.7 Preparo do mosto de multiplicação de leveduras para o ensaio fermentativo com reciclos de células	35
3.8 Multiplicação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> para o ensaio fermentativo com reciclos de células	36
3.9 Ensaio de fermentação	37
3.10 Ensaio de metabolização de açúcares durante a fermentação	38
3.11 Determinação da atividade de invertase	38

3.12 Determinação da concentração de ART no ensaio de invertase.....	39
3.13 Determinação da concentração de leveduras nos meios de crescimento YEPD, YEPS e YEPDS	39
3.14 Determinação de etanol nos vinhos de levedurados.....	39
3.15 Determinação da concentração de açúcares nos caldos, mostos, vinhos de levedurados e glicerol em vinhos de levedurados.....	40
3.16 Determinação do pH dos vinhos de levedurados	40
3.17 Determinação do teor de leveduras nos vinhos	40
3.18 Determinação de trealose na levedura.....	41
3.19 Determinação de glicogênio na levedura	41
3.20 Determinação da viabilidade celular da levedura	42
3.21 Contagem de bactérias em microscópio óptico.....	42
3.22 Cálculo do rendimento fermentativo.....	42
3.23 Cálculo da eficiência fermentativa	43
3.24 Delineamento estatístico	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Ensaio de invertase	44
4.2 Metabolização de açúcares em diferentes meios de crescimento	47
4.3 Ensaio de fermentação	59
5 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS	
Anexo A: Tabelas	92
Anexo B: Análises estatísticas	99

RESUMO

Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil metabólico da utilização dos açúcares por diferentes leveduras (BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001) em diferentes meios de crescimento e também analisar o comportamento e a atividade de invertase destas leveduras durante um processo fermentativo com reciclos de células, semelhantemente ao processo industrial, levando em consideração os parâmetros: produção de etanol, formação de biomassa, produção de trealose, glicogênio, glicerol, rendimento e eficiência fermentativa. Os experimentos foram divididos em três partes: a 1^a foi a quantificação da atividade de invertase das diferentes leveduras, em mosto de fermentação à base de mel e água (13% ART), a 2^a analisou-se o perfil de metabolização em diferentes meios de crescimento à base de YEP com 2% de açúcares (glicose, sacarose, ou glicose + sacarose), e a 3^a foi a realização de uma fermentação alcoólica com 4 reciclos de células, com mosto de mel (13% ART), sendo os três primeiros utilizados para a avaliação do rendimento fermentativo, bem como seus indicadores (trealose, glicogênio, viabilidade, entre outros) e o último, destinado ao perfil de metabolização de açúcares em condições de fermentação. Os resultados mostram que as leveduras possuem diferentes atividades de invertase (BG-1 = 7,34; FLEISCHMANN = 5,75; CAT-1 = 3,76; PE-2 = 2,39 gART.h⁻¹.g_{biomassa}; 1403-7A e LCM001, não possuem atividade), apresentam diferentes velocidades de hidrólise da sacarose, tanto em meios de crescimento como mostos (BG-1 e FLEISCHMANN = 2 h; CAT-1 = 3h; PE-2 = 4h; 1403-7A = 24 h e LCM001 = >24 h), assim como a velocidade de metabolização dos açúcares presentes nestes. Conclui-se que a atividade de invertase é dependente da linhagem de levedura, assim como a velocidade de metabolização dos açúcares em meios de crescimento e mosto. A análise do perfil de metabolização de açúcares não permite identificar a presença de transportador de sacarose. No geral, as leveduras selecionadas apresentam melhor desempenho fermentativo. Por outro lado, verificou-se que as linhagens com transportador de sacarose apesar da menor produção de álcool, apresentaram uma boa eficiência fermentativa. O maior problema por parte destas últimas, é o alto tempo de fermentação e a baixa taxa de multiplicação, com conseqüente queda na viabilidade celular.

Palavras chave: Fermentação alcoólica; Atividade de invertase; Transportador de sacarose; Permease AGT1.

SUMMARY

Sugar metabolization of *Saccharomyces cerevisiae* with transporter of sucrose and different invertase activity

The aim of this work was to evaluate the metabolic profile in the utilization of sugars, using different yeast strains (BG-1, CAT-1, FLEISHMANN, PE-2, 1403-7A and LCM001) with different growth medium and also to analyze behavior and the invertase activities of these yeast strains during fermentative process with recycling, similar to the industrial process. The following parameters were used: ethanol production, biomass formation, trealose production, glycogen, glycerol, ethanol yield and fermentation efficiency. The trials were divided into three parts: First was activity quantification of invertase using different yeast strains, with a mix of molasses and water (13% ART), the second was analyzed the metabolization profile with different growth medium using YEP added 2% of sugars (glucose, sucrose, or glucose + sucrose), and the third it was the alcoholic fermentation with 4 yeast cell recycles, using wort of molasses and juice (13 % ART), The first three were utilized to evaluate the fermentation yield and also their indicatives (trealose, glycogen, viability within others) and, the last one was performed to study the profile of sugars metabolization in fermentation conditions. The results showed that those yeasts produced different invertase activities (BG-1 = 7,34; FLEISCHMANN = 5,75; CAT-1 = 3,76; PE-2 = 2,39 $\text{gART}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{biomass}}$; 1403-7A and LCM001 did not have invertase activity), different velocity of sucrose hydrolysis, as much as medium growth as worts (BG-1 and FLEISCHANN = 2 h; CAT-1 = 3h; PE-2 = 4h; 1403-7A = 24 h and LCM001 = >24 h), also as the velocity of sugars metabolization present on this medium. It can be concluded that the invertase activity is dependent of yeast strain, as the velocity of sugars metabolization in growth medium and wort. The profile analysis of metabolization of sugars did not allow to identify the presence of sucrose transporter. In general, the selected yeasts present the best fermentation performance. On the other hand, it was observed the strains with sucrose transportation did not show stress. The major problem of these yeasts were the high fermentation time and low propagation rate, and a decrease of the viability.

Keywords: Alcoholic fermentation; Invertase activity; Sucrose transporter; AGT1 Permease.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Algumas propriedades da invertase interna e externa de <i>S. cerevisiae</i>	21
Tabela 2 - Composição do mosto de multiplicação, utilizado na Propagação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , para a obtenção de biomassa suficiente para o uso nos experimentos de ciclos fermentativos.....	36
Tabela 3 - Valores médios da atividade de invertase na parede celular, no vinho e na água de lavagem do fermento, expressos em $g\ ART.h^{-1}.g_{biomassa}$, durante um ciclo fermentativo com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001	46
Tabela 4 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem BG-1	93
Tabela 5 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem CAT-1	93
Tabela 6 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem FLEISCHMANN.....	94
Tabela 7 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem PE-2	94
Tabela 8 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento	

anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem 1403-7A.....	95
Tabela 9 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem LCM001.....	95
Tabela 10 - Valores médios de glicerol, rendimento, viabilidade, biomassa e etanol expressos em porcentagem (%) durante três ciclos fermentativos com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.....	96
Tabela 11 - Valores médios da quantidade de CO ₂ expressos em gramas, liberados durante os três ciclos fermentativos com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.....	97
Tabela 12 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante o quarto ciclo fermentativo com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.....	97
Tabela 13 - Valores médios de glicogênio e trealose ao final do quarto ciclo fermentativo com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.....	98
Tabela 14 - Resultado da análise estatística da viabilidade de diferentes leveduras em 4 ciclos fermentativos.....	100
Tabela 15 - Resultado da análise estatística do rendimento de diferentes leveduras em 3 ciclos fermentativos.....	101
Tabela 16 - Resultado da análise estatística da eficiência de diferentes leveduras em 3 ciclos fermentativos.....	102
Tabela 17 - Resultado da análise estatística da biomassa de diferentes leveduras em 3 ciclos fermentativos.....	103
Tabela 18 - Resultado da análise estatística do glicerol presente no vinho delevedurado de diferentes leveduras em 3 ciclos fermentativos	104

Tabela 19 - Resultados obtidos no teste Tukey para a variável trealose ao término da fermentação.....	104
Tabela 20 - Resultados obtidos no teste Tukey para a variável glicogênio ao término da fermentação.....	105
Tabela 21 - Resultados obtidos no teste Tukey para as variáveis de atividade de invertase na célula, no vinho e na água de lavagem.....	105
Tabela 22 - Resultados do desvio padrão em relação a média (SEM) obtido no teste Tukey para a variável eliminação de CO ₂ durante a fermentação.....	105
Tabela 23 - Resultados do desvio padrão em relação a média (SEM) obtido no teste Tukey para as variáveis glicerol, glicose, frutose e sacarose no 4° Ciclo fermentativo, no qual estudou-se o perfil de metabolização de açúcares ao longo do tempo	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo atual do metabolismo da sacarose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A sacarose pode sofrer hidrólise pela invertase periplasmática ou ser transportada ativamente pela permease AGT1 e então, ser clivada pela maltase ou invertase intracelular.....	23
Figura 2 - Esquema da biossíntese de glicogênio.....	27
Figura 3 - Esquema da biossíntese de trealose	29
Figura 4 - Esquema da biossíntese de glicerol.....	31
Figura 5 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura BG-1, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.....	48
Figura 6 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura CAT-1, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.....	50
Figura 7 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura FLEISCHMANN, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.....	51
Figura 8 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura PE-2, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.....	53
Figura 9 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura 1403-7A, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.....	57

Figura 10 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura LCM001, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.....	58
Figura 11 - Média dos três ciclos fermentativos da taxa de eliminação de CO ₂ pelas diferentes linhagens de leveduras em função do tempo de fermentação.....	59
Figura 12 - Rendimento, expresso em porcentagem (v/v), das diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> ao longo de três ciclos fermentativos.....	61
Figura 13 - Eficiência, expresso em porcentagem(v/v), das diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> ao longo de três ciclos fermentativos.....	61
Figura 14 - Biomassa, expressa em gramas (massa úmida), das diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> ao longo de três ciclos fermentativos.....	63
Figura 15 - Quantidade de Glicerol, expresso em porcentagem (p/v), das diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> ao longo de três ciclos fermentativos	64
Figura 16 - Viabilidade celular, expressa em porcentagem (gramas de biomassa úmida/100mL), das diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> ao longo de quatro ciclos fermentativos	64
Figura 17 - Teor de trealose, expresso em gramas/100gramas de biomassa seca presente nas seis linhagens de levedura ao final do processo fermentativo	66
Figura 18 - Teor de glicogênio expresso em gramas/100gramas de biomassa seca presente nas seis linhagens de levedura ao final do processo fermentativo	66
Figura 19 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura BG-1 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação as médias obtidas pelo teste de Tukey.....	71

- Figura 20 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura FLEISCHMANN durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação as médias obtidas pelo teste de Tukey 71
- Figura 21 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura CAT-1 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação as médias obtidas pelo teste de Tukey 73
- Figura 22 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura PE-2 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação as médias obtidas pelo teste de Tukey 73
- Figura 23 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura 1403-7A durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação as médias obtidas pelo teste de Tukey 77
- Figura 24 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura LCM001 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação as médias obtidas pelo teste de Tukey 77

1 INTRODUÇÃO

Na safra de 2004/2005, o Brasil produziu 14,8 bilhões de litros de álcool contra 13,3 bilhões dos Estados Unidos (CHAIRMAN, 2005), mostrando uma diferença, em produtividade de etanol, muito pequena entre os dois países. Até esta data, o Brasil foi, hegemonicamente, o maior produtor de etanol mundial. A partir de 1999 tornou-se também o maior exportador desse produto, o qual tem a cana-de-açúcar como principal fonte de matéria-prima (BERG, 2004).

Atualmente, na safra 2005/2006, de acordo com o trabalho Produção...(2006), o Brasil produziu 15,88 bilhões de litros de álcool e segundo Ahlfeld e Berg (2006) os Estados Unidos, atualmente, possuem uma capacidade para a produção de 16,2 bilhões de litros de álcool, tendo em construção 31 novas plantas e nove em expansão, ampliando assim a capacidade em mais 5,6 bilhões de litros/ano. Estes dados, quando comparados com a produção de 2004/2005, mostram, provavelmente, uma produção na safra 2005/2006 equivalente entre os dois países, tendendo para uma maior produção etanólica dos Estados Unidos em relação ao Brasil, na safra 2006/2007. Esta situação só poderá ser revertida se houver mais pesquisas, incentivos e, principalmente, investimento para o crescimento do setor sucro-alcooleiro, o qual tem grande participação no PIB e gera mais de 1 milhão de empregos diretos e 2,6 milhões indiretos (VIEIRA, 2006). A importância do etanol, na matriz energética do país, será crescente, impulsionada pelo fato de representar uma forma renovável e menos poluente do que o petróleo. O Brasil vem, desde o advento do Proálcool, desenvolvendo tecnologias nos diversos segmentos da indústria sucro-alcooleira, com ganhos expressivos em rendimento e eficiência, principalmente com o investimento e parcerias de empresas privadas com a universidade (AMORIM, 2006).

No Brasil, a sacarose é a maior e mais importante fonte de carbono utilizada por *Saccharomyces cerevisiae* durante a produção de fermento para panificação, etanol carburante e bebidas destiladas. Embora a seleção de leveduras pelo homem, ao longo da história, tenha favorecido linhagens ou genótipos com características desejáveis, melhorias ainda são necessárias para aumentar a produtividade e diminuir os custos nas aplicações industriais das leveduras.

A fermentação da sacarose requer a hidrólise extracelular mediada pela invertase periplasmática (β -D-fructosidase, EC 3.2.1.26), tendo como produtos glicose e frutose. Posteriormente, estes monossacarídeos são transportados para dentro da célula e metabolizados. Atualmente, muitos trabalhos têm estudado linhagens de leveduras com diferentes atividades de invertase (CARVALHO, 2001; PATARO et al., 2002; TAKESHIGE; OUCHI, 1995a; TAKESHIGE; OUCHI, 1995b), pois a velocidade de hidrólise de sacarose, por exemplo, podem tornar o meio mais estressante, uma vez que hexoses, em concentrações elevadas no meio fermentativo, aumentam a pressão osmótica do meio, resultando em estresse osmótico com conseqüente incremento na produção de glicerol (BASSO; AMORIM, 1998a), resultando em menor produção de álcool (TAKESHIGE; OUCHI, 1995b). Stambuk e de Araújo (2001), Stambuk et al. (2000; 1999) e Badotti et al. (2004) demonstraram a capacidade de leveduras em transportar a sacarose diretamente para o citoplasma celular sem que ocorra a hidrólise prévia externa desta fonte de carbono.

Durante as últimas décadas, várias leveduras têm sido isoladas do processo fermentativo industrial, como as linhagens PE-2, VR-1, BG-1 e SA-1, as quais foram avaliadas quanto as suas habilidades fermentativas, ou seja, tolerância as condições estressantes, como teor alcoólico, contaminação, pH, tratamento ácido, entre outros. Estas leveduras devem suportar tais condições, manter sua viabilidade celular durante os ciclos fermentativos e ainda apresentar alto rendimento fermentativo, não flocular, não espumar, não produzir muito glicerol e manter concentrações ideais de glicogênio e trealose, os quais exercem efeito protetor aos estresses sofridos pela levedura e ajudam na manutenção da viabilidade celular (BASSO et al., 1994; BASSO et al., 1995).

As leveduras isoladas dos processos fermentativos devem ser avaliadas em relação a alguns parâmetros tais como: viabilidade, produção de ácidos orgânicos, trealose, glicogênio, glicerol, rendimento e atividade de invertase, pois leveduras com diferentes atividades de invertase, hidrolisam a sacarose com maior ou menor velocidade, fazendo com que o meio possua diferentes propriedades osmóticas, assim, quanto mais monossacarídeos liberados no meio fermentativo, maior o estresse osmótico. Neste contexto, se faz necessário a avaliação de diferentes linhagens de

leveduras, com e sem transportador de sacarose e com diferentes atividades de invertase, com o objetivo de otimizar o processo fermentativo industrial.

No presente Projeto, buscou-se avaliar o perfil metabólico da utilização dos açúcares por diferentes leveduras com atividade de invertase (BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2) e sem atividade de invertase (1403-7A e LCM001) em diferentes meios de crescimento e também analisar o comportamento e a atividade de invertase destas leveduras durante um processo fermentativo com reciclos de células, semelhantemente ao processo industrial, levando em consideração os parâmetros: produção de etanol e glicerol, formação de biomassa, acúmulo de trealose e glicogênio, rendimento e eficiência fermentativa.

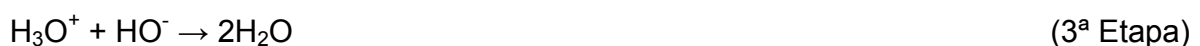
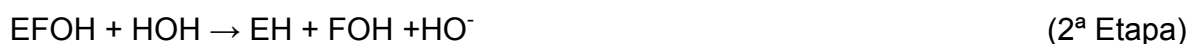
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Invertase

A invertase (β -fructofuranosídeo-frutohidrolase, EC.3.2.1.26) é uma enzima que hidrolisa a sacarose, originando uma mistura, em quantidades iguais, de glicose e frutose. A mistura de monossacarídeos recebe o nome de açúcar invertido, por apresentar a propriedade de desviar o plano de luz polarizada no sentido anti-horário (levógiro), em contraposição à solução aquosa de sacarose de partida para a ação da invertase, que desvia a luz plano polarizada no sentido horário (dextrógiro).

Na história da enzimologia, a invertase pode ser considerada a primeira das enzimas carboidrases a ser estudada. Sua atividade foi detectada, pela primeira vez, em 1828, quando se observou que a levedura de panificação fermentava a sacarose em meio aquoso, sendo claramente confirmada, em 1833, pela constatação de que a levedura hidrolisava a sacarose em condições não fermentativas. Finalmente, em 1860, a enzima foi separada do extrato aquoso de levedura, por precipitação com etanol (BARROS, 1990).

A invertase é uma enzima que hidrolisa a ligação osídica (tipo $\alpha\beta$) de carboidratos possuidores de um radical β -fructofuranosil não substituído, sendo a sacarose seu substrato preferencial. Segundo Andersen (1967) apud Said e Pietro (2004), o mecanismo da reação pode ser representado da seguinte maneira:



Onde EH, G-O-FOH, EFOH, G-OH, HOH e FOH representam, respectivamente, invertase, sacarose, complexo intermediário invertase-frutose, glicose, água e frutose.

A reação catalisada por esta enzima, normalmente efetuada em pH entre 4,6 e 5,0 e a temperatura entre 35 e 50 °C, segue o modelo preconizado por Michaelis-Menten, até uma concentração de substrato da ordem de 120 g/L. Acima desta concentração, a solução de sacarose tem sua viscosidade aumentada com a correspondente redução da atividade de água no meio reacional, ocorrendo, em conseqüência, o desvio do modelo cinético referido (ALMEIDA CUNHA; VITOLO, 1984).

Existem duas formas da enzima, a invertase externa localizada na parede celular e associada à manana, sendo esta conseqüência da expressão de um RNAs com um transcrito maior, o qual é reprimido em altas concentrações de sacarose ou pelos seus produtos de hidrólise, e a invertase interna localizada no citoplasma e não associada à manana, conseqüência da expressão de um RNAs com um transcrito menor, sendo expressa constitutivamente (CARLSON; BOTSTEIN, 1982): ambas derivadas de um ou mais genes SUC (SUC1 a SUC5 e SUC7) (NAUMOV et al., 1996), diferenciado apenas em uma seqüência de aminoácidos responsável pela glicosilação da invertase externa. A expressão do gene que regula a produção de invertase, presente em culturas de *Chenopodium rubrum* e tomates, por exemplo, além de ser regulada por açúcares, é regulada por fitormônios como citoquinina e etileno, enquanto, nos fungos, pode ser regulada pela concentração de açúcares ou estresse ambiental (ROITSCH, 2000). A eficiente expressão de invertase requer baixos níveis de glicose e frutose no meio (DYNESEN et al., 1998; HERWING et al., 2001; OZCAN et al., 1997). Embora seja esperado que uma alta atividade de invertase garanta a eficiente fermentação da sacarose, Echegaray et al. (2000), demonstraram em ensaio fermentativo tipo “batelada-alimentada” com 17, 22 ou 27% de ART uma correlação inversa entre os níveis dessa enzima e a performance fermentativa das células. Myers et al. (1997) E Oda e Ouchi (1990) encontrou a mesma relação descrita anteriormente, porém em condições de fermentação atípicas (massas doces) com 30% de sacarose, utilizando leveduras de panificação. Takeshige e Ouchi (1995b) mostraram, com adição de invertase comercial, que existe uma atividade de invertase mínima para que ocorra a eficiente fermentação de meios a base de melaço com 30% de sacarose, caso contrário, pode haver um aumento da pressão osmótica do meio e, conseqüente queda

na produção de etanol. A tabela 1 apresenta algumas propriedades diferenciais entre as duas formas de invertase.

As moléculas, destinadas a se fixarem na parede celular, possuem uma seqüência de aminoácidos que as direcionam para o retículo endoplasmático, onde se dá a glicosilação (inserção de dez unidades de manana por unidade de enzima) (PERLMAN; HALVORSON, 1981; VITOLLO, 1989). Após ser glicosilada, a invertase externa vai para o complexo de Golgi, sendo armazenada em vesículas secretoras e, finalmente, é descarregada no espaço periplasmático, durante a gemulação (forma de reprodução assexuada da levedura) (PERLMAN; HALVORSON, 1981). A glicosilação das moléculas de invertase externa, a qual não é essencial para a atividade invertásica, confere proteção contra a ação hidrolítica das proteases naturais do microrganismo (REDDY et al., 1988), e segundo Alvarado et al., (1990) favorece a agregação das moléculas de invertase (um dímero natural) em estruturas supramoleculares como: tetrâmeros, hexâmeros e octâmeros, sendo que estes últimos apresentam maior eficiência na conversão da sacarose em glicose e frutose (ARRUDA ; VITOLLO, 1999) e possibilita a inclusão e fixação da molécula na parede celular (BROWN, 1979, apud SAID ; PIETRO, 2004). Um aspecto fundamental a ser considerado é o fato da invertase interna não estar sujeita à repressão catabólica por hexoses, ocorrendo o contrário com a invertase externa (REDDY et al., 1990).

Tabela 1 - Algumas propriedades da invertase interna e externa de *S. cerevisiae*.

PROPRIEDADES	EXTERNA	INTERNA
Massa Molar (kDa)	270	135
Conteúdo de manana(%)	50	3
Conteúdo de glicosamina (%)	3	0
Atividade específica (U/mg proteína)	2.700	2.900
K_M (mM)	26	25

Fonte: Adaptado de Vitolo. In: Said & Pietro. 2004, cap. 12, p.212. Enzimas como agentes biotecnológicos.

A invertase extracitoplasmática tem massa molar igual a 270000 ± 11000 Daltons, constante de sedimentação 10,4S e cerca de trinta cadeias do polissacarídeo manana ligadas à proteína, através de ligações glicosamil-asparagina, e pode ser inibida por substâncias inorgânicas como íons mercúrio e zinco, substâncias orgânicas (anilina, o-toluidina, uréia, ácido aminobenzóico e ácido iodoacético) (VITOLLO, 1979), ácido tânico e hidróxido de alumínio (GIANFREDA RAO ; VIOLANTE, 1993) e ainda por compostos sintéticos como Thio-fructofuranosídeo (KISO ET al., 2003).

A determinação da atividade da invertase, tanto por métodos físicos quanto químicos, baseia-se, exclusivamente, na medida da quantidade dos produtos formados (glicose e frutose). Dentre os métodos físicos, o de mais amplo uso é a polarimetria, a qual mede o desvio da luz plano polarizada à medida que a sacarose é hidrolizada (RIBEIRO, 2002). Dentre os químicos, tem-se o método enzimático (emprega a glicose oxidase e peroxidase como enzimas auxiliares, em presença de um corante como o pirogalol ou o-dianisidina) para a medida de glicose formada e os que utilizam reagentes (Fehling, DNS, Somogy) que medem quantidade formada de açúcares redutores totais (glicose e frutose) (SILVA, 2000).

2.2 Fisiologia e atividade de invertase das leveduras

A sacarose, dissacarídeo não-redutor, é formada por D-glicose e D-frutose unidas através de seus carbonos anoméricos, mediante ligação glicosídica, podendo ser hidrolisada, extracelularmente, pela invertase (β -D-fructosidase) externa ou ser transportada diretamente para o citoplasma e, posteriormente, hidrolisada pela invertase intracelular (Figura1). O transporte de açúcar em *Saccharomyces cerevisiae*, através do plasmalema, pode ser por transporte ativo ou difusão facilitada (ROMANO, 1986). O peso molecular e a atividade específica da enzima interna são semelhantes ao da enzima externa, mas a composição de aminoácidos é diferente (GASCÓN et al., 1968; NEUMANN; LAMPEN, 1967).

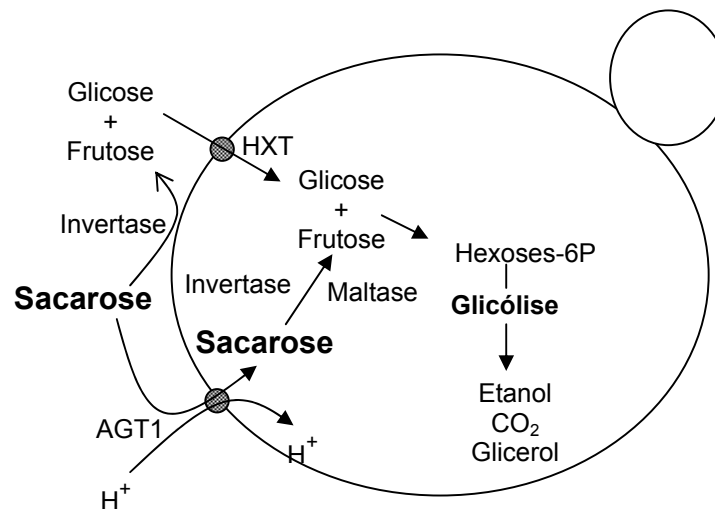


Figura1 - Modelo atual do metabolismo da sacarose por *Saccharomyces cerevisiae*. A sacarose pode sofrer hidrólise pela invertase periplasmática ou ser transportada ativamente pela permease AGT1 e então, ser clivada pela maltase ou invertase intracelular.

A atividade invertásica de células de leveduras intactas é oscilante. Vitolo et al. (1985; 1987) estudaram a atividade de invertase de células de *S. cerevisiae*, em melão de cana, em testes em cultura contínua constante e não-constante e concluíram que, durante o cultivo contínuo de leveduras, a parede celular e o espaço periplasmático são submetidos a mudanças morfológicas contínuas, as quais afetam a interação entre a invertase e moléculas de sacarose, conduzindo à oscilação da atividade invertásica.

A atividade de invertase das células, assim como a ótima temperatura para crescimento e a velocidade de formação do etanol são dependentes da composição do meio e da linhagem de levedura utilizada (LALUCE et al., 1991). Vitolo e Yassuda (1991) apud Said; Pietro (2004), estudando o efeito da concentração de sacarose na atividade invertásica de células intactas de *S. cerevisiae*, verificaram que esta atividade, para ambas as formas (solúvel e ligada à parede celular) variou ao redor de 10%, para concentrações de sacarose entre 80 e 200 g/L, já que a atividade de transferase aumentou consideravelmente com o aumento da concentração de sacarose.

Vitolo et al. (1991) apud Said ; Pietro (2004), a partir da determinação da atividade de invertase de células de leveduras, colhidas de fermentação alcoólica de melão, em batelada, assumiram que a atividade de invertase, presente nessas células de leveduras residuais ainda eram significantes, mesmo sendo o processo fermentativo originalmente designado apenas para a produção de etanol e que, portanto, a extração de invertase ou outras enzimas, como produtos secundários, pode ser uma atividade lucrativa para destilarias, já que as enzimas são atualmente caracterizadas como produtos de alto valor agregado.

Bokassa et al. (1993), estudando uma linhagem de *S. cerevisiae* (01K32) com grande potencial para a síntese de invertase, observaram que um meio de melão com 3% de ART é um substrato ideal para uma rápida produção dessa enzima. Takeshige e Ouchi (1995b) estudaram os efeitos da invertase de levedura na produção de etanol, em meio de melão. Seus estudos mostraram que, em condições atípicas para o processo de fermentação alcoólica, ou seja, melão com 30% de sacarose, pode exercer atividade inibitória, seja por excesso de sais, falta de nutrientes ou osmolaridade, sendo este último causado, possivelmente, pela concentração de glicose e frutose no meio fermentativo. O estudo envolvendo adição de invertase comercial no melão comprova que nesta situação deve haver um equilíbrio entre concentração de invertase e monossacarídeos formados, caso contrário, há aumento na pressão osmótica do meio e, conseqüentemente, um menor rendimento em etanol.

Park e Sato (1982) conduziram estudos comparativos de fermentação de melões de cana em etanol por *S. cerevisiae* na presença e ausência de invertase fúngica. Quando melões de cana foram fermentados pela levedura a 30 °C e pH 5.0, a presença da enzima não causou nenhum efeito na produção de etanol. A um pH 3.5, a produção de etanol foi aumentada pela adição de invertase. A 40 °C, a adição de invertase aumentou a produção de etanol em 5,5% a pH 5.0, e em 20,9% a pH 3.5. Basso e Amorim (1998a) estudaram o comportamento de diferentes linhagens de leveduras (PE-2, VR-1, BG-1, SA-1 e CR-1) quanto ao desempenho fermentativo e a hidrólise da sacarose em mosto com 17,8% de ART concluindo que todas as leveduras apresentaram um excelente desempenho fermentativo, porém as linhagens BG-1, CR-1 e SA-1 hidrolisaram a sacarose em 2 horas, enquanto a PE-2 e VR-1 em 6 horas.

Assim, as linhagens com maior velocidade de hidrólise da sacarose apresentaram uma maior produção de glicerol devido ao maior estresse osmótico do meio fermentativo.

2.3 Transportador de Sacarose

Algumas linhagens de *S. cerevisiae* têm apresentado transporte de sacarose direto para dentro da célula (MWESIGYE; BARFORD, 1994; MWESIGYE; BARFORD, 1996; ORLOWSKI; BARFORD, 1991; SANTOS et al., 1982), outras têm apresentado sacarose fermentada em seus protoplastos, mesmo não sendo detectado atividade de invertase (FRISS; OTTOLENGHI, 1959), enquanto Avigad (1960) apud Mwesigye e Barford (1994) demonstrou que uma levedura haplóide mutante, desprovida da habilidade de hidrolisar ou fermentar sacarose, acumulou intracelularmente dissacarídeo marcado com ^{14}C . Outros estudos têm proposto um mecanismo de cotransporte sacarose- H^+ para a absorção direta de sacarose até o citoplasma celular (SANTOS et al., 1982) (figura1).

Leveduras desprovidas dos principais transportadores de hexose (hxt1-hxt7 e gal2), são incapazes de crescer ou fermentar glicose e frutose, porém, Batista et al. (2004), demonstraram que uma destas linhagens fermenta a sacarose devido à absorção direta deste açúcar para dentro da célula, fato este atribuído ao transportador de sacarose. Estas linhagens não necessitam hidrolisar a sacarose para metabolizá-la, ou seja, o fazem em seu citoplasma e, posteriormente, os carboidratos resultantes (glicose e frutose) são utilizados, predominantemente, pela via glicolítica. Diversos trabalhos têm demonstrado que as velocidades de fermentação e o crescimento de leveduras em sacarose só se encaixam num modelo composto pela contribuição tanto da captação direta da sacarose como pela captação dos seus produtos de hidrólise para o interior da célula (BARFORD et al., 1992; MWESIGYE; BARFORD, 1996; ORLOWSKI; BARFORD, 1991). A análise da captação direta de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae* revelou a presença de um cotransporte sacarose- H^+ (MWESIGYE; BARFORD, 1994; MWESIGYE; BARFORD, 1996; SANTOS et al., 1982) que, de acordo com Stambuk e colaboradores (1999), é mediado pela permease AGT1.

Essa permease é um cotransportador geral de α -glicosídeos- H^+ capaz de transportar trealose (STAMBUK et al., 1996) e sacarose com alta afinidade, enquanto maltose, maltotriose e α -metil-glicosídeo são captados com baixa afinidade (STAMBUK et al., 2000; STAMBUK ; DE ARAÚJO, 2001). O transporte ativo de sacarose justificaria a existência da invertase intracelular constitutiva, embora a sacarose possa também ser hidrolisada por outras glicosidases intracelulares, como α -glicosidases (maltase), que tem a mesma afinidade e atividade com a sacarose e maltose (KAHN et al., 1973; TABATA et al., 1984 apud BADOTTI, 2005).

2.4 Glicogênio: formação e função

O glicogênio é um polissacarídeo constituído por unidades de glicose, em ligações α -1,4 e com pontos de ramificação no C6, ligação α -1,6.

A biossíntese do glicogênio ocorre em todos os tecidos dos animais e é mais ativa no fígado e músculos. As leveduras também são capazes de armazenar reservas na forma de glicogênio. Semelhantemente a casos de outros biopolímeros de alta massa molecular, a síntese do glicogênio envolve as fases de iniciação, alongação e ramificação. Na biossíntese do glicogênio tem-se a participação de algumas enzimas fundamentais (figura2).

Alguns autores (NORTHCOTE; HORNE, (1952); KREGER, 1954, apud TREVELYAN; HARRINSON, 1956b), têm atribuído ao glicogênio juntamente com a trealose, função de carboidratos de reservas. Atualmente, atribui-se a trealose, a função principal de proteção a célula de levedura, principalmente em condições de estresse (WIEMKEN, 1990), enquanto o glicogênio exerceria função de reserva energética imediata, sendo acumulado em condições de exaustão de glicose no meio(LILLIE; PRINGLE, 1980).

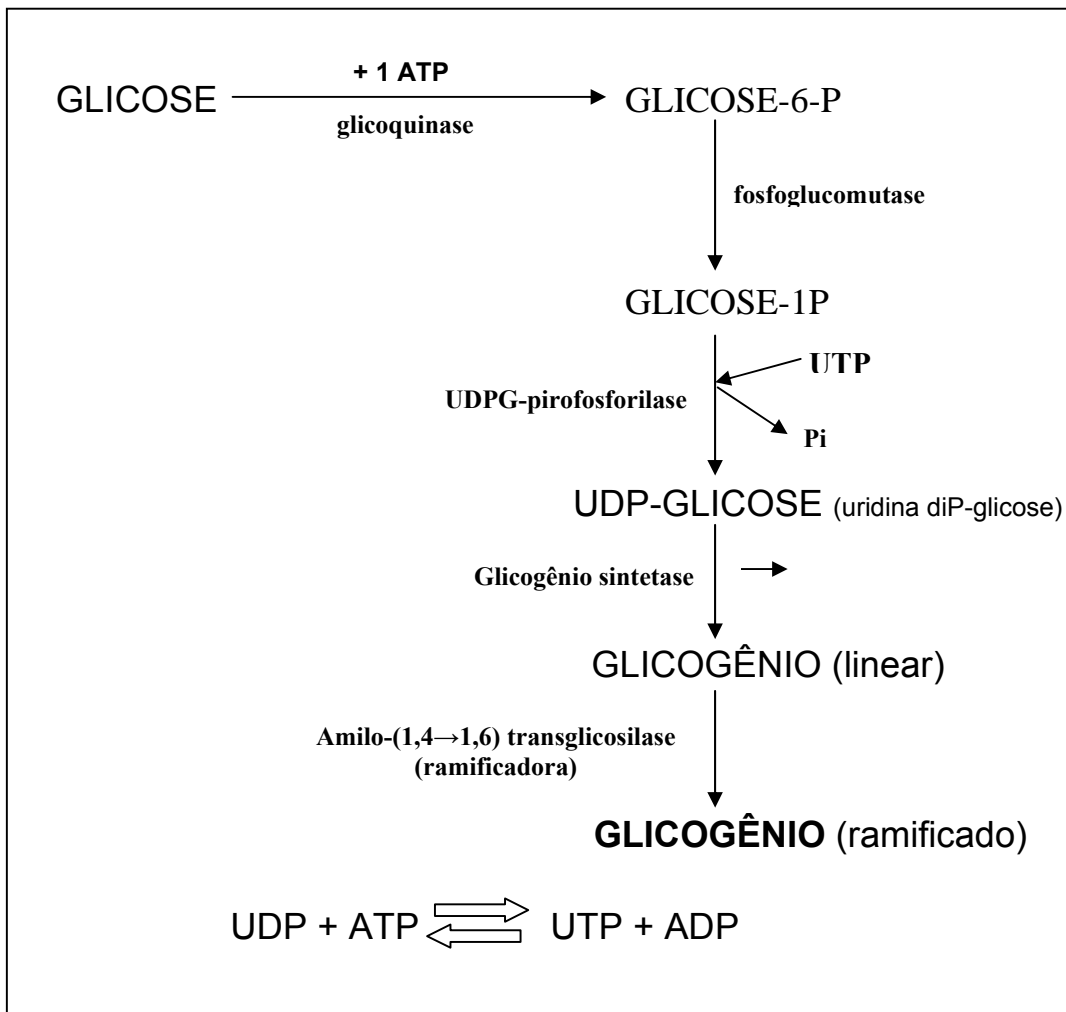


Figura 2 - Esquema da biossíntese de glicogênio

Fonte: GUTIERREZ, 1997, pág. 238

2.5 Trealose: formação e função

O primeiro passo na biossíntese da trealose é a formação da trealose-6-fosfato, a partir da UDP-glicose e glicose-6-fosfato, pela ação da enzima trealose-6-fosfato sintetase (EC 2.4.1.15). Essa reação já era conhecida desde 1953 (LELOIR ; CABIB, 1953). A partir desta, o grupo fosfato é removido por uma fosfatase específica, trealose-6-P-fosfatase (EC 3.2.1.28), formando a trealose. A degradação da trealose é feita por duas trealases distintas, uma ácida, confinada nos vacúolos, e outra neutra, localizada no citossol, que é ativada pela fosforilação do AMPcíclico (THEVELEIN, 1984).

A sacarose e a trealose são sintetizadas na mesma via. Iniciando-se a partir da UDP-glicose e frutose-6-fosfato ou G-6-P, os dissacarídeos-6-fosfato fosforilados são formados no primeiro passo com a ação das enzimas sacarose fosfato sintetase (EC 2.4.1.14) e trealose fosfato sintetase (EC 2.4.1.15). No segundo passo os dissacarídeos-6-fosfato são desfosforilados pelas fosfatases específicas, sacarose fosfato fosfohidrolase (EC 3.1.3.24) e trealose fosfato fosfohidrolase (EC 3.2.1.28) (WIEMKEN, 1990) (figura 3).

Muitos autores têm notado um aumento no acúmulo de trealose devido a mudanças na atividade das enzimas que metabolizam trealose, provocado pelo aumento da temperatura (HOTTIGER et al. 1987a; DE VIRGILIO et al., 1991 apud PAULILLO, 2001; PANEK, A.D., 1985), ou simplesmente pelo estresse térmico (ALCARDE ; BASSO, 1997) e em situações de limitação de nutriente (THEVELEIN, 1984).

É admitida que a principal função da trealose é a proteção das células, durante período de estresse, e não de carboidrato de reserva. A proteção é exercida sobre os componentes do citossol quando a levedura é submetida à condições desfavoráveis (WIEMKEN, 1990). A trealose é importante para a manutenção da viabilidade celular da levedura, contudo, é utilizada como carboidrato de reserva, durante períodos de não proliferação, quando a sobrevivência da célula depende do nível de trealose e de glicogênio (THEVELEIN, 1984). Basso e Amorim (1998b) verificaram que a trealose é importante para a manutenção da viabilidade celular quando submetidas a fermentação endógena. Seus estudos mostraram que enquanto as leveduras apresentavam

resistência a mobilização da trealose, a viabilidade permaneceu praticamente inalteradas, quando submetidas ao estresse térmico (42 °C)

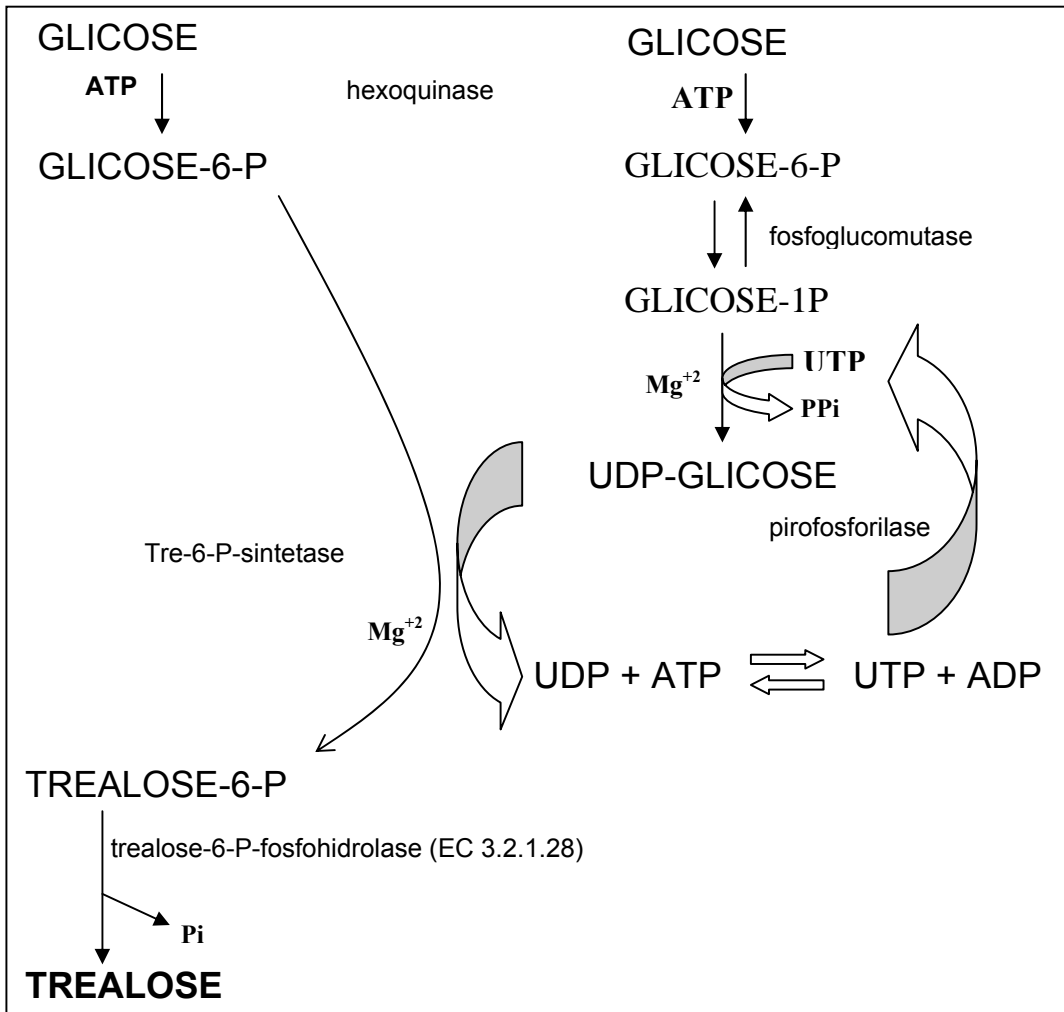


Figura 3 - Esquema da biossíntese de trealose

Fonte: ROSE & HARRISON, 1971, pág. 422.

2.6 Glicerol: formação e função

O glicerol é o segundo composto formado, em maior quantidade, pela *S. cerevisiae* durante a fermentação. O glicerol é formado pela redução da di-hidroxiacetona fosfato para glicerol 3-fosfato, concomitantemente com a oxidação do NADH para NAD⁺, sendo que o glicerol 3-fosfato é desfosforilado até glicerol (figura 4). Em condições anaeróbias, a *S. cerevisiae* produz glicerol para manter o balanço redox e, conseqüentemente, sustentar o processo de glicólise (OURA, 1977) (figura4).

Segundo Walker (1998), o glicerol é o mais efetivo osmorregulador presente em *S. cerevisiae* e ocorre aumento de síntese em situações de estresse osmótico, quando também ocorre aumento da síntese de trealose; esta por sua vez é o mais eficiente sacarídeo na estabilização da membrana plasmática quando a levedura é submetida a um estresse osmótico, reduzindo possíveis danos em sua estrutura (MANSURE et al., 1997). Segundo Gutierrez (1991) a produção de glicerol durante a fermentação alcoólica sofre influência das linhagens presentes no processo, do pH, temperatura e concentração de sacarose no mosto e, de modo geral, quanto maiores os valores destes parâmetros, maior a produção de glicerol. Erasmus et al., 2003, atribuem a síntese de glicerol como agente de equilíbrio osmótico e, complementarmente, o ciclo “fútil” de glicerol, glicogênio e trealose como “válvula” de segurança, que disponibiliza rapidamente carboidratos à levedura em condições adversas.

Alves (2000) mostrou que em condições de estresse osmótico devido a altas concentrações de potássio no meio fermentativo, o glicerol é produzido intracelularmente e posteriormente é excretado. Nestas condições, dependendo da linhagem de levedura, o glicerol foi produzido em concentrações diferentes como resposta ao possível estresse osmótico. Assim, parece haver uma correlação entre os níveis de glicerol intracelular, extracelular e tolerância ao estresse osmótico.

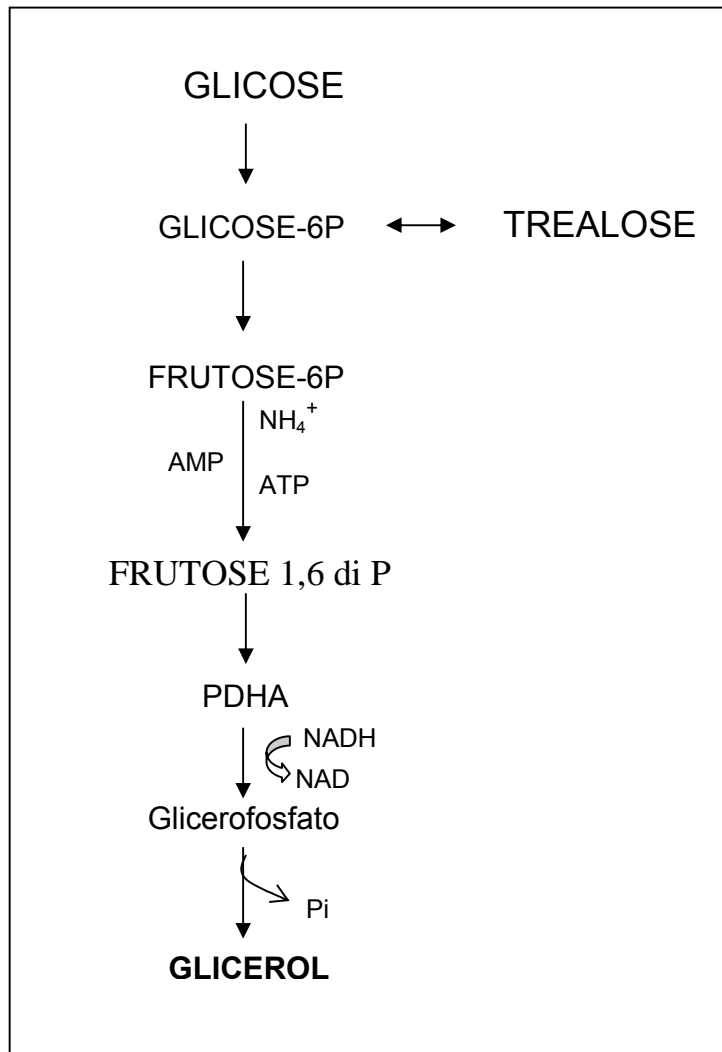


Figura 4 - Esquema da biossíntese de glicerol.
Modificado de: GUTIERREZ, 1997, pag.149

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens de *S. cerevisiae*

Foram utilizadas seis linhagens da levedura *S. cerevisiae*. A linhagem BG-1 foi isolada da Usina Barra Grande, localizada no município de Lençóis Paulista; a CAT-1 foi isolada da Usina VO-Catanduva, localizada no município de Catanduva; a PE-2 foi isolada da Usina da Pedra, localizada no município de Serrana. Todas essas usinas estão localizadas no estado de São Paulo, e as cepas escolhidas para o presente trabalho apresentam capacidade de permanência no processo e resistência aos estresses causados pelas condições existentes em unidades industriais de produção de etanol (BASSO et al., 2004; 2005). A linhagem Fleischmann foi escolhida devido ao seu amplo uso em processos industriais de produção de etanol, embora a mesma seja considerada uma linhagem para panificação. Já a linhagem 1403-7A (ATCC # 208023, genótipo relevante MATa suc⁻ MAL4^c MGL3 gal3 gal4 trp1 ura3), foi escolhida por não apresentar capacidade de hidrolisar a sacarose, ou seja, não possui atividade de invertase extracelular (BADOTTI et al., 2004), enquanto a LCM001 foi engenheirada por Badotti, (2005) e Herberts, (2006), a qual além de não possuir atividade de invertase extracelular, teve deletado de seu genoma o transportador de sacarose de alta afinidade, como descrito por Batista et al., (2004). As linhagens puras de BG-1, CAT-1, PE-2 e FLEISCHMANN foram caracterizadas através de cariotipagem (BASSO et al., 1993) e fornecidas pela Coleção de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, enquanto as linhagens 1403-7A e LCM001 foram fornecidas pelo Dr. Boris U. Stambuk, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

3.2 Manutenção das linhagens de *S. cerevisiae*

As cepas de leveduras são mantidas no laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas – ESALQ/USP em tubos de ensaio com meio de cultura “Yeast extract peptone dextrose ágar” (YEPDA) sob óleo mineral e à temperatura ambiente. O meio de cultivo YEPDA foi formulado com a seguinte composição (OLIVEIRA et al., 1996):

- Extrato de levedura10 g
- Peptona.....10 g
- Glicose..... 20 g
- Ágar..... 15 g
- Água destilada.....1,0 L (q.s.p.)

3.3 Multiplicação das linhagens de *S. cerevisiae* para o ensaio de invertase

As propagações das linhagens de levedura foram realizadas à temperatura ambiente (em uma faixa compreendida entre 20 e 28 °C). Para reativar as culturas armazenadas em tubos de ensaio, contendo meio de cultivo YEPDA, sob óleo mineral e à temperatura ambiente, colocou-se uma alçada dessa cultura em um tubo de ensaio, contendo 5 mL de YEPD, seguido de incubação à temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, estes 5 mL foram transferidos para um erlenmeyer contendo 50 mL de meio YEPD e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. Decorridas 24 horas de incubação, todo o volume do meio de crescimento foi transferido para um erlenmeyer contendo 500 mL de YEPD e incubado à temperatura ambiente. Após o término da multiplicação, os recipientes foram acondicionados em câmara fria (4 °C) durante 48 horas para ocorrer a decantação das células em suspensão e, em seguida, foram centrifugadas a 800G durante 20 minutos (centrífuga Internacional Refrigerated Centrifuge, modelo PR-2). As biomassas obtidas (decantado) foram utilizadas no teste de invertase.

3.4 Ensaio de invertase

As biomassas das seis diferentes linhagens, obtidas durante a fase de multiplicação, foram ajustadas a 3,1 gramas e, posteriormente, foram adicionados 62 mL de mosto, perfazendo uma fermentação com 5% de biomassa úmida. O volume total da suspensão obtida foi dividido em 3 partes iguais em tubos de ensaio, sendo considerados repetição do mesmo tratamento (leveduras) durante o processo fermentativo. Após decorridas 21 horas de fermentação, foram centrifugados todos os tubos de ensaio, encerrando assim a fermentação. As biomassas obtidas e os vinhos de levedurados foram submetidos a determinação da atividade de invertase conforme descrito no item 3.11.

3.5 Multiplicação das leveduras para o ensaio de metabolização de açúcares em diferentes meios formulados

As propagações das linhagens de leveduras foram realizadas à temperatura ambiente (em uma faixa compreendida entre 20 e 28 °C). As culturas, armazenadas em tubos de ensaio, contendo meio de cultivo YEPDA, sob óleo mineral e à temperatura ambiente, foram transferidas através de uma alçada dessa cultura para um tubo de ensaio contendo 5 mL de YEPD, seguido de incubação à temperatura ambiente. Decorridas 24 horas, foram transferidas para três tubos de ensaio com 5 mL de YEPD 0,1 mL desta suspensão e novamente incubados como descrito anteriormente, obtendo assim, o inóculo inicial para o ensaio de metabolização de açúcares.

3.6 Ensaio de metabolização de açúcares em diferentes meios formulados

Para a condução deste teste, foram feitos 3 meios de crescimento com diferentes fontes de carbono. Os meios foram formulados à base do YEP, conforme descrito no

item 4.2, ou seja, tiveram em sua constituição extrato de levedura (1%), peptona (1%) e uma fonte de carbono variável em concentração de 2%. Estes meios receberam as seguintes denominações: YEPD para o meio à base de glicose, YEPS para o meio à base de sacarose e YEPDS para o meio que teve como fonte de carbono, 1% de glicose e 1% de sacarose.

O inóculo obtido no item 3.5 foi transferido para 3 erlenmeyers, um contendo 50 mL de meio YEPD e os outros contendo 50 mL de YEPS e YEPDS, respectivamente, sendo incubados em shaker modelo Superohm G-25, a 30 °C e 120 rpm durante 34 horas para as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCMANN e PE-2 e 79 horas para as linhagens 1403-7A e LCM001, pois apresentam metabolismo reduzido quando comparado com as 4 primeiras. Durante este período de incubação, foram retirados 2 mL da suspensão, em períodos de 3 horas, para a análise de açúcares e glicerol em HPLC (Dionex), e determinação de biomassa em espectrofotômetro (Spectronic 88 Bausch & Lomb) a 600 nm.

3.7 Preparo do Mosto de Multiplicação de Levedura para o ensaio fermentativo com ciclos de células

Os mostos de multiplicação foram preparados com melaço industrial (mel final proveniente da Usina Santa Helena, Grupo Cosan, Município de Rio das Pedras, SP), diluído em água até atingir 10 % de açúcares totais (AT) e suplementado de acordo com a Tabela 2. Após a dissolução de todos os componentes, o mosto de multiplicação foi transferido para erlenmeyers e autoclavado (121 °C durante 20 minutos). Os frascos, com 500 mL de mosto de multiplicação autoclavado, foram armazenados em temperatura ambiente até o momento do uso.

Tabela 2 - Composição do mosto de multiplicação, utilizado na propagação das linhagens de *S. cerevisiae*, para a obtenção de biomassa suficiente para o uso nos experimentos de ciclos fermentativos.

Componentes	Quantidade
AT de melão	100,00 g.L ⁻¹
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	0,87 g.L ⁻¹
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,66 g.L ⁻¹
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,49 g.L ⁻¹
Sulfato de manganês (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0,02 g.L ⁻¹
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,03 g.L ⁻¹
Uréia (CON ₂ H ₄)	0,03 g.L ⁻¹
Solução alcoólica de ácido linoleico ¹	1,00 mL.L ⁻¹
Água	1,0 L (q.s.p.)

Fonte: Adaptado de Gutierrez , L.E. 1991, apud Alves, 2000.

¹Solução preparada com 30,0 g de ácido linoléico diluídos em 1 L de álcool etílico

3.8 Multiplicação das linhagens de *S. cerevisiae* para o ensaio fermentativo com ciclos de células

As propagações das linhagens de levedura foram realizadas à temperatura ambiente (em uma faixa compreendida entre 20 e 28 °C), e em duas etapas. A primeira etapa, para reativar as culturas armazenadas em tubos de ensaio contendo meio de cultivo YEPDA, sob óleo mineral e à temperatura ambiente, foi realizada através da transferência de uma alçada dessa cultura para um tubo de ensaio contendo 5 mL de YEPD, seguido de incubação à temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, 0,1 mL deste tubo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5 mL de YEPD e incubado nas mesmas condições. Em seguida, foi transferido o conteúdo deste tubo de ensaio para um erlenmeyer contendo 50 mL de meio YEPD e incubado nas mesmas condições descritas anteriormente.

Na segunda etapa da multiplicação, foi transferida toda a suspensão celular proveniente da primeira fase para um erlenmeyer, contendo 500 mL de mosto de multiplicação e incubado à temperatura ambiente. Decorridas 24 horas de incubação todo o volume foi transferido para um erlenmeyer contendo 2 L de mosto de crescimento e incubado por 24 horas a temperatura ambiente. Após o término da multiplicação, os recipientes foram acondicionados em câmara fria (4 °C) durante o tempo suficiente para ocorrer a decantação das células em suspensão e, em seguida, foram centrifugadas a 800 g durante 20 minutos (centrífuga Internacional Refrigerated Centrifuge, modelo PR-2). As biomassas obtidas (decantado) foram utilizadas nos ensaios fermentativos.

3.9 Ensaio de Fermentação

O ensaio fermentativo foi feito em mosto constituído de Mel (62% ART) e Caldo de cana (26,13% ART). A concentração final média de ART dos mostos utilizados foi de 13%, sendo que 50% deste ART veio via caldo e 50% via mel.

Este ensaio foi realizado em 4 ciclos fermentativos, sendo o último utilizado somente para o estudo da cinética de metabolização de açúcares. A biomassa das diferentes linhagens de leveduras, obtida durante a fase de multiplicação, foi ajustada a um peso de 6,3 gramas e, posteriormente, adicionou-se 90 mL de mosto, perfazendo um ensaio fermentativo com 7% de células. O volume final obtido foi dividido em três partes iguais, em tubos de ensaio, sendo consideradas repetições do mesmo tratamento (leveduras) durante cada ciclo fermentativo. Estes tubos foram mantidos à temperatura ambiente e a cada 1,5 hora decorrida, foi determinada a quantidade de CO₂ liberada. Após 21 horas de fermentação, os tubos de ensaio foram centrifugados, encerrando o ciclo fermentativo. O vinho de levedurado obtido foi submetido às análises de etanol, açúcares, glicerol e pH. A biomassa obtida foi ressuspensa em 30 mL de mosto, dando início ao novo ciclo fermentativo. Este procedimento foi realizado para os demais ciclos fermentativos.

3.10 Ensaio de metabolização de açúcares durante a fermentação

Após dar início ao 4º ciclo fermentativo, foi retirado 1 mL da suspensão a cada 2 horas e, imediatamente, submetido a um “banho-fervente” (100 °C), por 20 minutos, com a finalidade de inativar a invertase e, conseqüentemente, impedir a ação da enzima. Esta amostra foi, posteriormente, analisada em HPLC, determinando assim, a concentração de sacarose, glicose, frutose e glicerol. A constituição do mosto foi considerada como o tempo 0.

3.11 Determinação da atividade de invertase

A atividade de invertase é expressa em gramas de açúcares redutores, formada por hora, por grama de biomassa úmida ($\text{gAR.h}^{-1}.\text{g}^{-1}_{\text{biomassa}}$), sendo determinada no vinho delevedurado (mosto fermentado), no tampão acetato (50mM) utilizado na lavagem da levedura, e na solução de sacarose, cujas células foram incubadas após lavagem. A quantidade de açúcares redutores formada nas três situações descritas anteriormente, foi determinada pela metodologia de Somogy e Nelson (SOMOGYI, 1945), retirando-se 50 μL da solução, seguido da adição de 950 μL de água, completando assim, 1 mL de volume de reação.

A atividade de invertase na célula da levedura foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Silveira et al., (1996). A biomassa obtida do processo fermentativo foi lavada três vezes com tampão acetato de sódio 50 mM e, posteriormente, ressuspendida em tampão acetato de sódio com 50 mM de Fluoreto de Potássio (KF^-), obtendo uma suspensão com 5,25% de células. Em seguida, 100 μL desta suspensão foram adicionados em 4,9 mL tampão acetato de sódio com KF^- (50mM) e incubados a 30 °C, por 30 minutos, para inibição da via glicolítica. O início da reação se deu com a adição de 2,5 mL da solução de sacarose 300 mM e posterior incubação, a 30 °C, por 10 minutos. Após a incubação retirou-se 50 μL da solução para determinar a quantidade de açúcares redutores formada, como descrito anteriormente.

3.12 Determinação da concentração de ART no ensaio de invertase

Para determinar a concentração de ART nas amostras do ensaio de invertase foi feita uma reta padrão com uma solução de glicose com concentrações conhecidas. A partir desta reta, foi obtida uma equação de 1º grau, a qual relaciona leitura em absorbância e concentração de glicose.

3.13 Determinação da concentração de leveduras nos meios de crescimento YEPD, YEPS e YEPDS

Para se determinar a concentração de leveduras nos meios de crescimento foi feita uma reta padrão para cada levedura semelhante ao descrito no item 3.12, porém foi utilizada uma suspensão com concentração conhecida de células (biomassa úmida) e a equação obtida relaciona leitura em absorbância e concentração celular.

3.14 Determinação de etanol nos vinhos de levedurados

Os vinhos brutos foram centrifugados a 800 g, durante 15 minutos, em centrífuga Sorvall, modelo RT 6000D e, em seguida, 10 mL de vinho de levedurado (sobrenadante) foram transferidos para o interior de um microdestilador Kjeldahl e destilados por arraste em vapor, recolhendo 50 mL de destilado, em balão volumétrico. As amostras destiladas foram transferidas para o densímetro digital, marca ANTON PAAR, modelo DMA 48. As densidades obtidas dos destilados foram convertidas em concentrações de etanol (%v/v) pelo aparelho e a concentração resultante foi multiplicada por 5, para compensar a diluição ocorrida durante a destilação (ZAGO et al., 1996).

3.15 Determinação de açúcares nos caldos, melãos, mosto e vinhos delevedurados e glicerol em vinhos delevedurados

Estes foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando cromatógrafo iônico DIONEX, modelo DX300, equipado com coluna CarboPack PA1 e detector baseado na amperometria de pulso com eletrodo de ouro, utilizando como fase móvel solução de NaOH(100 mmol.L⁻¹) sob fluxo de 0,9 mL.min⁻¹.

3.16 Determinação do pH dos vinhos delevedurados

Foram determinados em potenciômetro digital, marca DIGIMED, modelo DPH2 (ZAGO et al., 1996).

3.17 Determinação do teor de leveduras nos vinhos

Os tubos do ensaio fermentativo, previamente tarados, foram centrifugados após o término da fermentação a 800 g, durante 15 minutos; o vinho delevedurado, recolhido em frascos plásticos para posteriores análises, e os tubos com as biomassas precipitadas foram pesados (ZAGO et al., 1996). Os resultados são expressos em biomassa presente no vinho bruto e apresentados em g.L⁻¹.

3.18 Determinação de Trealose na levedura

Os teores de trealose foram determinados após a extração seletiva, em triplicata, de 15 mg de massa seca de levedura com 2 mL de solução de ácido tricloroacético (0,5 mol.L⁻¹), mantidos em banho de gelo, durante 20 minutos (TREVELYAN; HARRINSON, 1956a; TREVELYAN; HARRINSON, 1956b), seguido de centrifugação a 700g, durante 5 minutos, em centrífuga Excelsa Baby da Fanem. Em seguida, foi realizada a

determinação da trealose nos extratos centrifugados, através de reação colorimétrica com antrona (500 mg.L^{-1}) e tiuréia (10 g.L^{-1}) em meio sulfúrico (75% de ácido sulfúrico P.A. e 25% de água destilada)(BRIN, 1966, apud CHERUBIN, 2003). A leitura foi realizada a 600 nm em um espectrofotômetro (Spectronic 88 Bausch & Lomb), cujas amostras foram comparadas a uma solução padrão de glicose dissolvida em água destilada ($200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados obtidos foram expressos em gramas de trealose contida em 100g de massa seca de levedura.

3.19 Determinação de Glicogênio na levedura

Utilizou-se 4 mL da suspensão de levedura os quais foram centrifugados e lavados com água em centrífuga Excelsa Baby da Fanem a 700g por 5 minutos, e ajustados a uma suspensão celular (biomassa úmida) de 12%(p/v). Desta suspensão, utilizou-se 0,5mL para a extração de glicogênio, o que corresponde a 15 mg de matéria seca ou 60mg da matéria úmida. Para a análise do glicogênio, utilizou-se o método de Becker (1978) adaptado por Rocha Leão et al., (1984) apud Paulillo, (2001). Inicialmente, efetuou-se a digestão alcalina com carbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{CO}_3 - 0,25\text{M}$) a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (90 min), seguida de hidrólise a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 4,8 com a enzima amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) de *Rhizopus* sp (Sigma N° A-7255). A quantificação da glicose liberada do glicogênio foi feita com glicose oxidase, peroxidase, ortodiansidina e ácido clorídrico, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, por 40 min e pH 6,0, e efetuando-se a leitura em um espectrofotômetro a 525 nm (Spectronic 88 Bausch & Lomb). O resultado foi expresso em g de glicogênio em 100g de matéria seca de levedura.

3.20 Determinação da viabilidade celular da levedura

As viabilidades celulares das linhagens de leveduras foram determinadas através de microscopia óptica, em microscópio OLYMPUS, modelo CBAK, em objetiva de imersão, considerando a leitura de células viáveis, não viáveis e brotos viáveis

presentes em 100 retículos da câmara de Neubauer espelhada. Foi utilizada solução de eritrosina, em tampão citrato, como corante para distinguir as células viáveis, não coradas, das não viáveis, coradas em rósea (OLIVEIRA et al., 1996).

3.21 Contagem de bactérias em microscópio óptico

Foi realizada através de microscopia, utilizando como corantes solução de sulfato azul do nilo e azul de metileno, em solução tampão fosfato, para distinguir bastonetes viáveis (não corados) e não viáveis (corados), em objetiva de imersão (OLIVEIRA et al., 1996). A técnica da microscopia permite uma quantificação menos precisa em relação ao plaqueamento para contagens inferior a 10^5 bastonetes/mL, entretanto, não necessita de período de incubação e fornece resultados em poucos minutos. Devido à menor precisão, os resultados obtidos nas contagens de bastonetes foram utilizados como apoio durante a execução dos experimentos e não estão apresentados nesse trabalho.

3.22 Cálculo do rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base na estequiometria proporcionada pela fermentação alcoólica, sendo considerado como 100% de rendimento quando ocorre formação de 51,11 g de etanol, equivalente a 64,75 mL, a partir de 100g de AR. Visando a redução dos erros de medidas de volume, optou-se por determinar as pesagens dos mostos, vinhos delevedurados e biomassas centrifugadas para posterior conversão desses pesos em volumes, através de cálculo das massas com as respectivas densidades. Nas condições que foram realizados os experimentos, a densidade da biomassa da levedura foi considerada como 1,05.

As análises de teores alcoólicos foram determinadas nos vinhos delevedurados. Contudo, para os cálculos de rendimento, foi computado o etanol associados à levedura, inclusive o proveniente da fermentação anterior. Para este cálculo considera-

se um volume de exclusão da matéria sólida da levedura (membranas e paredes celulares, entre outras) representando 30,7% (v/m) da massa úmida de levedura centrifugada a 800G (Basso¹).

3.23 Cálculo da eficiência fermentativa

A eficiência fermentativa foi calculada como descrito no item 3.22, porém levou-se em consideração o AR residual no vinho de levedurado. Assim, foi considerado somente o açúcar metabolizado.

3.24 Delineamento Estatístico

Foi utilizada a análise de variância com aplicação do teste F, ao nível de 0,05 de significância, para analisar as variáveis, e análise sob o esquema de parcelas subdivididas no tempo em delineamento de blocos ao acaso, com modelo classificação cruzada e 3 repetições, sendo os tratamentos considerados como parcelas e os ciclos fermentativos, sub-parcelas. As comparações de médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 0,05 de significância (GOMES, 1990).

O programa estatístico utilizado para executar as análises foi o SAS versão 8.2.

¹Basso, L.C. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

4 Resultados e Discussão

4.1 Ensaio de invertase

Os resultados do ensaio de atividade de invertase (Tabela 3) estão divididos em três partes, sendo estas constituintes da atividade de invertase externa, uma vez que a interna não foi quantificada. Analisando a atividade externa, notou-se que existe uma diferente atividade de invertase total entre as leveduras, sendo que as linhagens BG-1 e Fleischmann não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), porém estas linhagens diferem das demais CAT-1, PE-2, 1403-7A e LCM001. As linhagens CAT-1 e PE-2 são estatisticamente iguais, enquanto as linhagens 1403-7A e LCM001, como previamente descrito por Badotti et al., (2004), não apresentaram atividade de invertase.

Durante o processo de lavagem das células de levedura em tampão acetato e posterior incubação com Fluoreto de Potássio (NaF^-), estas ficam livres de invertase do meio, assim, ao adicionar a solução de sacarose para iniciar o teste, pode-se dizer que toda a atividade de invertase dosada está associada à célula, seja no espaço periplasmático, na parede celular ou liberadas ao meio no transcorrer da incubação. Assim, notou-se que a célula, no geral, é responsável por mais 95% da atividade presente na levedura, enquanto o vinho e a água de lavagem somam 5%, exceção feita à FLEISCHMANN que possui 89,29% de atividade associada à célula, 7,76% ao vinho e 2,95% à água de lavagem, totalizando 10,71%.

Os dados, presentes na tabela 3, mostram que a levedura BG-1 apresenta uma atividade de invertase de $7,47 \text{ g ART.h}^{-1}.\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ e a FLEISCHMANN $6,44 \text{ g ART.h}^{-1}.\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$, não diferindo estatisticamente entre si, porém diferem das demais. As linhagens PE-2 e CAT-1 apresentaram uma atividade de $3,89$ e $2,50 \text{ g ART.h}^{-1}.\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Assim, notou-se que todas as linhagens de leveduras estudadas apresentam uma atividade de invertase diferente. Laluce et al. (1991) e Carvalho (2001) estudaram a atividade de invertase de diferentes linhagens de leveduras, mostrando que esta atividade é

dependente da linhagem da levedura. Desta maneira, os resultados obtidos estão condizentes com os descritos na literatura.

Bokassa et al., (1993), obtiveram atividade de invertase máxima de $440 \mu\text{mol sacarose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{biomassa seca}}^{-1}$ ($\sim 37,92 \text{ g ART} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{biomassa úmida}}^{-1}$), quando as leveduras 01K32 fermentaram melaço com 3% ART, e com aeração, concluindo que esta levedura possui grande potencial para a produção da enzima. Neste contexto, as leveduras selecionadas industrialmente, quando em condições de fermentação anaeróbia, apresentaram uma atividade de invertase, em média, 5 vezes inferior à produzida pela linhagem 01K32. Assim, pode-se dizer que a atividade de invertase não sofre apenas influência da concentração do teor alcoólico no meio como proposto por Echegaray et al. (1990), mas também da cultura empregada, das características do meio e a linhagem de levedura (PATKAR; SEO, 1992; FONTANA et al., 1992).

Tabela 3 - Valores médios da atividade de invertase na parede celular, no vinho e na solução tampão de lavagem das células, expressos em $\text{g ART.h}^{-1}.\text{g}^{-1}_{\text{biomassa}}$, após um ciclo fermentativo com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.

Linhagens	Atividade de invertase ($\text{g ART.h}^{-1}.\text{g}_{\text{biomassa}}$)			
	Células	Vinho	Água Lavagem	Total
BG-1	7,34 (98,26%) a	0,11 (1,47%) b	0,02 (0,27%) b	7,47 (100%)a
FLEISCHMANN	5,75 (89,29%) a	0,50 (7,76%) a	0,19 (2,95%) a	6,44 (100%)a
CAT-1	3,76 (96,66%) b	0,11 (2,83%) b	0,01 (0,26%) b	3,89 (100%)b
PE-2	2,39 (95,60%) b	0,09 (3,60%) b	0,01 (0,40%) b	2,50 (100%)b
1403-7A	0	0	0	0
LCM001	0	0	0	0

Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 95%.

4.2 Metabolização de açúcares em diferentes meios de crescimento

Mwesigye e Barford (1996) estudaram leveduras crescidas em meio com fontes de carboidratos variados, em concentrações de 2% e com sistema de aeração (saturação de O₂ superior a 75%). Neste sistema, concentrações superiores a 0,2% de glicose inibiu a secreção de invertase, assim as leveduras previamente adaptadas a meio de sacarose (2 ou 14 dias), mostraram claramente possuir transportador de sacarose, pois a transportaram sem a prévia hidrólise a monossacarídeos. Seus ensaios mostraram que em meio com 1% de sacarose mais 1% de glicose, houve consumo de sacarose e glicose conjuntamente, porém não houve formação de frutose até que os níveis de glicose apresentassem inferiores a 0,2%. Assim concluíram que o consumo de sacarose foi devido ao transportador específico deste dissacarídeo não redutor, caso contrário haveria formação de frutose no meio. Com o objetivo de verificar o transporte de sacarose sem sua hidrólise e, conseqüentemente, a presença de transportador de sacarose, nas diferentes linhagens de leveduras, porém sem saturar o meio de O₂, foi realizado este ensaio prévio, semelhante ao efetuado por Mwesigye e Barford (1996).

A levedura BG-1, quando crescida em meio YEPD, consumiu toda a fonte de açúcar em 24 horas, produzindo por volta de 0,7g_{biomassa} /100mL e uma quantidade aproximada de 0,11g_{glicerol}/100mL. Quando em meio YEPS, toda a sacarose foi hidrolisada em 15 horas, enquanto os açúcares redutores formados foram igualmente consumidos em 24 horas, resultando na mesma quantidade de biomassa e glicerol, se comparados ao meio YEPD. Em meio YEPDS tanto a glicose quanto a sacarose foram consumidos em 24 horas, e notou-se que ambas fontes de carboidratos foram consumidos a uma velocidade proporcional, sendo a velocidade de metabolização de monossacarídeos superior a hidrólise da sacarose pela invertase, fato comprovado pela manutenção (ausência de “picos”) na concentração de glicose e, diferentemente do crescimento nos demais meios, houve maior formação de biomassa (0,13g/100mL) , porém com mesma produção de glicerol. (Figura 5).

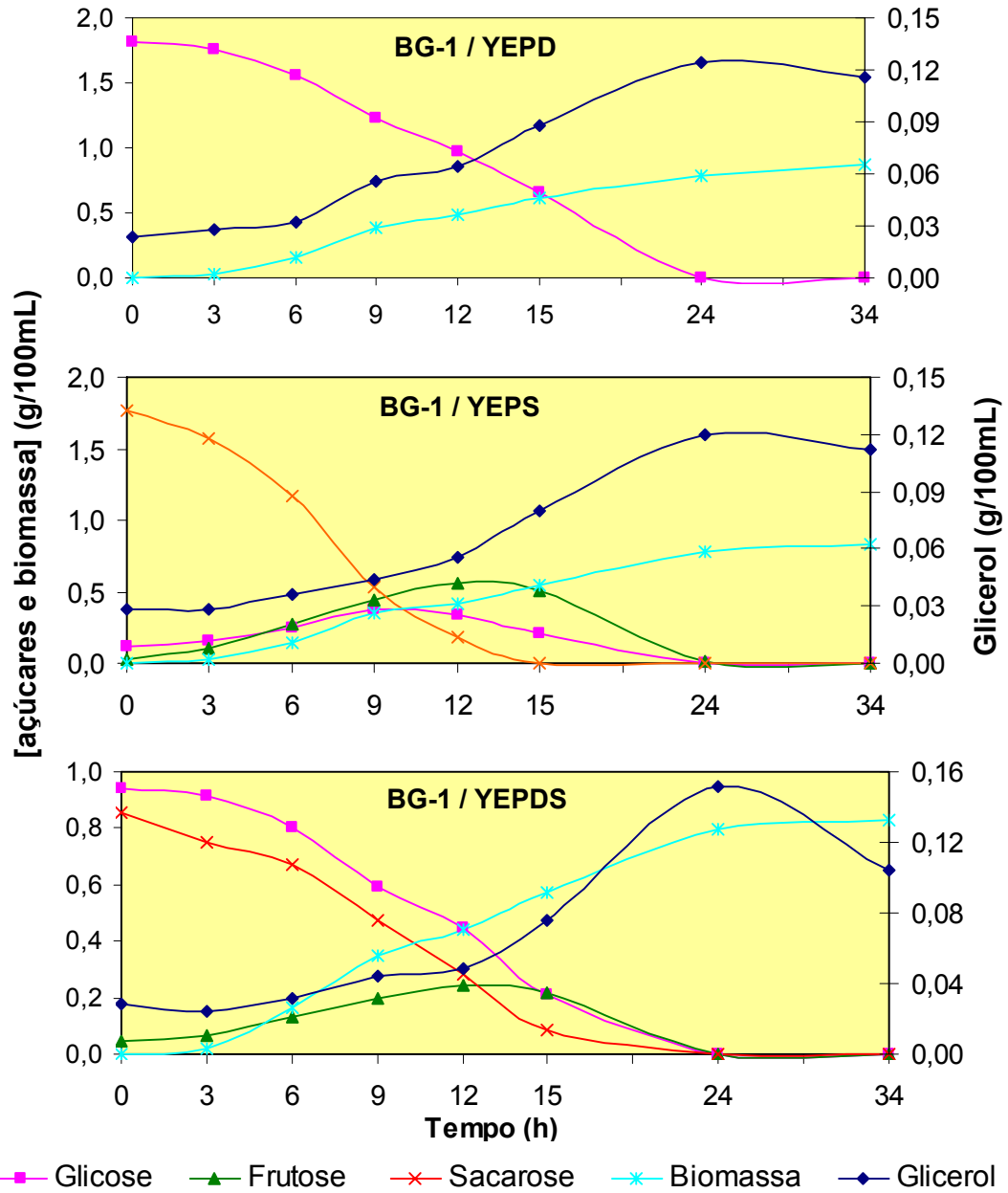


Figura 5 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura BG-1, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.

A levedura CAT-1 em meio YEPD apresentou valores semelhantes a BG-1, quanto ao tempo de metabolização da glicose, formação de glicerol e biomassa. Em meio YEPS, devido à menor atividade de invertase (Tabela 3), quando comparada com a BG-1, notou-se que a sacarose foi totalmente hidrolisada, entre 15 e 18 horas de propagação, com uma menor formação de açúcares redutores devido à maior velocidade de metabolização de açúcares em detrimento a uma baixa velocidade de formação de glicose e frutose. A CAT-1 em YEPDS, mesmo com uma atividade de invertase menor em relação a BG-1, hidrolisou mais rapidamente a sacarose, produzindo, porém, as mesmas quantidades de glicerol e biomassa (Figura 6). Neste contexto a CAT-1, a despeito de apresentar menor atividade de invertase, parece que tal enzima é menos afetada pela glicose, diferentemente da FLEISCHMANN.

A FLEISCHMANN, em YEPD, teve o mesmo comportamento das demais leveduras, exceção feita às linhagens 1403-7A e LCM001, quanto ao tempo de metabolização da glicose, porém houve uma maior produção de biomassa e menor de glicerol (1,1g/100mL e 0,08g/100mL respectivamente). Tanto em meio YEPS quanto em YEPDS, devido a uma elevada atividade de invertase dentre as linhagens estudadas, notou-se que, após 12 horas de propagação, toda a sacarose já havia sido hidrolisada, com um grande acúmulo de glicose e frutose no meio (0,6g/100mL e 0,8g/100mL, respectivamente) (Figura 7). Desta maneira, pode-se dizer que, em baixas concentrações de açúcar, a velocidade de hidrólise da sacarose não é suficiente para elevar a pressão osmótica do meio e causar estresse nas leveduras. Assim, parece haver uma concentração mínima de açúcares redutores no meio para que este se torne estressante.

Semelhantemente a BG-1 e CAT-1, a PE-2 em YEPD metabolizou toda a glicose em 24 horas, porém verificou-se que, tanto em YEPD quanto YEPS, houve uma produção de glicerol inferior às leveduras citadas anteriormente, e uma biomassa muito semelhante (0,78g/100mL) (Figura8).

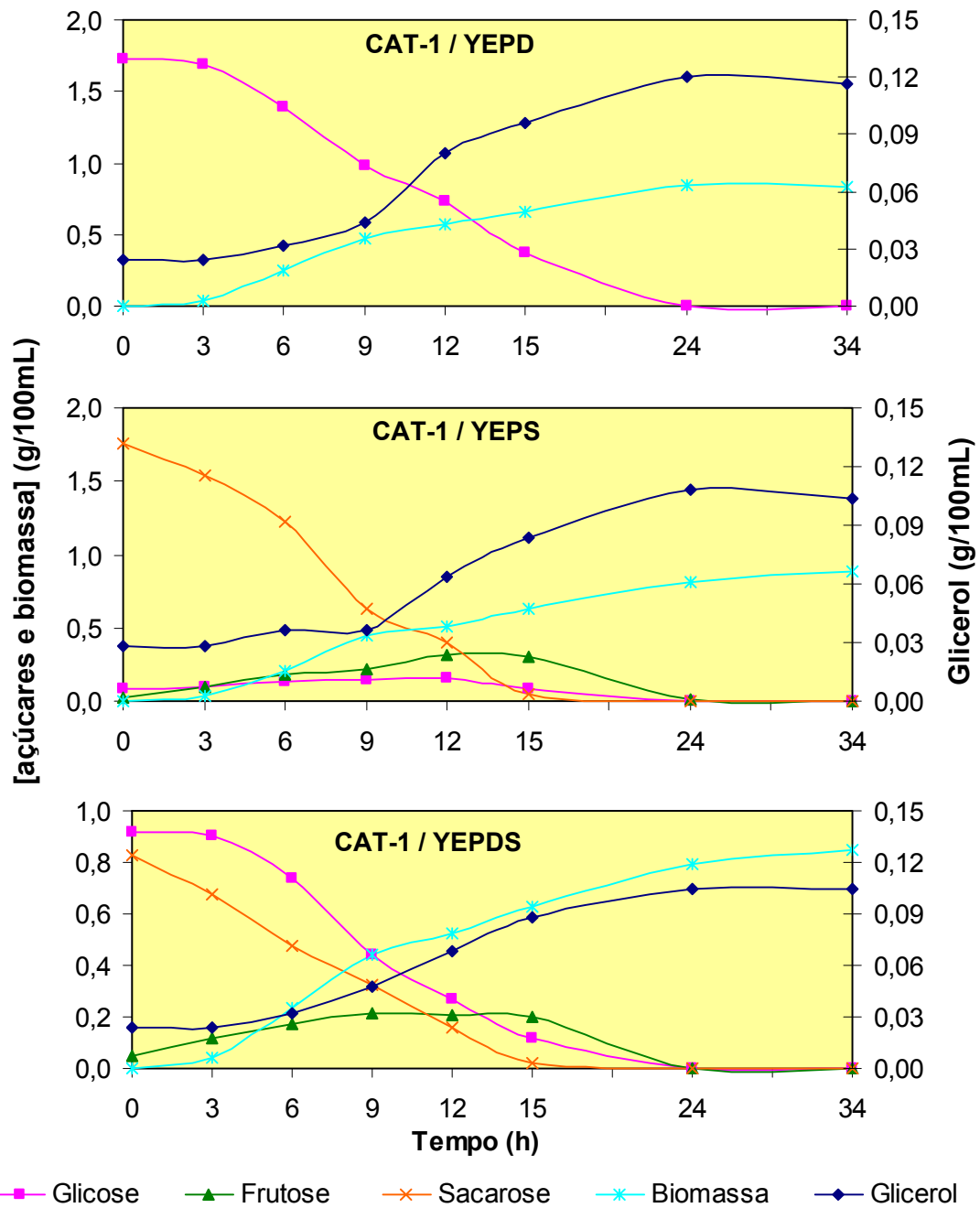


Figura 6 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura CAT-1, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.

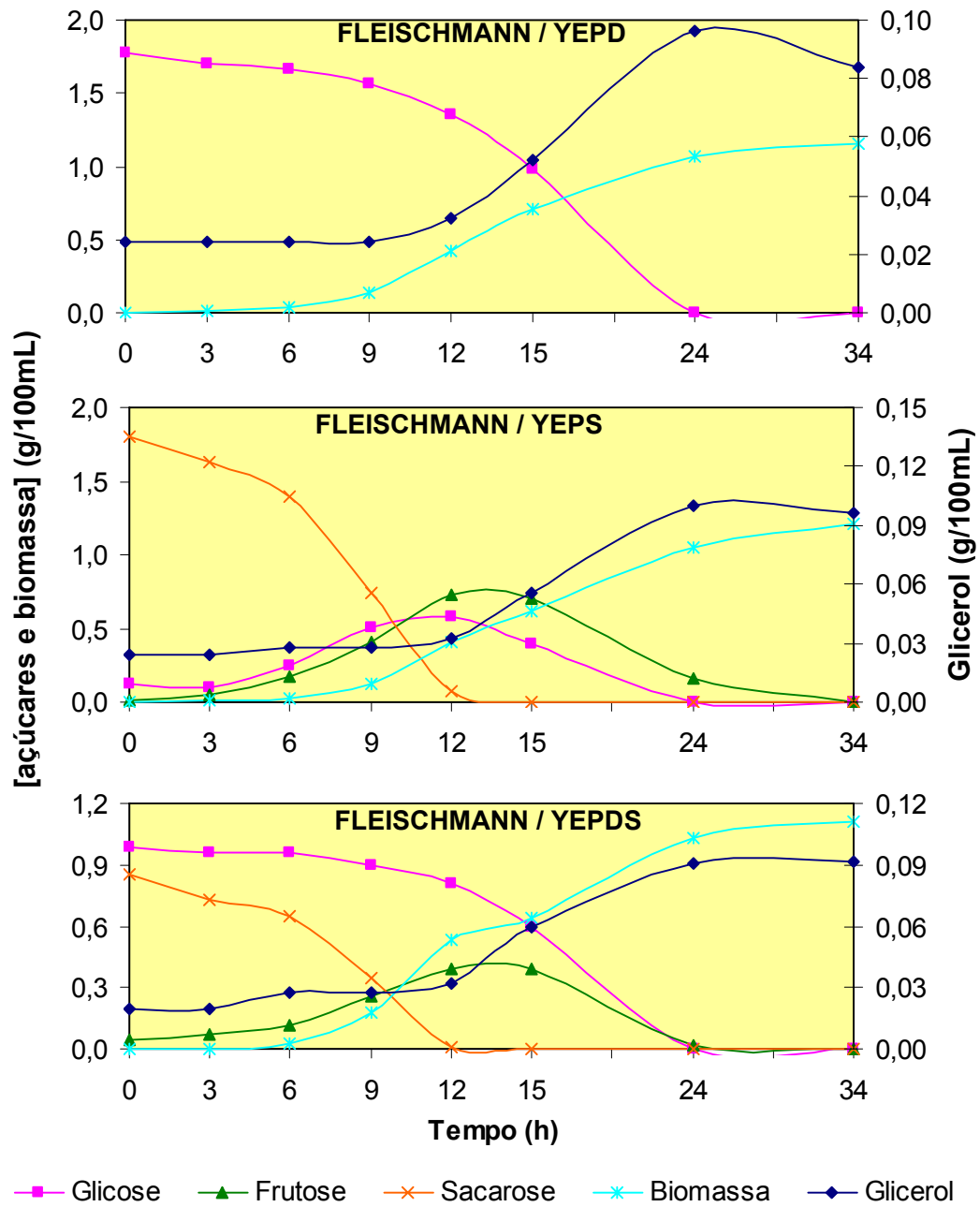


Figura 7 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura FLEISCHMANN, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPA, YEPS, YEPDS) em função do tempo.

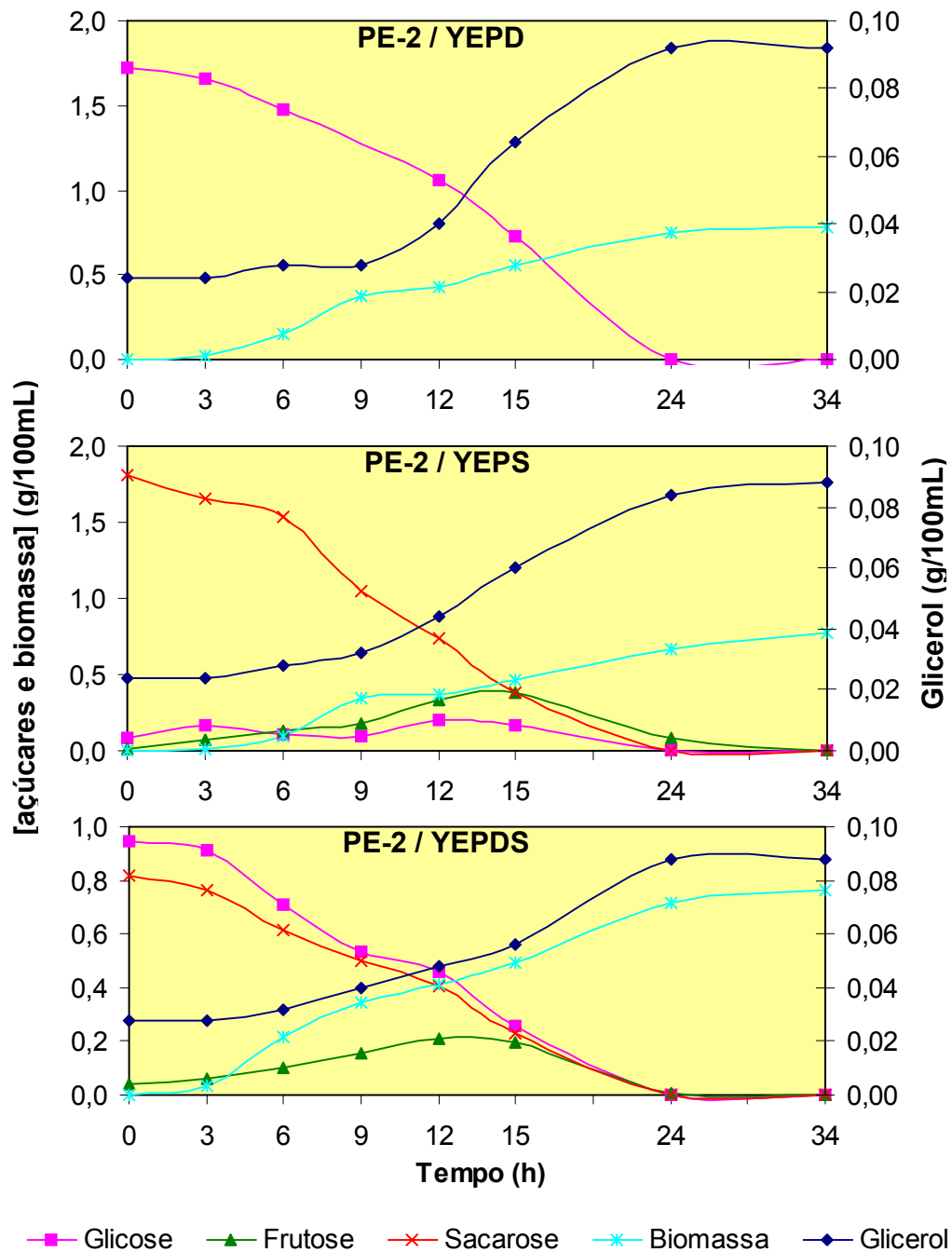


Figura 8 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura PE-2, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.

A linhagem de levedura 1403-7A, como descrito por Stambuk et al. (2000), apresenta atividade de transporte ativo de sacarose, mediada por dois sistemas distintos, um com alta afinidade ($K_m = \sim 8 \text{ mM}$) e outro com baixa afinidade ($K_m \sim 120 \text{ mM}$) pelo substrato, apresentando a mesma velocidade específica de crescimento em sacarose de cepas que possuem a enzima invertase (BADOTTI et al., 2004). Em meio YEPD, a levedura 1403-7A, diferentemente das demais linhagens, apresentou um consumo de glicose um pouco mais lento, esgotando toda a fonte de carboidrato do meio em 34 horas. No entanto, a produção final de biomassa foi significativamente menor ($0,5\text{g}/100\text{mL}$) e a produção glicerol ($0,08\text{g}/100\text{mL}$). Mesmo com uma menor produção de biomassa a levedura produziu a mesma quantidade de glicerol em relação as demais linhagens.

Por outro lado, quando estas células foram crescidas em YEPS, houve um aumento no tempo de metabolização do açúcar (54 horas), porém a produção de biomassa foi muito maior ($0,8 \text{ g/mL}$) com produção semelhante à das outras linhagens estudadas, comprovando, assim, os dados apresentados por Badotti et al., (2004), e a produção de glicerol menor ($0,07\text{g}/100\text{mL}$), comprovando que esta linhagem não sofreu estresse neste meio, confirmando os dados presentes na literatura, ou seja, os responsáveis pelo aumento do estresse osmótico são os monossacarídeos, como glicose e frutose e não os dissacarídeos (MYERS et al., 1997).

Quando em meio YEPDS, a glicose foi consumida com uma velocidade maior (18 horas) se comparada aos meios YEPD e YEPS, porém a sacarose foi consumida em um tempo muito elevado (acima de 79 horas), apresentando uma produção de biomassa ($0,8\text{g}/100\text{mL}$) e glicerol ($0,07 \text{ g}/100\text{mL}$)(Figura 9) semelhante ao produzido em meio YEPS. No entanto, enquanto havia glicose no meio, a sacarose não foi consumida. É importante ressaltar que em nenhum dos meios a base de sacarose verificou-se a formação de açúcares redutores, comprovando a ausência de atividade de invertase conforme dados da Tabela 3.

A linhagem LCM001, descrita por Badotti (2005), é a 1403-7A, sem o transportador de sacarose de alta afinidade, porém com capacidade de crescer em sacarose com a mesma velocidade específica que a parental 1403-7A. Notou-se que, no geral, em todos os meios de crescimento à base de sacarose, houve um acréscimo

no tempo de metabolização dos açúcares. É importante ressaltar que, em meio YEPD, as duas linhagens apresentaram o mesmo perfil quanto à metabolização da glicose, formação de biomassa e glicerol (Figuras 9 e 10). Este acontecimento já era esperado pois as leveduras são geneticamente semelhantes, diferindo somente quanto ao transportador de sacarose.

Observou-se que, em meio YEPS, a LCM001 apresentou um tempo de metabolização da fonte de carboidrato muito semelhante ao apresentado pela 1403-7A, porém a produção de biomassa foi maior (1,1g/100mL) e, conseqüentemente, houve uma maior produção de glicerol (0,09g/100mL). Entretanto, é importante notar que a rendimento em biomassa foi 22,2% superior a sua parental 1403-7A, enquanto Badotti (2005) observou um rendimento superior (45%). Em meio YEPDS, a produção de glicerol e biomassa foi semelhante ao apresentado pela linhagem 1403-7A, diferindo somente no tempo de metabolização da sacarose, permanecendo nas mesmas concentrações até as 34 horas de crescimento, passando a ser metabolizada somente após o término de glicose no meio, e em ambas linhagens, verificou-se que a glicose exerce repressão catabólica sobre a hidrólise dos α -glicosídeos, fazendo com que a sacarose somente seja metabolizada após o término da glicose no meio, como descrito por (LAGUNAS, 1993; STAMBUK et al., 1998, apud STAMBUK; DE ARAÚJO, 1999). O consumo de sacarose, diferentemente da linhagem 1403-7A, foi mais lento devido, possivelmente, à deleção do gene de transporte de sacarose de alta afinidade (Figura 10), também sendo reforçado pela observação de um consumo mais lento da sacarose na fase final de fermentação. Dynesen et al., 1998, estudaram a repressão catabólica na produção de invertase, em aerobiose, causada por glicose e frutose em meios a base de sacarose, verificando que concentrações superiores a 5g/L destes monossacarídeos, fazem com que a sacarose não seja metabolizada até que se obtenha concentrações inferiores a este limiar, enquanto Mwesigye e Barford (1996) relatam valores de 2g/L para esta repressão. Desta maneira, parece que as leveduras 1403-7A e LCM001 apresentaram o mesmo desempenho das linhagens estudadas por Dynesen et al., 1998, ou seja, apresentam metabolismo preferencialmente oxidativo, quando em baixas concentrações de açúcares, mesmo em condições de fermentação, igualmente ao relatado por Badotti (2005).

Fonseca e Gombert (2005) estudaram a produção de biomassa por *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em diferentes fontes de carboidratos, tais como glicose, frutose e sacarose em concentrações de 10 g/L em aerobiose e chegaram a conclusão que esta não *Saccharomyces* é uma forte candidata ao uso industrial para a produção de biomassa, devido à produção final média de 5 g/L em todos os meios de crescimento utilizados em seu experimento. Os dados obtidos neste trabalho mostram que, mesmo em condições de fermentação, as *Saccharomyces cerevisiae* produziram uma quantidade de biomassa muito próxima à obtida por Fonseca e Gombert (2005) em seu estudo e, desta maneira, pode-se dizer que as *Saccharomyces cerevisiae* são mais eficientes quanto à produção de biomassa, principalmente se forem crescidas em condições de aerobiose.

De maneira geral as leveduras estudadas apresentaram algumas particularidades como descrito anteriormente, porém em condições de crescimento sem aeração do meio e adaptação das leveduras em meio de sacarose como descrito por Mwesigye e Barford (1996), não é possível identificar se as leveduras apresentam transportador de sacarose, pois nas condições estudadas a glicose não exerceu repressão na produção de invertase. Assim, não se pode falar em transportador de sacarose, principalmente porque houve aumento na concentração de frutose desde o início do experimento (tempo 0h) devido a ação da invertase.

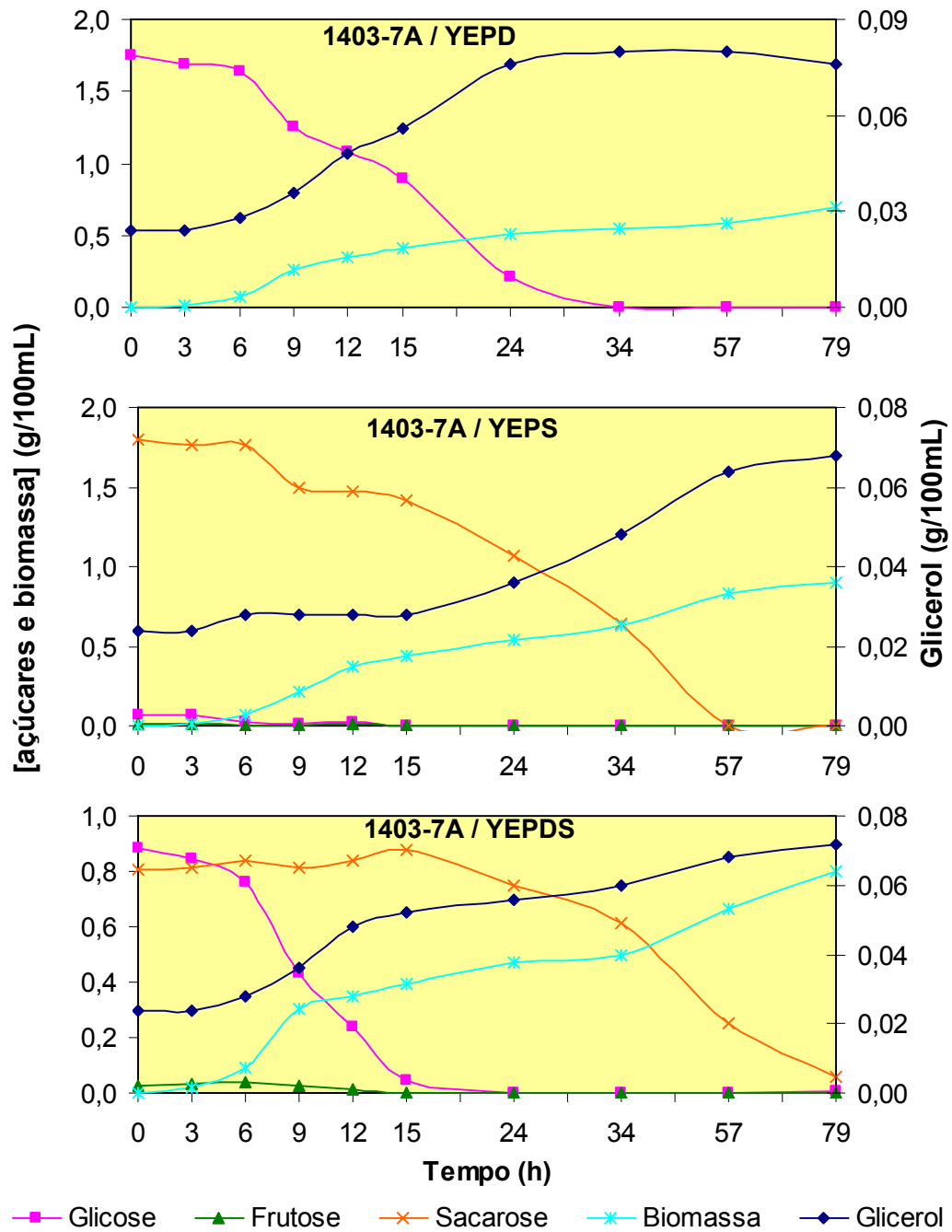


Figura 9 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura 1403-7A, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.

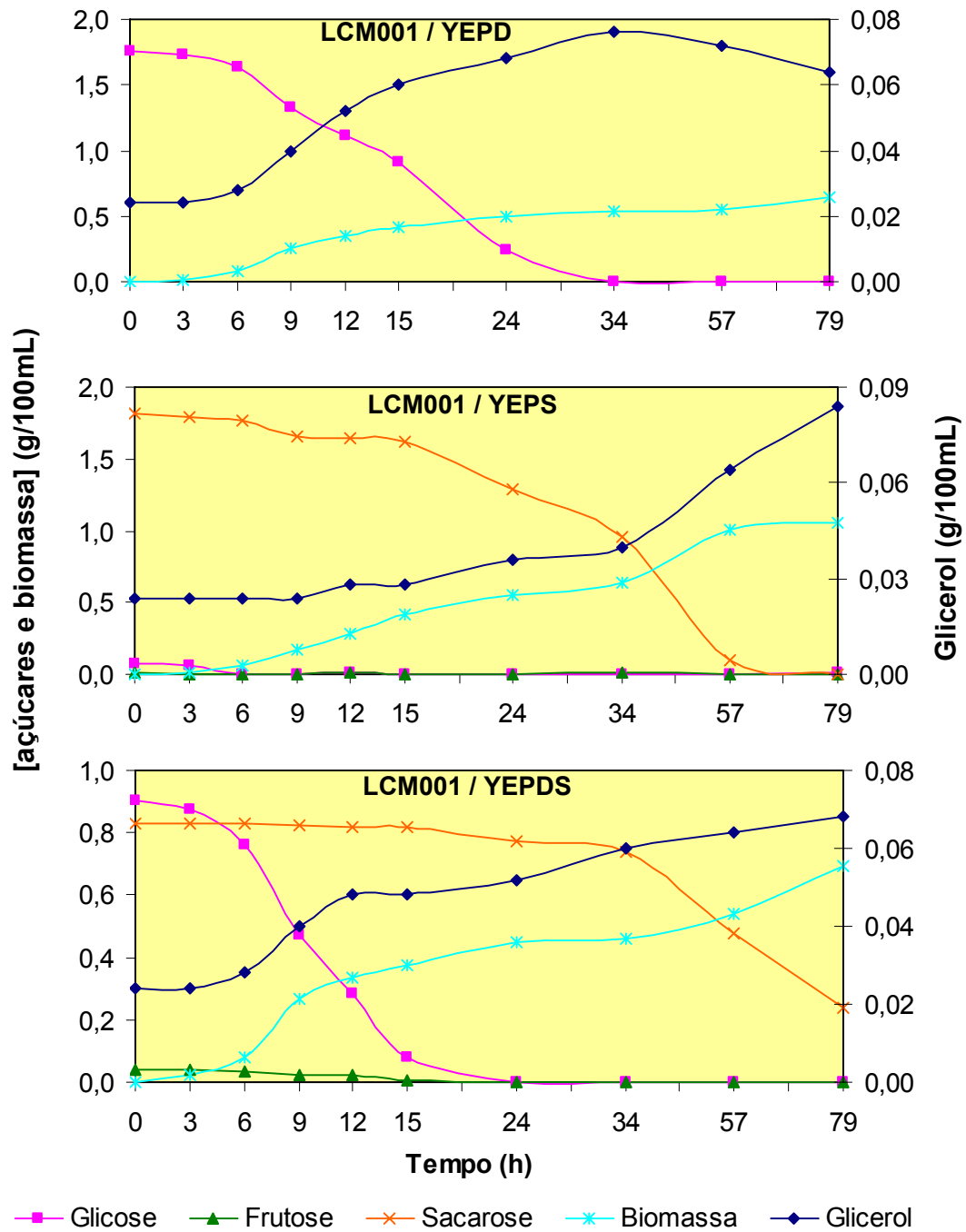


Figura 10 - Metabolização de glicose, sacarose, frutose, glicerol e formação de biomassa pela levedura LCM001, expressos em g/100mL, em diferentes meios de crescimento (YEPD, YEPS, YEPDS) em função do tempo.

4.3 Ensaio de fermentação

Em um ensaio fermentativo, constituído por 4 ciclos, os 3 primeiros ciclos foram destinados a avaliação das diferentes linhagens de leveduras quanto aos diversos parâmetros do processo de fermentação, dentre eles: rendimento, biomassa, viabilidade, produção de glicerol, eficiência fermentativa, velocidade de fermentação, teores celulares de glicogênio e trealose, e o 4º ciclo destinado a cinética de metabolização de açúcares durante 24 horas, onde analisou-se os teores de sacarose, glicose, frutose e formação de glicerol. Observou-se, que a velocidade da fermentação analisada pela quantidade de CO₂ liberada em função do tempo foi superior para as leveduras BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2, enquanto as leveduras 1403-7A e LCM001 apresentaram uma velocidade muito mais lenta (Figura 11), principalmente, devido a fermentação da sacarose ser somente através do transportador de sacarose mediado pela permease AGT-1. Após 7,5 horas do início da fermentação, verificou-se que a quantidade de CO₂ liberada pelas linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2, tornou-se constante, já as leveduras 1403-7A e LCM001, após 21 horas de fermentação não haviam obtido uma estabilidade na eliminação deste gás.

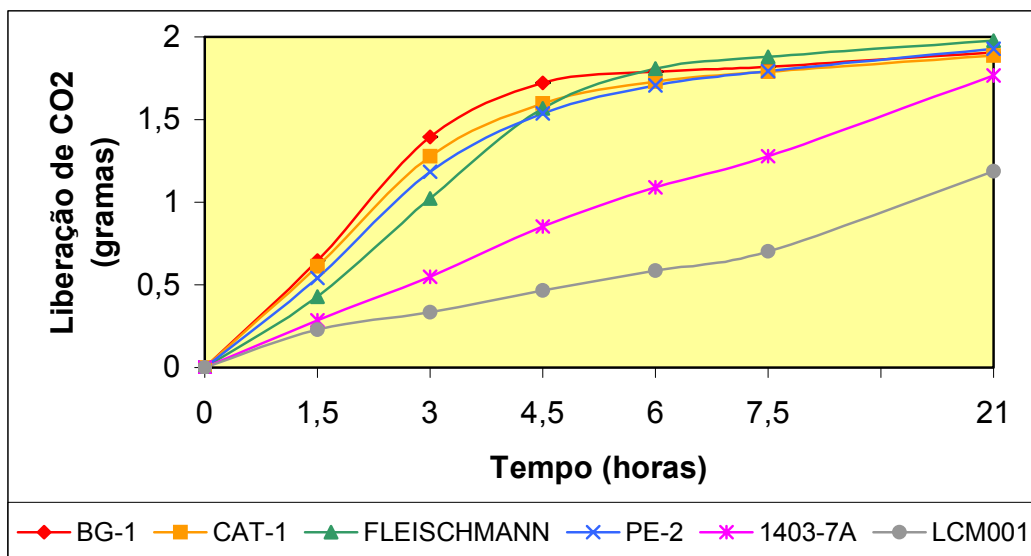


Figura 11 - Média dos três ciclos fermentativos da taxa de liberação de CO₂ pelas diferentes linhagens de leveduras em função do tempo de fermentação.

Os dados obtidos durante os 3 primeiros ciclos, mostram que as leveduras BG-1, CAT-1, PE-2 e FLEISHMANN apresentaram um rendimento semelhante durante o 1º ciclo fermentativo, não diferindo estatisticamente entre si, enquanto as leveduras 1403-7A e LCM001, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) e entre as demais. Notou-se que o rendimento da LCM001 foi muito inferior (47,95%) quando comparado com a 1403-7A (75,7%) e com as demais leveduras, as quais apresentaram um rendimento médio de 83%. Badotti (2005), estudando o rendimento em biomassa e produção de álcool pelas leveduras 1403-7A e LCM001 concluiu que o rendimento em biomassa e produção de etanol da LCM001 foram, respectivamente, 45 e 50% inferiores aos da 1403-7A, devido a predominância do mecanismo oxidativo desta linhagem, mesmo em condições de fermentação. A partir do 2º ciclo, a levedura 1403-7A mostrou-se mais adaptada ao meio, pois seu rendimento tornou-se próximo das outras linhagens, exceção feita a LCM001, que mesmo aumentando seu rendimento para 57,14%, continuam apresentando uma diferença estatística significativa entre as demais leveduras ($p < 0,05$). No 3º e último ciclo fermentativo, as 6 leveduras apresentaram o mesmo perfil do 2º ciclo, ou seja, mantiveram um bom rendimento com, exceção da LCM001 (Figura 12).

Por outro lado, analisando a eficiência fermentativa (Figura13), ou seja, levando em consideração somente a quantidade de açúcar metabolizado, as leveduras com transportador de sacarose mostraram uma eficiência muito próxima a das demais linhagens estudadas. Ao final do 1º ciclo, todas as leveduras apresentaram uma eficiência fermentativa muito semelhante, no 2º e 3º ciclo, a levedura 1403-7A foi surpreendente, atingindo um rendimento superior (83,79% e 82,30% respectivamente) ao das linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2, porém não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$).

Quando comparou-se a 1403-7A com a LCM001, notou-se que no 2º e 3º ciclo elas diferem estatisticamente entre si, com um rendimento ligeiramente superior para a 1403-7A (Figura 13) (Tabela10 - anexo A).

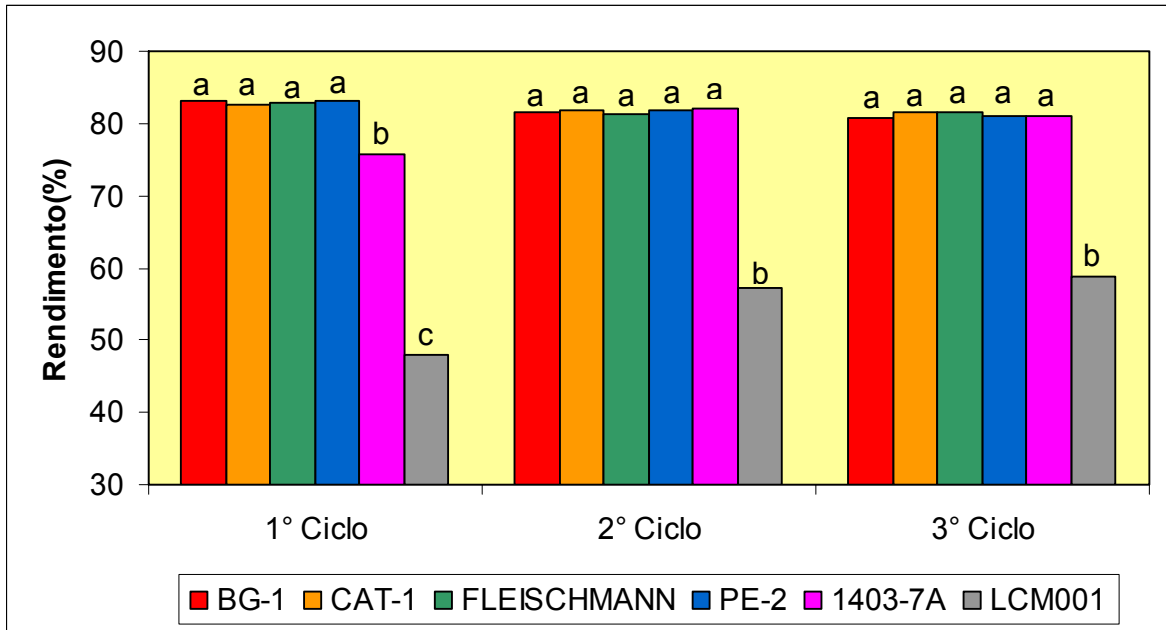


Figura 12 - Rendimento, expresso em porcentagem (v/v), das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.

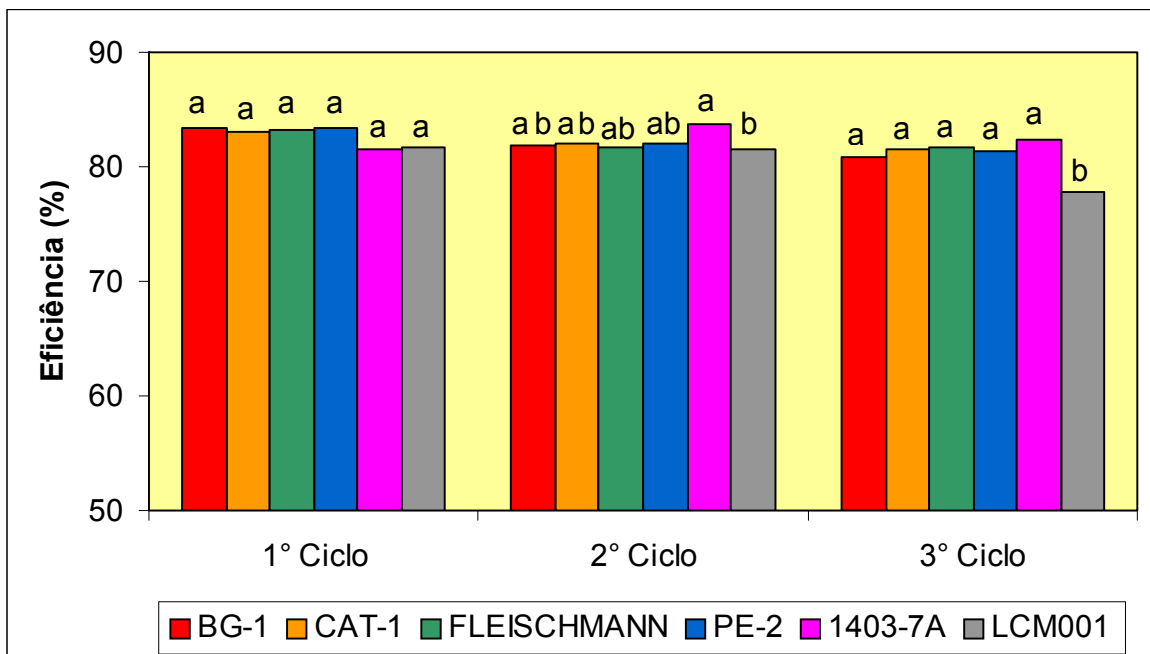


Figura 13 - Eficiência, expresso em porcentagem (v/v), das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.

Ao término do 1º ciclo, as leveduras BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2 produziram uma biomassa muito semelhante, porém a FLEISCHMANN difere estatisticamente ($p < 0,05$) da CAT-1 e PE-2, provavelmente devido a menor viabilidade inicial (Figuras 14 e 16). Por outro lado, as leveduras 1403-7A e LCM001, tiveram uma menor produção de biomassa durante todos os ciclos fermentativos e conseqüentemente, uma menor produção de glicerol. Weusthuis (1993), apud Badotti (2005), afirmou que devido ao requerimento energético para a captação direta do dissacarídeo, até 25% da energia produzida pela fermentação pode ser utilizada para este transporte. Este acontecimento pode ser explicado pela existência do co-transporte de íons H^+ acoplado a entrada de sacarose para dentro da célula mediado pela permease AGT1. O conseqüente desvio de ATP para a extrusão destes íons, têm como conseqüência, menor disponibilidade de ATP para a produção de biomassa e, conseqüentemente, menos glicerol é produzido. Com exceção dos 2º e 3º ciclos, a produção de glicerol foi maior, provavelmente para equilibrar a pressão osmótico intracelular com o meio, e notou-se uma ligeira queda na viabilidade celular (Figuras 15, 16 e 17). Mesmo com esta maior produção de glicerol e ligeira queda na viabilidade, a concentração de glicogênio e trealose destas leveduras foram significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparadas com as leveduras BG-1, FLEISCHMANN e PE-2 (Figuras 17, 18). A FLEISCHMANN foi a linhagem que apresentou maior queda na viabilidade celular no decorrer dos ciclos fermentativos, com pouco acúmulo de trealose e moderada formação de glicerol (Figuras 15, 16 e 18). Segundo Hohmann (1997), apud Alves (2000), existem duas isoformas da enzima que reduz a dihidroxiacetona-fosfato a glicerol: uma codificada pelo gene GPD1 (localizada no cromossomo IV), essencial para o crescimento da *S. cerevisiae* sob condições de estresse osmótico, e outra codificada pelo gene GPD2 (localizada no cromossomo XV), relacionada com o equilíbrio de redox celular. Alves (2000), analisou diferentes linhagens de *S. cerevisiae* e concluiu que dependendo das condições de estresse do meio, produzem diferentes quantidades de glicerol e este pode ser armazenado em seu citoplasma ou liberado para o meio.

De maneira geral, as leveduras BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2 tiveram uma produção em biomassa muito próxima no 2º ciclo fermentativo, não diferindo

estatisticamente entre si ($p < 0,05$). No 3º ciclo, somente a FLEISCHMANN, apresentou uma ligeira superioridade quando comparada com as outras leveduras (BG-1, CAT-1 e PE-2), diferindo estatisticamente destas (Figura 14).

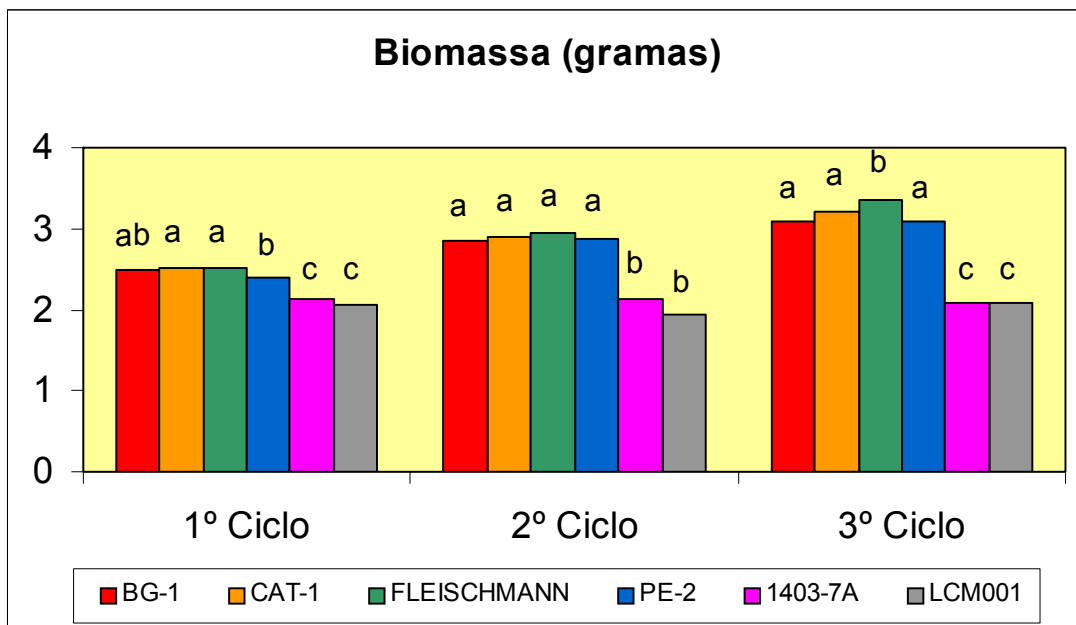


Figura 14 - Biomassa, expressa em gramas (massa úmida), das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância

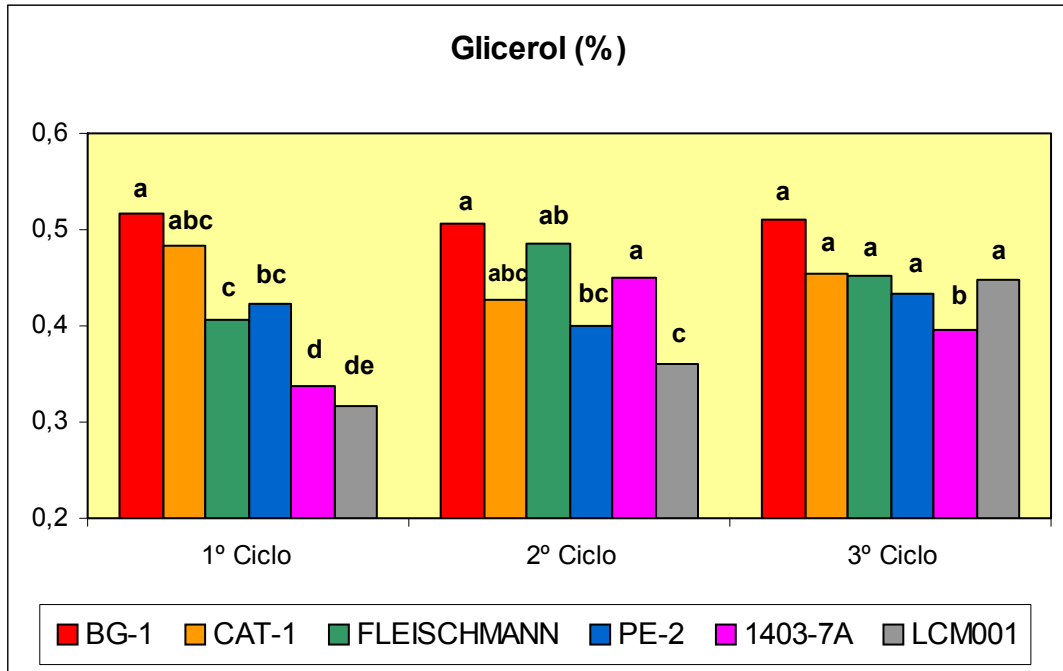


Figura 15 - Quantidade de Glicerol, expresso em porcentagem (p/v), das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.

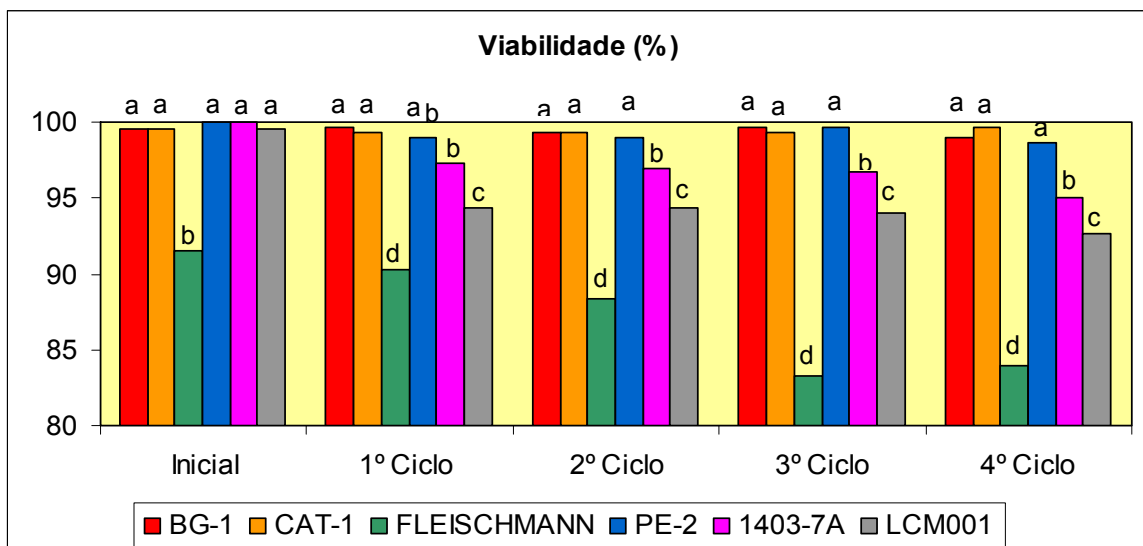


Figura 16 - Viabilidade celular, expressa em porcentagem (gramas de biomassa úmida/100mL), das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* ao longo de quatro ciclos fermentativos. Colunas dentro de um mesmo ciclo seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.

Como a produção em biomassa pelas leveduras BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2 foram muito semelhantes, era de se esperar uma produção de glicerol equivalente, no entanto, esta produção não está somente acoplada a produção de biomassa (balanço redox), mas também as condições de osmolaridade do meio (HOHMANN, 1997, apud ALVES, 2000), responsável pelo estresse osmótico e, ainda este pode ficar retido no citoplasma ou liberado para o meio. Desta maneira, um indicativo de condições de estresse, causado pela pressão osmótica do meio, pode ser a produção de glicerol, e a produção e consumo de trealose e glicogênio. Os dados obtidos neste trabalho, mostram que as leveduras BG-1, CAT-1 e PE-2 tiveram uma viabilidade constante no decorrer dos ciclos fermentativos, não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$), porém, a FLEISCHMANN teve ciclo a ciclo, queda na sua viabilidade, um baixo acúmulo de trealose (Figuras 16 e 18) e moderado acúmulo de glicogênio (Figura 17), mostrando-se afetada pelas condições do processo, não resistindo as condições de fermentação com reciclo de célula. Basso et al. (1993; 2004; 2005) estudaram a taxa de dominância e persistência no processo industrial de leveduras selecionadas como a BG-1, CAT-1, PE-2, entre outras, e de panificação como a FLEISCHMANN, por exemplo, concluindo que esta última não resiste as condições estressantes do processo industrial e, conseqüentemente, desaparece nas primeiras semanas de safra. Outro aspecto relevante desta linhagem é a alta atividade de invertase (Tabela 3), assim há rápida hidrólise da sacarose e conseqüente acúmulo de glicose e frutose no meio, aumentando a pressão osmótica e o estresse sofrido pela levedura (ALVES, 2000; BASSO; AMORIM, 1998a; MYERS et al., 1997). Muitos trabalhos tem apresentado uma relação inversa entre atividade de invertase e estresse osmótico, seja em meios fermentativos com 20% de sacarose, very-high-gravity (VHG) ou massas doces (ODA; OUCHI, 1990; TAKESHIGE; OUCHI, 1995b).

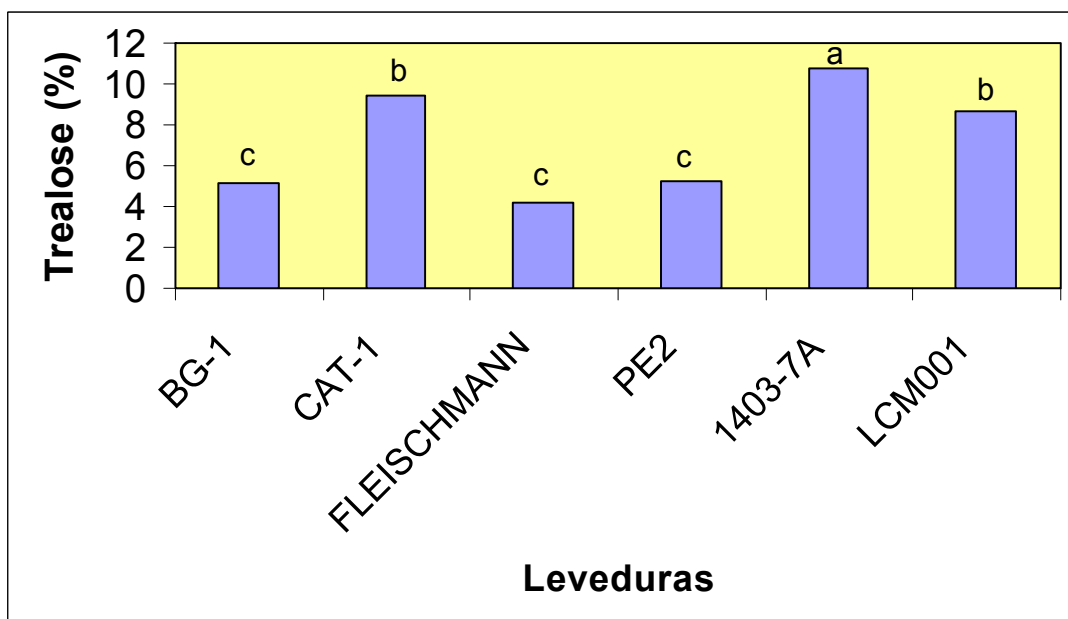


Figura 17 - Teor de trealose, expresso em gramas/100gramas de biomassa seca presente nas seis linhagens de levedura ao final do processo fermentativo. Colunas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.

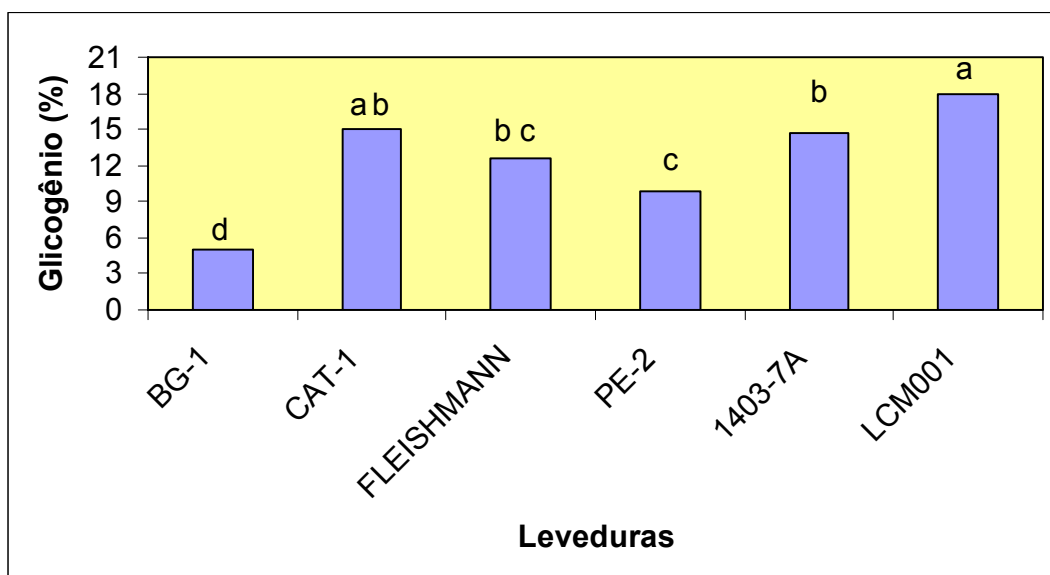


Figura 18 - Teor de glicogênio expresso em gramas/100gramas de biomassa seca presente nas seis linhagens de levedura ao final do processo fermentativo. Colunas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente a um nível de 5% de significância.

A levedura BG-1 apresentou produtividade média de glicerol (0,51g/100mL) contra 0,44g/100mL produzido pela FLEISCHMANN, no entanto, não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). A trealose final acumulada pela BG-1, foi de 5,19% e o glicogênio 5,08%, assim notou-se que o acúmulo de trealose foi tão baixo quanto o da FLEISCHMANN, porém o acúmulo de glicogênio foi significativamente menor quando comparado com esta levedura de panificação, que produziu 12,63g/100g_{biomassa} úmida (Tabela 10 – anexo A), aspecto muito desejável para leveduras utilizadas em panificação, pois o acúmulo de trealose e glicogênio auxiliam na manutenção da viabilidade celular por períodos de tempos prolongados. Um dos fatores que podem ter contribuído para esta produção de glicerol é a alta atividade de invertase apresentada por esta linhagem, que juntamente com a FLEISCHMANN, apresentaram a maior atividade de invertase dentre as leveduras estudadas (7,47 gART.h⁻¹g_{biomassa} para a BG-1 e 6,44 gART.h⁻¹g_{biomassa} para a FLEISCHMANN) (Tabela 3) e, conseqüentemente, pode ter sido afetado pelo aumento da pressão osmótica, devido ao aumento de monossacarídeos no meio (BASSO; AMORIM, 1998a; MYERS et al., 1997). Apesar do ensaio fermentativo ser realizado em apenas três ciclos fermentativos, verificou-se que a viabilidade da BG-1, manteve-se sempre superior ao da FLEISCHMANN e com um alto rendimento (Figuras 13 e 16), resistindo a possíveis condições estressantes do meio conforme descrito por Basso et al. (1993); Basso et al. (2004); Basso et al. (2005).

A PE-2 apresentou uma viabilidade muito semelhante ao da BG-1, porém, com desempenho ligeiramente superior, quanto a menor produção de glicerol (0,41g/100mL), quantidade semelhante de trealose (5,22%), e maior acúmulo de glicogênio (9,88%) (Tabela 13 - anexo A). No entanto, o rendimento fermentativo e a eficiência não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$). A PE-2, dentre as leveduras estudadas, apresentou a menor atividade de invertase (2,5 gART.h⁻¹g_{biomassa}) (Tabela 3), e isto pode ter contribuído com a menor produção de glicerol ligada ao estresse osmótico.

A CAT-1, também apresentou uma viabilidade semelhante a BG-1 e a PE-2 (Figura 16), com produção de glicerol intermediária entre as leveduras estudadas. Tanto o rendimento, quanto a eficiência fermentativa, foram semelhantes às demais leveduras (Figuras 12 e 13). Já a produção de trealose, foi somente inferior ao da

linhagem 1403-7A, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das linhagens BG-1, FLEISCHMANN e PE-2 (Figura 16, Tabela 19 – anexo B), enquanto a produção de glicogênio apresentou-se semelhante a FLEISCHMANN, 1403-7A e LCM001, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 17, Tabela 20 – anexo B). Quanto a atividade de invertase (Tabela 3), notou-se que a CAT-1 apresentou uma atividade intermediária ($3,89 \text{ gART.h}^{-1}\text{g}_{\text{biomassa}}$) entre a levedura FLEISCHMANN e PE-2.

Dentre as leveduras com transportador de sacarose, a 1403-7A foi a que apresentou melhor desempenho fermentativo. No 1º ciclo, seu rendimento foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) às demais linhagens, com exceção da LCM001. A partir do 2º ciclo, esta linhagem mostrou-se mais adaptada ao meio e, surpreendentemente, apresentou rendimento semelhante e eficiência fermentativa superior às leveduras BG-1, CAT-1 e PE-2 (Figuras 12 e 13). A produção de biomassa foi estatisticamente menor em relação às linhagens citadas anteriormente, assim como a biomassa produzida pela LCM001 (Figura 14), possivelmente, devido ao maior desvio de ATP para a entrada de sacarose diretamente para o citoplasma celular mediada pela permease AGT1.

Os dados apresentados nas Figuras 15, 16, 17 e 18, mostram que as duas linhagens com transportador de sacarose (1403-7A e LCM001), apresentaram-se adaptadas às condições de fermentação, pois levando em consideração o parâmetro glicerol, produziram a menor quantidade ($0,39$ e $0,37 \text{ gART.h}^{-1}\text{g}_{\text{biomassa}}$) dentre as leveduras estudadas (Tabela 10 – anexo A), apresentando o maior acúmulo de trealose ($10,78$ e $8,64\%$) e glicogênio ($14,77$ e $17,85\%$) (Tabela 13 – anexo A). Por outro lado, estas duas linhagens tiveram problema quanto a viabilidade celular, pois apresentaram queda a cada ciclo (Figura 16), consequência da não reposição de biomassa celular no decorrer dos ciclos fermentativos (Figura 14). Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho durante o ensaio de crescimento em diferentes meios de crescimento, e dos resultados obtidos por Badotti (2005), as duas linhagens de leveduras com transportador de sacarose apresentaram o mesmo rendimento em biomassa, no entanto, a produção de etanol da LCM001 foi ~50% inferior ao da 1403-7A (Tabela 10 – anexo A). Leveduras com alta capacidade de rendimento em biomassa a partir da sacarose são extremamente úteis na produção de leveduras de panificação (BADOTTI,

2005), principalmente se apresentarem capacidade de armazenar açúcares de reserva como glicogênio e agentes protetores como a trealose, fatores que mantêm a viabilidade celular durante o período de armazenamento (SUOMALAINEN; PFAFFLI, 1961), contribuindo com a sobrevivência das células (LILLIE; PRINGLE 1980). O acúmulo de trealose, ocorre com estímulo de um agente estressante dependente do tempo de exposição (ALCARDE; BASSO, 1997), porém quando mantidas em condições estressantes, como elevadas temperaturas, apresentam queda em sua concentração (CHERUBIN, 2003). Alcarde e Basso (1997) estudaram o acúmulo da trealose endógena pelas leveduras em anaerobiose, e verificaram que leveduras com maior acúmulo deste carboidrato, tiveram aumento significativo na manutenção da viabilidade após liofilização. Por outro lado em processos fermentativos industriais, é de grande interesse a degradação de trealose e glicogênio quando “sangra” o fermento para a produção de ração animal, pois resulta em álcool excedente e ao mesmo tempo permite aumento relativo no teor da proteína da levedura, valorizando tal subproduto. Paulillo (2001), estudou a mobilização do glicogênio e trealose endógeno de leveduras industriais e verificou que leveduras mantidas a 40 °C por 48 horas tiveram a maior parte destes carboidratos metabolizados em 24 horas. Quanto ao acúmulo de trealose pelas linhagens estudadas, observou-se que a quantidade de trealose produzida, está dentro da média obtida em muitos trabalhos, seja em condições de estresse, produção de cachaça e fermentação alcoólica (ALCARDE; BASSO, 1997; GUTIERREZ, 1990; MANSURE et al., 1997; PATARO et al., 2002). Panek e Mattoon (1977) observaram que em condições de depleção de glicogênio no meio, as células de leveduras entram numa breve fase de crescimento retardado referido como diauxia, onde muitas enzimas precisam ser ativadas ou sintetizadas, ocorrendo o acúmulo de trealose. As leveduras com transportador de sacarose podem ter apresentados o maior acúmulo de trealose devido ao prévio consumo de glicose e conseqüente depleção deste.

O 4º e último ciclo, destinado somente a análise da cinética de metabolização de açúcares, em condições semelhantes as de fermentação alcoólica industrial, mostrou que a velocidade de hidrólise da sacarose pelas diferentes linhagens de leveduras estão condizentes com os resultados obtidos no ensaio de determinação da atividade de invertase (Tabela 3), ou seja, as leveduras BG-1 e FLEISCHMANN apresentaram as

maiores velocidades de hidrólise da sacarose, verificando um maior acúmulo de frutose quando comparado com a CAT-1 e PE-2 (Figuras 18, 19, 20 e 21, Tabela 12 – anexo A). No entanto, a FLEISCHMANN apresentou maior acúmulo de frutose (2,36 g/100mL) e glicose (0,68 g/100mL) em relação a BG-1, com formação de 0,81 e 0,10 g/100mL de frutose e glicose, respectivamente. Este maior acúmulo de frutose e glicose por parte da FLEISCHMANN é devido a menor velocidade de consumo destes açúcares em relação à alta atividade de invertase, assim a rápida hidrólise da sacarose associada a menor velocidade de consumo dos monossacarídeos formados pela linhagem FLEISCHMANN pode ser responsável pelo aumento da pressão osmótica do meio. Como a FLEISCHMANN, a BG-1 também apresentou uma alta atividade de invertase, porém, a velocidade de consumo dos monossacarídeos formados é muito superior, fazendo com que ocorra menor acúmulo de monossacarídeos no meio. Verificou-se que após duas horas de ensaio havia um total de 0,91g de monossacarídeos no meio fermentado pela BG-1 enquanto o meio da FLEISCHMANN era composto por 3,04g, assim, a BG-1 poderia ter sofrido menos estresse, contribuindo com o melhor desempenho apresentado por esta linhagem em condições de fermentação alcoólica industrial (BASSO et al., 1993; BASSO et al., 2004; BASSO et al., 2005).

Neste ensaio, notou-se que para as leveduras BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2 as quatro primeiras horas da fermentação foram responsáveis por todos os acontecimentos, tais como hidrólise da sacarose, velocidade de consumo dos monossacarídeos formados e formação de glicerol, e, conseqüentemente foram responsáveis por direcionar o desempenho de cada linhagem estudada (Figuras 19, 20, 21 e 22).

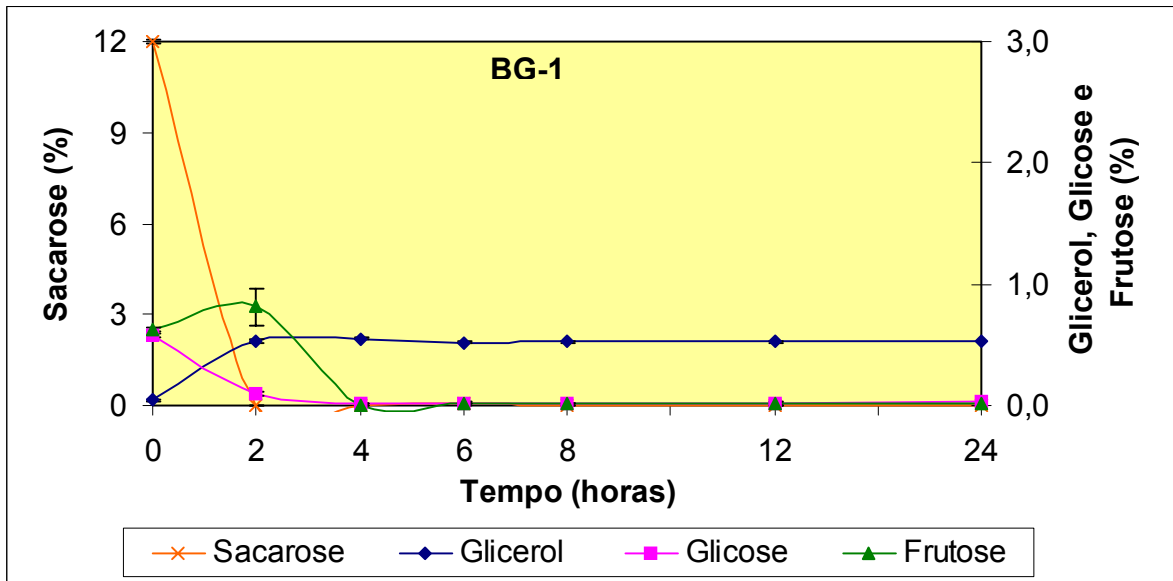


Figura 19 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura BG-1 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação a média obtidos pelo teste de Tukey.

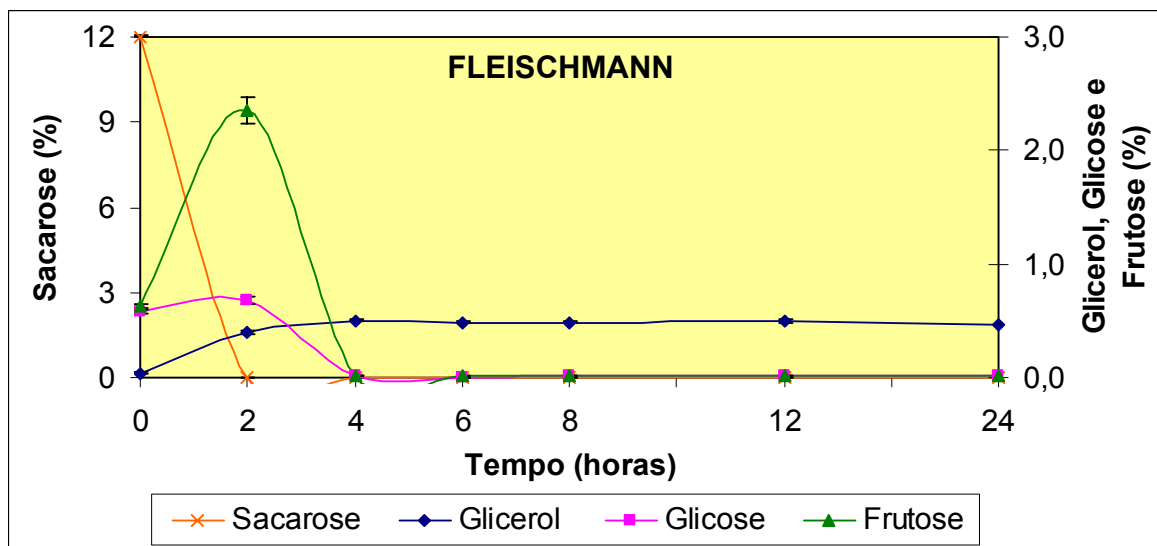


Figura 20 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura FLEISCHMANN durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação a média obtidos pelo teste de Tukey.

As leveduras CAT-1 e PE-2, apresentaram uma cinética de metabolização e consumo de sacarose, glicose e frutose um pouco diferente. As Figuras 21 e 22 mostram uma velocidade de hidrólise da sacarose um pouco mais lenta em relação a BG-1 e FLEISCHMANN (Figuras 19 e 20); enquanto estas duas últimas hidrolisaram toda a sacarose nas 2 primeiras horas da fermentação, a CAT-1 hidrolisou em 3 horas, e a PE-2 em quatro horas, apresentando assim, atividade de invertase inferior a BG-1 e FLEISCHMANN, confirmando os dados apresentados na tabela 3. As Figuras 21 e 22 e a Tabela 12 – anexo A, mostram que a CAT-1, além de possuir uma alta velocidade de hidrólise de sacarose, possui uma maior velocidade de metabolização dos monossacarídeos formados, pois, após duas horas de fermentação a quantidade de glicose e frutose presentes no meio era maior para a PE-2 (0,39 g/100mL) contra 0,18g/100mL da CAT-1. No entanto, as duas leveduras apresentaram uma velocidade de consumo de monossacarídeos superior ao da hidrólise de sacarose, devido a ausência de acúmulo de glicose ou frutose como os observados pelas leveduras BG-1 e FLEISCHMANN . Após três horas de fermentação, praticamente todo o açúcar presente no meio já havia sido consumido pela CAT-1, enquanto a PE-2, consumiu em quatro horas.¹

Dentre as 4 linhagens com atividade de invertase estudadas, a CAT-1 foi a que apresentou atividade intermediária entre as linhagens selecionadas de processos fermentativos industriais. A cada ano esta linhagem vem surpreendendo os pesquisadores da área de fermentação alcoólica industrial (Godoy²). Basso (2006), mostrou a capacidade desta linhagem se manter em suspensão no meio fermentativo sem flocular quando na presença de *Lactobacillus* FT432B e FT421B, enquanto as linhagens BG-1 e PE-2 apresentaram taxa de floculação semelhante. Esta linhagem também apresentou bom desempenho quando utilizada na produção de Scotch Whisky (AMORIM - NETO, 2005). No entanto, não foi possível verificar a presença de transportador de sacarose à partir da análise do perfil de metabolização de açúcares no mosto, semelhantemente ao ensaio efetuado por Mwesigye e Barford (1996). A verificação da presença de transportador de sacarose pela análise do perfil metabólico

² Godoy, A. Fermentec Ltda, Piracicaba.

só é possível em condições oxidativas em que a glicose exerce repressão sobre a produção de invertase, ou possivelmente em mostos com elevadas concentrações de monossacarídeos. A maior parte dos trabalhos que estudam este mecanismo de transporte da sacarose fazem um crescimento prévio das células em meios de maltose ou sacarose por até 12 dias, assim em condições de fermentação alcoólica com reciclo de células seja em laboratório ou em larga escala (produção de cachaça, álcool neutro ou carburante) seria complicado realizar esta adaptação, pois a cada novo ciclo haveria a necessidade de realizar esta adaptação.

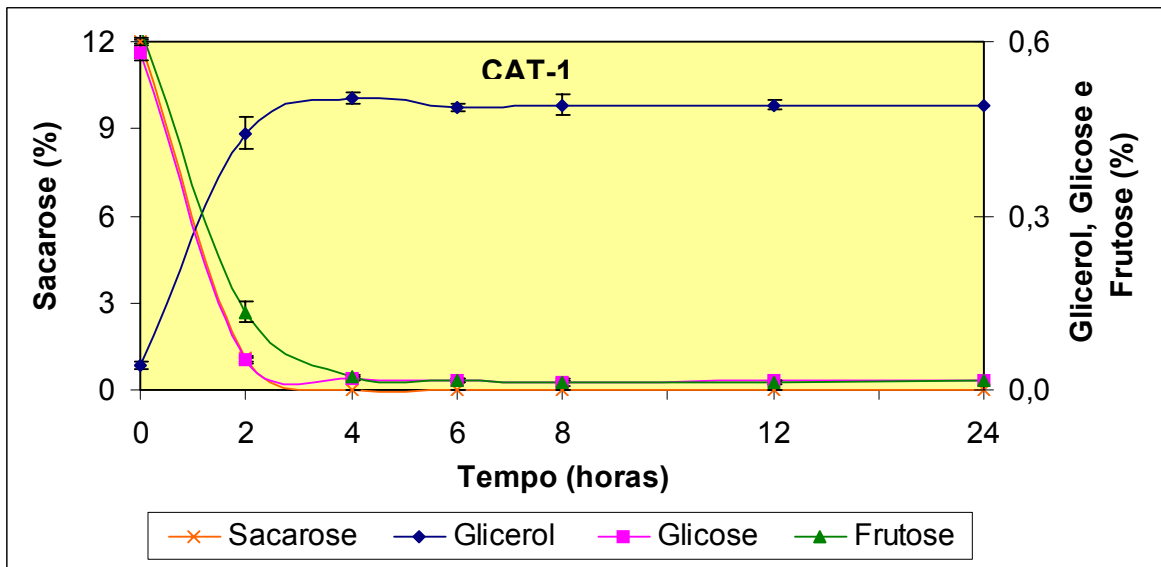


Figura 21 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura CAT-1 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação a média obtidos pelo teste de Tukey.

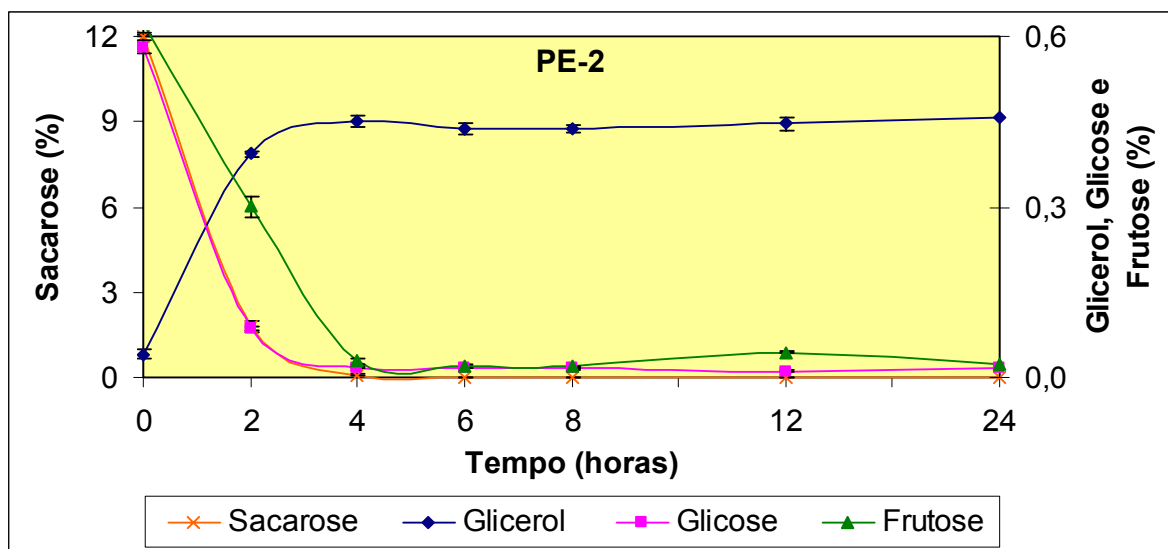


Figura 22 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura PE-2 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação a média obtidos pelo teste de Tukey.

As leveduras 1403-7A e LCM001, por não apresentarem atividade de invertase, e serem capazes de crescer e fermentar a sacarose (BADOTTI et al., 2004), apresentaram uma cinética de consumo e metabolização de açúcares bem distinta das demais linhagens estudadas (Figuras 19 a 24).

A levedura 1403-7A, assim com a LCM001, consumiram praticamente toda a glicose e frutose presentes no mosto em 2 horas, porém por algum motivo desconhecido a partir das 3 horas de fermentação houve aparentemente uma ligeira inversão da sacarose devido a formação de frutose no meio fermentado pela LCM001, e como esta levedura não apresenta atividade de invertase (BADOTTI et al., 2004) (Tabela 3), o único motivo para tal acontecimento pode ter sido uma contaminação no mosto.

Embora tenha ocorrido esta pequena formação de frutose no meio, notou-se que a velocidade de consumo da sacarose foi inferior ao apresentado pela 1403-7A (Figuras 23 e 24), diferentemente do comportamento apresentado por estas linhagens quando em meio de crescimento (Figuras 9 e 10), onde a glicose exerce repressão sobre os transportadores de α -glicosídeos (permeases específicas) (LAGUNAS, 1993; STAMBUK et al., 1998, apud STAMBUK; DE ARAÚJO, 1999). Observou-se que em condições de fermentação, isto não ocorre, ou seja, a glicose não exerce repressão sobre as permeases de α -glicosídeos.

O desempenho apresentado por estas duas leveduras foi semelhante quanto a cinética de metabolização de açúcares, no entanto, apresentaram rendimentos diferentes (Figura 12). Ambas leveduras consumiram a glicose e frutose com velocidade superior ao consumo da sacarose e, após redução destes monossacarídeos no meio, a sacarose passou a ser consumida com maior velocidade, porém, a levedura 1403-7A consumiu toda a sacarose em 24 horas de fermentação, enquanto a LCM001 apresentou tempo superior a 24 horas, com maior produção de glicerol em relação a linhagem 1403-7A (44%) (Figuras 23 e 24, Tabela 10 – anexo A).

Embora a linhagem 1403-7A e LCM001 tenham apresentados altas eficiências fermentativas, o tempo de fermentação foi muito superior, inviabilizando sua aplicação no processo industrial de produção de álcool. A LCM001, além de apresentar um elevado tempo para a fermentação da sacarose, apresentou um rendimento

fermentativo muito inferior ao das demais linhagens estudadas, com baixa produção de biomassa durante os ciclos fermentativos, e conseqüente queda na viabilidade celular (Figuras 12, 14 e 16).

Atualmente, com o aumento da produção de álcool carburante, influenciado pelo alto preço no mercado, muitas indústrias vêm aumentando seus investimentos no setor sucro-alcooleiro, e muitos grupos vêm construindo novas usinas. Neste segmento industrial, a água desempenha um papel fundamental, tanto para o preparo do mosto, como para o resfriamento de dornas, cubas, entre outros. Devido ao alto consumo deste insumo, bem como leis que passarão a taxar as águas retiradas de mananciais, vêm-se procurando diminuir e racionalizar o uso desta.

Um outro problema grave é a formação de um sub-produto, conhecido popularmente como vinhaça. Utilizado como fertilizante natural, não pode ser liberado em rios, pois aumenta a DBO (demanda bioquímica de oxigênio), causando desequilíbrios ambientais.

Para diminuir o uso da água e a formação de vinhaça, novos estudos vêm sendo desenvolvidos (AMORIM ; GOMES, 2006). No que diz respeito ao processo fermentativo, uma alternativa seria aumentar o teor alcoólico na dorna, para diminuir o volume de vinhaça. Entretanto, o aumento do teor alcoólico produz mais calor, assim deve-se controlar esta temperatura, pois o alto teor alcoólico diminui a taxa de multiplicação da levedura (ERASMUS et al., 2003), conseqüentemente menos açúcar é desviado para a produção de biomassa, podendo obter um incremento no rendimento fermentativo, com menor produção de vinhaça. Park ; Sato (1982), trabalhando com pH 3.5 e temperatura de 40 °C, obtiveram uma viabilidade celular de 48,9%, inviabilizando o processo fermentativo. Amorim e Gomes (2006), estudaram as linhagens selecionadas industrialmente como BG-1, CAT-1 e PE-2, em mosto com até 17% de teor alcoólico, concluindo que para fermentação com elevados teores alcoólicos deve-se trabalhar com rigoroso controle de temperatura (27 °C), fazer o acompanhamento da viabilidade celular e otimizar o tempo de fermentação. Laluce et al. (1991), estudaram linhagens de *Saccharomyces* selecionadas à alta temperatura, fermentando com diversos teores alcoólicos (5,7 - 14,7%), porém a viabilidade final mostrou-se

comprometida quando as leveduras permaneceram 12 horas em contato com teores alcoólicos de 14%.

Por outro lado, meios VHG (very high gravity), ou seja, com teores de açúcar superiores a 25 - 30%, apresentam alta pressão osmótica, e dependendo da atividade de invertase, podem aumentar ainda mais esta pressão (MYERS et al., 1997; TAKESHIGE; OUCHI, 1995a; TAKESHIGE; OUCHI, 1995b). Myers et al. (1997), verificaram que leveduras com atividade de invertase < 5 U/mg proteína, apresentaram alta performance fermentativa, porém, não foi dependente somente da atividade de invertase, mas também da linhagem de levedura e da produção e retenção intracelular de glicerol, semelhantemente à conclusão de ALVES, 2000). Oda e Ouchi (1990) também relataram que o mais eficiente método para manter a viabilidade celular e, conseqüentemente, apresentar uma boa eficiência fermentativa, foi a capacidade das células tornarem-se osmotolerantes, e não somente a redução na atividade de invertase. Takeshige e Ouchi (1995b), estudando fermentação alcoólica com mostos a base de sacarose ou melaço, com até 31,6% de ART, verificaram que há uma correlação inversa entre atividade de invertase e eficiência fermentativa quando se adicionou invertase comercial. Assim, eles concluem que deve haver uma relação ideal entre atividade de invertase e suplementação dos produtos da hidrólise da sacarose para que não ocorra um choque osmótico.

Finalizando, verificou-se que neste contexto descrito anteriormente, as linhagens selecionadas industrialmente (CAT-1 e PE-2) são as mais indicadas para a realização de ensaios em mosto com altas concentrações de açúcares, por apresentarem uma atividade de invertase intermediária entre as demais linhagens e, possivelmente, sofrerem menor estresse osmótico. As linhagens com transportador de sacarose também se fazem úteis, especialmente quando sem a atividade de invertase. Nestas condições, possivelmente sofrem menos estresse osmótico, podendo ainda, produzir uma elevada concentração de glicogênio e trealose (agente de reserva e proteção celular, respectivamente).

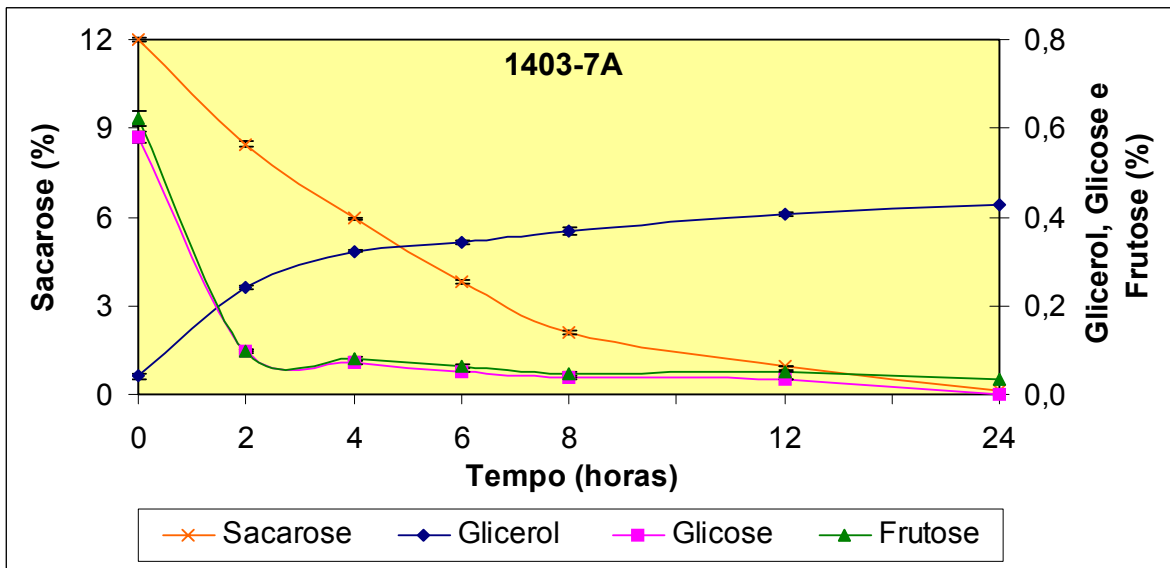


Figura 23 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura 1403-7A durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação a média obtidos pelo teste de Tukey.

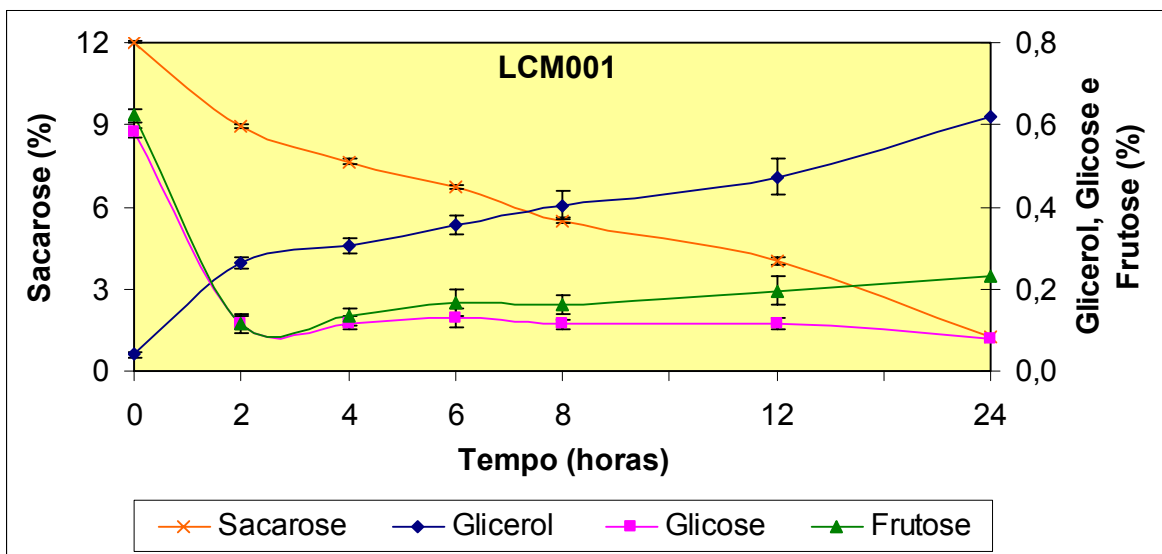


Figura 24 - Perfil de metabolização de açúcares e formação de glicerol pela levedura LCM001 durante o 4º ciclo fermentativo com duração de 24 horas, e seus respectivos desvios padrões em relação a média obtidos pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

- A atividade de invertase detectada nas *S. cerevisiae* estudadas fora dependente da linhagem.
- A maior parte da atividade de invertase está associada a célula de levedura, seja no espaço periplasmático, ou na parede celular.
- O mosto fermentado (vinho de levedurado) contribui com a menor fração da atividade de invertase apresentada pelas linhagens estudadas.
- Nos meios de crescimento, as leveduras BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN e PE-2 apresentaram desempenhos semelhantes quanto a metabolização de açúcares e formação de biomassa, em 24 horas de crescimento. As leveduras 1403-7A e a LCM001 também apresentaram um bom desempenho, porém em um tempo muito elevado (79 horas).
- Em todos os meios de crescimento com presença ou formação de glicose, esta é preferencialmente consumida, e posteriormente a frutose.
- A simples análise do perfil de metabolização de açúcares não permitiu a diferenciação de linhagens selecionadas industrialmente quanto à presença de transportador de sacarose.
- As quatro primeiras horas de fermentação são responsáveis por todos os acontecimentos, tais como: hidrólise da sacarose, consumo dos monossacarídeos formados e formação de glicerol e, conseqüentemente, direcionam o desempenho de cada linhagem, exceção feita as linhagens com transportador de sacarose
- Todas as linhagens estudadas, exceção a LCM001, apresentaram um bom desempenho fermentativo.

- As linhagens com transportador de sacarose apresentaram uma boa eficiência, no entanto, o tempo de fermentação foi muito elevado.
- Linhagens com transportador de sacarose produzem menos biomassa durante o processo fermentativo devido ao metabolismo oxidativo mesmo em condições de fermentação.

REFERÊNCIAS

AHLFELD, H.; BERG, C. Ethanol industry sees record production in November. **F.O.Lichts: World Ethanol & Biofuels Report**, Ratzeburg, v.4, n.10, 2006. p.238.

ALCARDE, A.R; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade celular de células de leveduras desidratadas pelo processo de liofilização. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.54, n.3, p. 189-194, 1997.

ALMEIDA CUNHA, B.C.; VITOLO, M. Effect of viscosity on sucrose hydrolysis catalyzed by invertase obtained from *S. cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p.811-813, 1984.

ALVARADO, E.; BALLOU, L.; HERNANDEZ, L.M.; BALLOU, C.E. Localization of alfa-1,3 mannosés in the N-linked oligossaccharides of *S. cerevisiae* mutants. **Biochemistry**, Washington, v.29, n.10, p.2471-2482, 1990.

ALVES, D. M. G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica**. 2000. 118p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2000.

AMORIM, H.V. **O futuro da fermentação**. Piracicaba: Fermentec, 2006. 8p.

AMORIM, H.V.; GOMES, J.R.L. Fermentando com até 17% de teor alcoólico. In: REUNIÃO ANUAL FERMENTEC, 27., 2006, São Pedro. **Anais...** Piracicaba: Fermentec, 2006. p.14.

AMORIM - NETO, H.B. **Application of novel yeast strains to the scotch whisky fermentation process.** 2005. 65p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – University of Abertay Dundee – Edinburg, 2005.

ARRUDA, L.; VITOLLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.81, p.23-33, 1999.

BADOTTI, F. **Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2005. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

BADOTTI, F.; BATISTA, A.S.; STAMBUK, B.U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n.5, p.119-127, 2004.

BARFORD, J.P.; PHILLIPS, P.J.; PRLOWSKI, J.H. A new model of uptake of multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v.7, parte 2, p.297-302, 1992.

BARROS, D. P. **Imobilização da invertase em quitina de Krill (*Euphasia superba*).** 1990. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

BASSO, L.C. Floculação de leveduras: novas descobertas. In: REUNIÃO ANUAL FERMENTEC, 27., 2006, São Pedro. **Anais...** Piracicaba: Fermentec, 2006. p.4.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Estudo comparativo de leveduras industriais quanto ao desempenho fermentativo e hidrólise da sacarose. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**, Piracicaba, n.18, p.125-137, 1998a.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Fermentação da trealose e glicogênio endógenos empregando-se as leveduras PE-2, VR-1 e TA. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**, Piracicaba, n.18, p.106-137114, 1998b.

BASSO, L.C.; LOPES, M.L.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; DALLAQUA, M. Estudo comparativo entre diferentes leveduras. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**, Piracicaba, n.14, p.71-113, 1994.

_____. Estudo comparativo de leveduras isoladas do processo industrial. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**, Piracicaba, n.15, p.57-106, 1995.

_____. Permanência das leveduras no transcorrer da safra 2003/2004. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**, Piracicaba, n.24, p.1-8, 2004.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.D.; CAMPOS, A.D.; GALLO, C.R. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica de cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., 1993, Águas de São Pedro. **Anais...** Piracicaba: STAB, 1993. p.246-250.

BASSO, L.C.; LOPES, M.L.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LUCATTI, L.; DALLAQUA, M.; COSTA, V.M. Dinâmica populacional de leveduras no transcorrer da safra 2004/2005. **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**, Piracicaba, n.25, p.1-10, 2005.

BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Norwich, v.8, p.26-33, 2004.

BERG, C. **World fuel ethanol** – analysis and outlook. Disponível em: <http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>. Acesso em : 3 Jan. 2006.

BOKASSA, I.P.; KRASTANOV, A.I.; ROCHKOVA, Z.; ANGELOV, A. Biosynthesis of invertase by *Saccharomyces cerevisiae* with sugarcane molasses as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.9, n.6, p.662-663, 1993.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5'ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, Cambridge, v.28, p.145-154, 1982.

CARVALHO, S.,C. **Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica**. 2001. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

CHAIRMAN, B.L, . **Ethanol industry outlook 2005**, Renewable Fuels Association. Disponível em: http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/outlook_2005.pdf. Acesso em : 3 Abr. 2006.

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DYNESEN, J.; SMITS, H.P.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose and mannose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.50, p.579-582, 1998.

ECHEGARAY, O.F.; CARVALHO, J.C.M.; FERNANDES, A.N.R.; SATO,S.; AQUARONE, E.; VITOLLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugarcane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass & Bioenergy**, London, v.19, p.39-50, 2000.

ERASMUS, J.D.; VAN-DER-MERWE, K.G.; VAN-VUUREN, H.J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **Fems Yeast Research**, Utrecht, v.3, p.375-399, 2003.

FONSECA, G.G.; GOMBERT, A.K. Kinetics of growth and metabolite formation by *Kluveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugars. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15., 2005, Recife. **Anais...** Recife: SINA Ferm, 2005. 1 CD-ROM.

FONTANA, A.; GHOMMIDH, C.; GUIRAUD, J.P.; NAVARRO, J.M. Continuous alcoholic fermentation of sucrose using flocculating yeast: The limits of invertase activity. **Biotechnology Letters**, New York, v.14, p.505-510, 1992.

FRISS, J.; OTTOLENGHI, P. Localization of invertase in a strain of yeast. In: ORLOWSKI, J.H.; BARFORD, J.P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, Curitiba, v.37, p.215-218, 1991.

GASCÓN, S.; NEUMANN, N.P.; LAMPEN, J.O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.243, n.7, p.1573-1577, 1968.

GIANFREDA RAO, L.M.A.; VIOLANTE, A. Interactions of invertase with tannic acid, hydroxy-aluminium (OH-Al) species or montmorillonite. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.25, n.6, p.671-677, 1993.

GOMES, F.P. **Estatística experimental**. 13.ed. São Paulo: Nobel, 468p. 1990.

GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v.47, n.2, p.597-609, 1990.

GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, n.48, p.55-69, 1991.

GUTIERREZ, L.E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, 1997. 270p.

HERBERTS, A. R. **Transporte ativo de α -glicosídeos: uma metodologia para avaliar a vitalidade de leveduras cervejeiras**. 2006. 62p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HERWING, C.; DOERRIES, C.; MARISON, I.; VON-STOCKAR, U. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.76, n.3, p.247-258, 2001.

KISO, T.; HAMAYASU, K.; FUJITA, K.; HARA, K.; KITAHATA, S.; NAKANO, H. Inhibition of β -fructofuranosidases and α -glucosidases by synthetic thiofructofuranoside. **Bioscience and Biotechnological Biochemistry**, Bradford, v.67, n.8, p.1719-1724, 2003.

LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, R.C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.37, p.528-536, 1991.

LEILOIR, L.F.; CABIB, E. The enzymic synthesis of trehalose phosphate. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.75, p.5445-5446, 1953.

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

MANSURE, J.J.; SOUZA, R.C.; PANEK, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, Kew, v.19, n.12, p.1201-1203, 1997.

MWESIGYE, P.K.; BARFORD, J.P. Transport of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v.77, p.687-690, 1994.

MWESIGYE, P.K.; BARFORD, J.P. Batch growth and transport kinetics of utilization of mixtures of sucrose and maltose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v.82, p.101-108, 1996.

MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.M.; ATTFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p.145-150, 1997.

NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S.; SANCHO, E.D.; KORHOLA, M.P. Polymeric SUC genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v.135, p.31-35, 1996.

NEUMANN, N.P.; LAMPEN, J.O. Purification and properties of yeast invertase. **Biochemistry**, Moscow, v.6, p.468-475, 1967.

ODA, Y.; OUCHI, K. Effect of invertase activity on the leavening ability of yeast in sweet dough. **Food Microbiology**, London, v.7, p.241-248, 1990.

OLIVEIRA, A.J.; GALO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; GARCIA, C.E. **Curso de treinamento em microbiologia**, Piracicaba: FERMENTEC; ESALQ, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1996. 37p.

ORLOWSKI, J.H.; BARFORD, J.P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, Curitiba, v.37, p.215-218, 1991.

OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, London, v.12, p.644-651, 1977.

OZCAN, S.; VALLIER, L.G.; FLICK, J.S.; CARLSON, M.; JOHNSTON, M. Expression of the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. **Yeast**, Chichester, v.13, p.127-137, 1997.

PANEK, A.D. Trehalose metabolism and its role in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, London, v.3, p.121-130, 1985.

PANEK, A.D.; MATTOON, J.R. Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relationship between catabolite repression, trehalose synthesis and mitochondrial development. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.183, p.306-316, 1977.

PARK, Y.K.; SATO, H.H. Fungal invertase as an aid for fermentation of cane molasses into ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.44, n.4, p.988-989, 1982.

PATARO, C; GUERRA, J.B.; GOMES, F.C.O.; NEVES, M.J.; PIMENTEL, P.F.; ROSA, C.A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 H fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian Cachaça. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p.202-208, 2002.

PATKAR, A.; SEO, J.H.; Fermentation kinetics of recombinant yeast in batch and fed-batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.40, p.103-109, 1992.

PAULILLO, S.C.L. **Mobilização do glicogênio e trealose endógenos de leveduras industriais**. 2001. 83p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimento) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2001.

PERLMAN, D.; HALVORSON, H., O. Distinct repressible mRNAs for cytoplasmatic and secreted yeast invertase are encoded by a single gene. **Cell**, Cambridge, v.25, n.2, p.525-536, 1981.

PRODUÇÃO de cana de açúcar e álcool – Brasil. Datagro – **Boletim Informativo Quinzenal**, São Paulo, n.2, p.1-14, 2006.

REDDY, A.; JOHNSON, R.S.; BIEMANN, K.; WILLIAMS, R.S.; ZIEGLER, F.D.; TRIMBLE, R.B.; MALEY, F. Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.263, n.15, p.6978-6985, 1988.

REDDY, A.; MACCOLL, R.; MALEY, F.. Effect of oligosaccharides and chloride on the oligomeric structures of external, internal and deglycosylated invertase. **Biochemistry**, Moscow, v.29, n.10, p.2482-2487, 1990.

RIBEIRO, R.R. **Copolímeros de enxerto de microestrutura controlada para imobilização da invertase**. 2002. 122p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ROITSCH. T. Invertases and life beyond sucrose cleavage. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.5, n.2, p.47-48, 2000.

ROMANO, A.H. Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.4, p.207-231, 1986.

ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The Yeasts**: physiology and biochemistry of yeast. London: Academic Press, 1971. v.2, 475p.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. São Paulo: Legis Summa, 2004. 416p.

SANTOS, E.; RODRIGUEZ, L.; ELORZA, M.V.; SENTANDREAU, R. Uptake of sucrose by *S. cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.216, n.2, p.652-660, 1982.

SAS INSTITUTE INC. **SAS** : application's guide. Cary, 2002/2003.

SILVA, D.P. **Obtenção das enzimas hexoquinase e glucose 6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae***. 2000. 165p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BOM, E.P.S. Assay for in vivo yeast invertase activity using NaF. **Analytical Biochemistry**, New York, v.238, p.26-28, 1996.

SOMOGYI, N. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.37, n.6, p.1186-1192, 1945.

STAMBUK, B.U.; DA SILVA, M.A.; PANEK, A.D.; DE ARAÚJO, P.S. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.170, p.105-110, 1999.

STAMBUK, B.U.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active α -glucoside transport by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Utrecht, v.1, p.73-78, 2001.

STAMBUK, B.U.; DE ARAÚJO, P.; PANEK, A.D.; SERRANO, R. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.237, p.876-881, 1996.

STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.89, p.212-214, 2000.

SUOMALAINEN, H.; PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.67, p.249-254, 1961.

TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Factors Affecting the ethanol productivity of Yeast in molasses. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v.79, n.5, p.5, p.449-452, 1995a.

TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v.79, n.5, p.513-515, 1995b.

THEVELEIN, J.M. Regulation of energy metabolization in fungi. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.48, p.42-59, 1984.

TREVELYAN, W.E.; HARRINSON, J.S. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, London, v.62, p.177-183, 1956a.

TREVELYAN, W.E.; HARRINSON, J.S. Studies on yeast metabolism. 7. Yeast carbohydrate fraction. Separation from nucleic acid analysis and behavior during anaerobic fermentation. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, London, v.63, n. 2. p.23-33, 1956b.

VIEIRA, M. Novas variedades de cana melhoram produção de açúcar e álcool. Disponível em: <http://www.comciencia.br/comciencia/?section=3¬icia=89>. Acesso em: 7 Abr. 2006.

VITOLLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*S. cerevisiae*)**. 1979. 136p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.
_____. **Efeito do pH e da aeração sobre a atividade invertásica de células inatctas de levedura obtidas por cultivo descontínuo**. 1989. 140p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

VITOLLO, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Invertase activity of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugarcane molasses. I. Steady-state continuous culture tests. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.27, p.1229-1235, 1985.

_____. Invertase activity of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugarcane molasses. II. Unsteady-state continuous culture tests. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.30, p.9-14, 1987.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: John Willey, 1998, 350p.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Ámsterdam, v.58, p.209-217, 1990.

ZAGO, E.A.; SILVA, F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool**, Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ, ESALQ, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1996. 194p.

**ANEXO A:
TABELAS**

Tabela 4 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem BG-1.

Meio		BG-1							
		0	3	6	9	12	15	24	34
YEPD	Glicerol	0,006	0,007	0,008	0,014	0,016	0,022	0,031	0,029
	Glicose	1,820	1,757	1,559	1,230	0,974	0,651	0,000	0,000
	Frutose	0,068	0,060	0,060	0,040	0,037	0,019	0,000	0,028
	Sacarose	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,025	0,162	0,384	0,484	0,620	0,785	0,873
YEPS	Glicerol	0,007	0,007	0,009	0,011	0,014	0,020	0,030	0,028
	Glicose	0,116	0,160	0,250	0,380	0,339	0,208	0,000	0,000
	Frutose	0,026	0,104	0,270	0,436	0,560	0,510	0,007	0,000
	Sacarose	1,760	1,566	1,167	0,530	0,183	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,020	0,143	0,352	0,418	0,540	0,777	0,832
YEPDS	Glicerol	0,007	0,006	0,008	0,011	0,012	0,019	0,038	0,026
	Glicose	0,940	0,917	0,800	0,592	0,446	0,212	0,000	0,000
	Frutose	0,047	0,068	0,129	0,200	0,243	0,217	0,000	0,000
	Sacarose	0,855	0,750	0,668	0,476	0,286	0,088	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,020	0,162	0,347	0,438	0,576	0,799	0,827

Tabela 5 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem CAT-1.

Meio		CAT-1 (Tempo - horas)							
		0	3	6	9	12	15	24	34
YEPD	Glicerol	0,006	0,006	0,008	0,011	0,020	0,024	0,030	0,029
	Glicose	1,725	1,694	1,397	0,986	0,733	0,373	0,000	0,000
	Frutose	0,077	0,054	0,048	0,036	0,033	0,013	0,000	0,000
	Sacarose	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,041	0,245	0,476	0,567	0,656	0,841	0,827
YEPS	Glicerol	0,007	0,007	0,009	0,009	0,016	0,021	0,027	0,026
	Glicose	0,086	0,098	0,135	0,141	0,152	0,081	0,000	0,000
	Frutose	0,026	0,102	0,184	0,217	0,318	0,306	0,007	0,000
	Sacarose	1,759	1,544	1,225	0,625	0,404	0,043	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,032	0,209	0,452	0,515	0,631	0,817	0,887
YEPDS	Glicerol	0,006	0,006	0,008	0,012	0,012	0,022	0,026	0,026
	Glicose	0,915	0,902	0,735	0,443	0,266	0,114	0,000	0,000
	Frutose	0,047	0,119	0,176	0,211	0,209	0,203	0,000	0,000
	Sacarose	0,827	0,675	0,473	0,327	0,162	0,019	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,040	0,233	0,442	0,525	0,624	0,794	0,847

Tabela 6 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem FLEISCHMANN.

Meio	FLEISCHMANN (Tempo - horas)								
	0	3	6	9	12	15	24	34	
YEPD	Glicerol	0,006	0,006	0,006	0,006	0,008	0,013	0,024	0,021
	Glicose	1,780	1,696	1,666	1,560	1,350	0,980	0,000	0,000
	Frutose	0,065	0,058	0,055	0,052	0,046	0,032	0,000	0,000
	Sacarose	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,009	0,035	0,134	0,418	0,709	1,063	1,160
YEPS	Glicerol	0,006	0,006	0,007	0,007	0,008	0,014	0,025	0,024
	Glicose	0,121	0,100	0,251	0,502	0,577	0,398	0,000	0,000
	Frutose	0,018	0,052	0,178	0,409	0,732	0,707	0,159	0,000
	Sacarose	1,804	1,630	1,389	0,741	0,078	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,009	0,026	0,124	0,411	0,615	1,048	1,213
YEPDS	Glicerol	0,005	0,005	0,007	0,007	0,008	0,015	0,023	0,023
	Glicose	0,986	0,962	0,959	0,902	0,805	0,598	0,000	0,000
	Frutose	0,043	0,073	0,118	0,254	0,391	0,387	0,018	0,000
	Sacarose	0,855	0,731	0,653	0,343	0,007	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,000	0,031	0,178	0,534	0,638	1,035	1,114

Tabela 7 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem PE-2.

Meio	PE-2 (Tempo - horas)								
	0	3	6	9	12	15	24	34	
YEPD	Glicerol	0,006	0,006	0,007	0,007	0,010	0,016	0,023	0,023
	Glicose	1,723	1,659	1,478	1,234	1,060	0,732	0,000	0,000
	Frutose	0,061	0,053	0,043	0,028	0,044	0,020	0,000	0,000
	Sacarose	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,025	0,153	0,372	0,430	0,556	0,744	0,779
YEPS	Glicerol	0,006	0,006	0,007	0,008	0,011	0,015	0,021	0,022
	Glicose	0,086	0,168	0,182	0,197	0,204	0,169	0,000	0,000
	Frutose	0,040	0,068	0,138	0,213	0,349	0,378	0,121	0,000
	Sacarose	1,769	1,653	1,432	1,085	0,805	0,532	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,014	0,092	0,347	0,364	0,460	0,667	0,776
YEPDS	Glicerol	0,007	0,007	0,008	0,010	0,012	0,014	0,022	0,022
	Glicose	0,904	0,896	0,681	0,541	0,457	0,253	0,000	0,000
	Frutose	0,066	0,084	0,121	0,162	0,210	0,194	0,008	0,000
	Sacarose	0,883	0,796	0,663	0,541	0,402	0,233	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,034	0,218	0,345	0,413	0,491	0,716	0,762

Tabela 8 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem 1403-7A.

Meio		1403-7A (Tempo – horas)									
		0	3	6	9	12	15	24	34	57	79
YEPD	Glicerol	0,006	0,006	0,007	0,008	0,012	0,014	0,019	0,020	0,020	0,019
	Glicose	1,750	1,684	1,534	1,268	1,092	0,892	0,347	0,000	0,000	0,000
	Frutose	0,065	0,048	0,067	0,041	0,044	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000
	Sacarose	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,013	0,079	0,259	0,350	0,410	0,509	0,548	0,582	0,693
YEPS	Glicerol	0,006	0,006	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009	0,012	0,016	0,017
	Glicose	0,075	0,074	0,026	0,016	0,029	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
	Frutose	0,041	0,041	0,026	0,022	0,041	0,032	0,001	0,004	0,000	0,000
	Sacarose	1,826	1,680	1,649	1,542	1,479	1,423	1,066	0,644	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,016	0,063	0,215	0,373	0,442	0,542	0,631	0,830	0,904
YEPDS	Glicerol	0,006	0,006	0,007	0,009	0,012	0,013	0,014	0,015	0,017	0,018
	Glicose	0,877	0,804	0,697	0,411	0,240	0,087	0,000	0,000	0,000	0,006
	Frutose	0,051	0,055	0,059	0,048	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Sacarose	0,873	0,845	0,840	0,837	0,839	0,801	0,751	0,616	0,255	0,060
	Biomassa	0,000	0,020	0,092	0,304	0,347	0,395	0,468	0,496	0,661	0,799

Tabela 9 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante um crescimento anaeróbico em três diferentes meios (YEPD, YEPS e YEPDS) com a linhagem LCM001.

Meio		LCM001 (Tempo – horas)									
		0	3	6	9	12	15	24	34	57	79
YEPD	Glicerol	0,006	0,006	0,007	0,010	0,013	0,015	0,017	0,019	0,018	0,016
	Glicose	1,728	1,617	1,582	1,334	1,122	0,916	0,273	0,000	0,000	0,000
	Frutose	0,058	0,051	0,053	0,045	0,045	0,028	0,011	0,000	0,000	0,000
	Sacarose	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Biomassa	0,000	0,011	0,078	0,259	0,345	0,411	0,502	0,540	0,548	0,649
YEPS	Glicerol	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007	0,007	0,009	0,010	0,016	0,021
	Glicose	0,080	0,064	0,000	0,013	0,016	0,026	0,025	0,029	0,000	0,013
	Frutose	0,036	0,030	0,000	0,000	0,007	0,039	0,042	0,048	0,000	0,001
	Sacarose	1,811	1,793	1,683	1,660	1,649	1,499	1,357	1,052	0,301	0,000
	Biomassa	0,000	0,009	0,059	0,175	0,285	0,415	0,553	0,643	1,002	1,060
YEPDS	Glicerol	0,006	0,006	0,007	0,010	0,012	0,012	0,013	0,015	0,016	0,017
	Glicose	0,883	0,818	0,727	0,450	0,293	0,122	0,091	0,026	0,021	0,002
	Frutose	0,065	0,061	0,060	0,049	0,046	0,044	0,041	0,039	0,026	0,000
	Sacarose	0,882	0,874	0,851	0,850	0,821	0,816	0,774	0,741	0,398	0,329
	Biomassa	0,000	0,025	0,080	0,265	0,338	0,374	0,450	0,463	0,542	0,694

Tabela 10 - Valores médios de glicerol, rendimento, viabilidade, biomassa e etanol expressos em porcentagem (%) durante três ciclos fermentativos com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.

Linhagens	Ciclos	Glicerol	Rendimento	Eficiência	Viabilidade	Biomassa	Etanol
BG-1	1	0,516	83,07	83,38	99,67	2,48	6,92
	2	0,506	81,61	81,86	99,33	2,86	7,00
	3	0,510	80,74	80,83	99,67	3,09	6,85
CAT-1	1	0,483	82,71	82,99	99,33	2,53	6,87
	2	0,427	81,79	82,03	99,33	2,90	7,02
	3	0,455	81,47	81,57	99,33	3,20	6,92
FLEISCHMANN	1	0,405	82,96	83,28	90,33	2,51	6,92
	2	0,484	81,36	81,66	88,33	2,95	7,02
	3	0,451	81,48	81,65	83,33	3,36	6,93
PE-2	1	0,423	83,19	83,46	99,00	2,38	6,92
	2	0,399	81,76	82,05	99,00	2,88	7,03
	3	0,434	81,14	81,36	99,67	3,10	6,88
1403-7A	1	0,337	75,7	81,54	97,33	2,12	6,22
	2	0,449	82,1	83,79	97,00	2,14	6,98
	3	0,396	81,02	82,30	96,67	2,08	6,85
LCM001	1	0,317	47,95	81,70	94,33	2,07	3,92
	2	0,360	57,14	81,59	94,33	1,94	4,82
	3	0,448	58,88	77,79	94,00	2,09	4,95

Tabela 11 - Valores médios da quantidade de CO₂ expressos em gramas, liberados durante os três ciclos fermentativos com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.

Linhagens	Horas						
	0	1,5	3	4,5	6	7,5	21
BG-1	0,00	0,65	1,39	1,72	1,79	1,82	1,91
CAT-1	0,00	0,61	1,28	1,60	1,73	1,79	1,89
FLEISCHMANN	0,00	0,43	1,02	1,57	1,81	1,88	1,98
PE-2	0,00	0,54	1,18	1,54	1,71	1,79	1,93
1403-7A	0,00	0,29	0,55	0,85	1,09	1,28	1,77
LCM001	0,00	0,23	0,34	0,47	0,59	0,70	1,19

Tabela 12 - Valores médios de glicerol, glicose, frutose, sacarose e biomassa expressos em porcentagem (%) durante o quarto ciclo fermentativo com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.

Linhagens		Tempo (horas)						
		0	2	4	6	8	12	24
BG-1	Glicerol	0,04	0,53	0,55	0,52	0,52	0,53	0,54
	Glicose	0,58	0,10	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03
	Frutose	0,62	0,81	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
	Sacarose	12,03	0,00	0,00	0,06	0,01	0,01	0,01
CAT-1	Glicerol	0,04	0,44	0,50	0,49	0,49	0,49	0,49
	Glicose	0,58	0,05	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02
	Frutose	0,62	0,13	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02
	Sacarose	12,03	1,07	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
FLEISCHMANN	Glicerol	0,04	0,39	0,51	0,48	0,48	0,50	0,47
	Glicose	0,58	0,68	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
	Frutose	0,62	2,36	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
	Sacarose	12,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
PE-2	Glicerol	0,04	0,39	0,45	0,44	0,44	0,45	0,46
	Glicose	0,58	0,09	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02
	Frutose	0,62	0,30	0,03	0,02	0,02	0,04	0,02
	Sacarose	12,03	1,78	0,08	0,01	0,01	0,02	0,02
1403-7A	Glicerol	0,04	0,24	0,32	0,34	0,37	0,41	0,43
	Glicose	0,58	0,10	0,07	0,05	0,04	0,03	0,00
	Frutose	0,62	0,10	0,08	0,06	0,05	0,05	0,03
	Sacarose	12,03	8,47	5,94	3,81	2,11	0,94	0,10
LCM001	Glicerol	0,04	0,26	0,30	0,36	0,40	0,47	0,62
	Glicose	0,58	0,12	0,12	0,13	0,11	0,11	0,08
	Frutose	0,62	0,11	0,13	0,17	0,16	0,20	0,23
	Sacarose	12,03	8,95	7,66	6,72	5,51	4,03	1,28

Tabela 13 - Valores médios de glicogênio e trealose ao final do quarto ciclo fermentativo com as linhagens BG-1, CAT-1, FLEISCHMANN, PE-2, 1403-7A e LCM001.

Linhagens	Glicogênio (%)	Trealose (%)
BG1	5,08	5,19
CAT1	15,04	9,45
FLEISHMANN	12,63	4,18
PE-2	9,88	5,22
1403-7A	14,77	10,78
LCM001	17,95	8,64

ANEXO B:
ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Tabela 14 - Resultado da análise estatística da viabilidade de diferentes leveduras em 4 ciclos fermentativos.

	LEVEDURAS	BG-1	CAT-1	FLEISCHMANN	PE-2	1403-7A
Inicial	CAT-1	1,0000				
	FLEISCHMANN	<0,0001	<0,0001			
	PE-2	0,7107	0,7107	<0,0001		
	1403-7A	0,7107	0,7107	<0,0001	1,0000	
	LCM001	1,0000	1,0000	<0,0001	0,7107	0,7107
1º Ciclo	CAT-1	0,7107				
	FLEISCHMANN	<0,0001	<0,0001			
	PE-2	0,4592	0,7107	<0,0001		
	1403-7A	0,0120	0,0299	<0,0001	0,0682	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0015
2º Ciclo	CAT-1	1,0000				
	FLEISCHMANN	<0,0001	<0,0001			
	PE-2	0,7107	0,7107	<0,0001		
	1403-7A	0,0120	0,0120	<0,0001	0,0299	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0045
3º Ciclo	CAT-1	0,7107				
	FLEISCHMANN	<0,0001	<0,0001			
	PE-2	1,0000	0,7107	<0,0001		
	1403-7A	0,0015	0,0045	<0,0001	0,0015	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0045
4º Ciclo	CAT-1	0,4592				
	FLEISCHMANN	<0,0001	<0,0001			
	PE-2	0,7107	0,2686	<0,0001		
	1403-7A	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0120

Leveduras com valores de $p < 0,05$ diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 95%.

Tabela 15 - Resultado da análise estatística do rendimento de diferentes leveduras em 3 ciclos fermentativos.

	LEVEDURAS	BG-1	CAT-1	FLEISCHMANN	PE-2	1403-7A
1º Ciclo	CAT-1	0,7116				
	FLEISCHMANN	0,9162	0,7912			
	PE-2	0,9027	0,6233	0,8201		
	1403-7A	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2º Ciclo	CAT-1	0,8572				
	FLEISCHMANN	0,7991	0,6644			
	PE-2	0,8786	0,9783	0,6841		
	1403-7A	0,6185	0,7498	0,4535	0,7293	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
3º Ciclo	CAT-1	0,4616				
	FLEISCHMANN	0,4535	0,9892			
	PE-2	0,6866	0,7370	0,7268		
	1403-7A	0,7756	0,6497	0,6400		
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Leveduras com valores de $p < 0,05$ diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 95%.

Tabela 16 - Resultado da análise estatística da eficiência de diferentes leveduras em 3 ciclos fermentativos.

	LEVEDURAS	BG-1	CAT-1	FLEISCHMANN	PE-2	1403-7A
1º Ciclo	CAT-1	0,7119				
	FLEISCHMANN	0,9233	0,7846			
	PE-2	0,9480	0,6641	0,8716		
	1403-7A	0,0958	0,1865	0,1148	0,0845	
	LCM001	0,1258	0,2372	0,1496	0,1116	0,8839
2º Ciclo	CAT-1	0,8716				
	FLEISCHMANN	0,8497	0,7258			
	PE-2	0,8546	0,9826	0,7096		
	1403-7A	0,0810	0,1103	0,0555	0,1148	
	LCM001	0,8038	0,6822	0,9529	0,6664	0,0491
3º Ciclo	CAT-1	0,4924				
	FLEISCHMANN	0,4473	0,9405			
	PE-2	0,6199	0,8473	0,7894		
	1403-7A	0,1798	0,5001	0,5481	0,3879	
	LCM001	0,0085	0,0016	0,0013	0,0025	0,0003

Leveduras com valores de $p < 0,05$ diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 95%.

Tabela 17 - Resultado da análise estatística da biomassa de diferentes leveduras em 3 ciclos fermentativos.

	LEVEDURAS	BG-1	CAT-1	FLEISCHMANN	PE-2	1403-7A
1º Ciclo	CAT-1	0,4398				
	FLEISCHMANN	0,6332	0,7652			
	PE-2	0,0824	0,0158	0,0307		
	1403-7A	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2º Ciclo	CAT-1	0,4754				
	FLEISCHMANN	0,1158	0,3738			
	PE-2	0,6761	0,7652	0,2386		
	1403-7A	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0013
3º Ciclo	CAT-1	0,0576				
	FLEISCHMANN	<0,0001	0,0079			
	PE-2	0,8577	0,0824	<0,0001		
	1403-7A	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
	LCM001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9058

Leveduras com valores de $p < 0,05$ diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 95%.

Tabela 18 - Resultado da análise estatística do glicerol presente no vinho de levedurado de diferentes leveduras em 3 ciclos fermentativos.

	LEVEDURAS	BG-1	CAT-1	FLEISCHMANN	PE-2	1403-7A
1º Ciclo	CAT-1	0,4899				
	FLEISCHMANN	0,0140	0,0632			
	PE-2	0,0392	0,1518	0,6444		
	1403-7A	0,0004	0,0022	0,1518	0,0632	
	LCM001	0,0001	0,0007	0,0632	0,0237	0,6444
2º Ciclo	CAT-1	0,0737				
	FLEISCHMANN	0,5905	0,1978			
	PE-2	0,0199	0,5390	0,0632		
	1403-7A	0,1978	0,5905	0,4435	0,2540	
	LCM001	0,0022	0,1322	0,0082	0,3591	0,0461
3º Ciclo	CAT-1	0,1978				
	FLEISCHMANN	0,1736	0,9385			
	PE-2	0,0996	0,7003	0,7580		
	1403-7A	0,0140	0,1978	0,2246	0,3591	
	LCM001	0,1518	0,8775	0,9385	0,8172	0,2540

Leveduras com valores de $p < 0,05$ diferem estatisticamente entre si a um nível de significância de 95%.

Tabela 19 - Resultados obtidos no teste Tukey para a variável trealose ao término da fermentação.

Tratamentos	FINAL DE FERMENTAÇÃO
BG-1	5,19 c
CAT-1	9,45 b
FLEISCHMANN	4,18 c
PE-2	5,22 c
1403-7A	10,75 a
LCM001	8,64 b
Coeficiente de variação: 5,317%	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 20 - Resultados obtidos no teste Tukey para a variável glicogênio ao término da fermentação.

Tratamentos	FINAL DE FERMENTAÇÃO
BG-1	5,08 d
CAT-1	15,04 ab
FLEISCHMANN	12,63 bc
PE-2	9,88 c
1403-7A	14,77 b
LCM001	17,95 a
Coeficiente de variação: 8,202%	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 21 - Resultados obtidos no teste Tukey para as variáveis de atividade de invertase na célula, no vinho e na água de lavagem.

Leveduras	Atividade de invertase		
	Célula	Vinho	Água lavagem
BG-1	7,34 a	0,11 b	0,02 b
CAT-1	3,77 b	0,11 b	0,01 b
FLEISCHMANN	5,75 a	0,50 a	0,19 a
PE-2	2,39 b	0,09 b	0,01 b
C.V	12,51%	39,02%	39,13%

C.V – Coeficiente de variação

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 22 - Resultados do desvio padrão em relação a média (SEM) obtido no teste Tukey para a variável eliminação de CO₂ durante a fermentação.

Tratamentos	Tempo de Fermentação (horas)					
	1,5	3	4,5	6	7,5	21
BG-1	0,057	0,095	0,023	0,047	0,048	0,04
CAT-1	0,053	0,081	0,051	0,029	0,089	0,017
FLEISCHMANN	0,027	0,084	0,099	0,055	0,048	0,05
PE-2	0,06	0,124	0,089	0,05	0,031	0,042
1403-7A	0,029	0,034	0,016	0,08	0,035	0,07
LCM001	0,3	0,034	0,034	0,044	0,045	0,093

Tabela 23 - Resultados do desvio padrão em relação a média (SEM) obtido no teste Tukey para as variáveis glicerol, glicose, frutose e sacarose no 4º Ciclo fermentativo, no qual estudou-se o perfil de metabolização de açúcares ao longo do tempo.

Linhagens		Tempo (horas)						
		0	2	4	6	8	12	24
BG-1	Glicerol	0,007	0,010	0,090	0,010	0,007	0,012	0,010
	Glicose	0,012	0,019	0,002	0,001	0,000	0,006	0,003
	Frutose	0,016	0,151	0,004	0,000	0,003	0,002	0,009
	Sacarose	0,061	0,000	0,004	0,041	0,006	0,004	0,010
CAT-1	Glicerol	0,007	0,027	0,009	0,005	0,018	0,014	0,008
	Glicose	0,012	0,004	0,002	0,003	0,002	0,004	0,001
	Frutose	0,016	0,018	0,002	0,003	0,007	0,007	0,003
	Sacarose	0,061	0,111	0,005	0,004	0,007	0,005	0,005
FLEISCHMANN	Glicerol	0,007	0,017	0,011	0,008	0,006	0,007	0,012
	Glicose	0,012	0,036	0,000	0,007	0,003	0,005	0,005
	Frutose	0,016	0,118	0,001	0,009	0,006	0,005	0,001
	Sacarose	0,061	0,007	0,005	0,006	0,002	0,001	0,001
PE-2	Glicerol	0,007	0,005	0,010	0,010	0,007	0,003	0,012
	Glicose	0,012	0,003	0,001	0,001	0,001	0,006	0,001
	Frutose	0,016	0,018	0,004	0,003	0,002	0,026	0,002
	Sacarose	0,061	0,206	0,030	0,003	0,005	0,002	0,001
1403-7A	Glicerol	0,007	0,005	0,002	0,005	0,008	0,004	0,004
	Glicose	0,012	0,004	0,004	0,001	0,002	0,003	0,000
	Frutose	0,016	0,003	0,004	0,005	0,003	0,002	0,002
	Sacarose	0,061	0,094	0,051	0,075	0,074	0,076	0,008
LCM001	Glicerol	0,007	0,014	0,019	0,023	0,035	0,041	0,043
	Glicose	0,012	0,016	0,015	0,023	0,012	0,024	0,013
	Frutose	0,016	0,023	0,021	0,031	0,022	0,043	0,035
	Sacarose	0,061	0,091	0,082	0,074	0,117	0,147	0,136