

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

**Produção de leveduras enriquecidas em zinco**

**Alana Uchôa Pinto**

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

**Piracicaba  
2024**

**Alana Uchôa Pinto**  
**Engenheira de Alimentos**

**Produção de leveduras enriquecidas em zinco**  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA**

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

**Piracicaba**  
**2024**

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

Pinto, Alana Uchôa

Produção de leveduras enriquecidas em zinco /Alana Uchôa Pinto -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

89 p.

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

1. Enriquecimento 2. Zinco 3. Evolução adaptativa 4. *Saccharomyces cerevisiae*  
5. Hidrolisado de milho I. Título

Dedico este trabalho ao meu irmão Edvando Uchôa,  
que muito me ensinou sobre o amor e a paciência.  
A sua trajetória me inspirou a enxergar e ir além.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo Seu amor e misericórdia. À Virgem Maria, pelo seu colo de Mãe.

Agradeço aos meus pais, Antonia e José, verdadeiros anjos, um na terra e outro no céu. Muito obrigada por todo o incentivo, apoio incondicional e por nunca me deixarem perder a fé.

Ao meu irmão Edvando, que me ensinou que o amor é capaz de suportar todas as coisas.

À minha família, pelo carinho e estímulo que me deram, especialmente aos meus padrinhos, Neto e Silani, que sempre foram exemplos e me apontaram o caminho.

Ao Lenon Henrique, expresso minha profunda gratidão por ter sido um ponto de equilíbrio fundamental diante das dificuldades. Sua presença tornou esse caminho mais leve e significativo.

À família Guerreiro Leandro, por sempre me apoiar e estar presente em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista, pela oportunidade que me concedeu, por todos os conselhos, por compartilhar sua sabedoria, pela valiosa orientação e pela forma excelente com a qual guiou o meu aprendizado.

À Layna Amorim, por ter me emprestado seu tempo, seu olhar minucioso que enriqueceu esse trabalho, pelos conselhos e por sua amizade especial.

Agradeço às meninas do GTSBio, Gabriela Almeida, Tamires Faria, Vitória Franco e Chiara Vitti, que me acolheram muito bem e me apoiaram constantemente com as suas orações. Agradeço especialmente à Liandra Spironello, pelo companheirismo, amizade e contribuição nesse trabalho.

A todos os demais que integram o GTSBio, ex-membros e atuais, Eduardo Mattos, Matheus Ribeiro, Rafael Douradinho, Gabriel Galli, Gustavo Peixoto, Igor Habermann, Letícia Fazio, Thalia, Ana Paula Silva, Laysa Maciel, Rubens Callegari, Marcelo Gomes e Bianca Martins. Obrigada pelo conhecimento compartilhado, apoio, motivação e momentos alegres que me proporcionaram.

Aos técnicos do Departamento de Alimentos, Agroindústria e Nutrição, Pedro, Silvino e Rose, por todo apoio. À Joana, pelo zelo e cuidado com todos nós. Ao Luiz, por sua simpatia e conversas divertidas. À Luciana por toda ajuda.

À Caroline Figueiredo, que sempre esteve ao meu lado, pela amizade e pelo apoio demonstrado ao longo de todo esse tempo. Agradeço pela companhia nas batalhas que vencemos juntas desde o início do curso. Sem a sua presença e amizade a luta teria sido mais árdua.

Aos meus colegas que a Vila Estudantil PG me presenteou e os quais convivi durante os últimos anos, Jéssica Santos, Silas Alves, Thiago Vidoca, Francisco Canindé e Letícia Nunes. Obrigada pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer como pessoa.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP e a todos que compõem o Programa de Pós-graduação Ciência e Tecnologia de Alimentos, por me proporcionar essa conquista tão preciosa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e concessão da bolsa.

À Divisão de Atendimento à Comunidade, pela concessão da moradia na Vila Estudantil, o qual foi imprescindível para a continuidade no curso.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica. Muito obrigada!

“Nada te perturbe, nada te espante.  
Tudo passa, Deus não muda.  
Quem a Deus tem,  
mesmo que passe por momentos difíceis,  
sendo Deus o seu tesouro, nada lhe falta.  
Só Deus basta!”  
**Santa Tereza D’Ávila**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	11
Referências .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Produção de etanol biocombustível utilizando o milho como matriz energética.....	15
2.2. Os subprodutos da produção de etanol de milho.....	16
2.3. Utilização de leveduras para o consumo animal e humano .....	17
2.4. Leveduras: aspectos biológicos e metabólicos.....	18
2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
2.6. Minerais: funções e importância na alimentação animal.....	23
2.7. Zinco: propriedades elementares, aspectos metabólicos e fisiológicos.....	24
2.8. Suplementação de leveduras com zinco .....	26
Referências .....	27
3. CAPACIDADE DAS LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , LINHAGEM THERMOSACC <sup>®</sup> , DE TOLERAR ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO DE ZINCO POR MEIO DA EVOLUÇÃO ADAPTATIVA.....	35
Resumo.....	35
Abstract .....	35
3.1. Introdução .....	36
3.2. Material e Métodos.....	37
3.2.1. Local da pesquisa .....	37
3.2.2. Estudo da tolerância da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ao sulfato de zinco.....	38
3.2.3. Estudo da adaptação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio enriquecido com sulfato de zinco.....	39
3.2.3.1. Viabilidade celular.....	40
3.2.3.2. Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	40
3.2.4. Estatística e análise dos resultados .....	41
3.3. Resultados e Discussão.....	41
3.3.1. Estudo da tolerância da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , linhagem Thermosacc <sup>®</sup> , à presença de sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> ) .....	41

3.3.2. Estudo de adaptação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , linhagem Thermosacc <sup>®</sup> , a elevadas concentrações de sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> ).....	45
3.4. Conclusão.....	51
Referências .....	51
4. FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADO DE MILHO UTILIZANDO LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , LINHAGEM THERMOSACC <sup>®</sup> , PREVIAMENTE ADAPTADAS A ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO DE ZINCO.....	56
Resumo.....	56
Abstract .....	56
4.1. Introdução .....	57
4.2. Material e Métodos.....	59
4.2.1. Local da pesquisa .....	59
4.2.2. Ensaio de fermentação alcoólica utilizando hidrolisado de milho enriquecido com sulfato de zinco .....	59
4.2.2.1. Multiplicação celular .....	59
4.2.2.2. Processo de obtenção do hidrolisado e dos particulados de milho.....	60
4.2.2.3. Preparo do mosto para a fermentação .....	61
4.2.2.4. Monitoramento do desprendimento de CO <sub>2</sub> durante a fermentação .....	61
4.2.2.5. Viabilidade celular.....	61
4.2.2.6. Biomassa .....	62
4.2.2.7. Contagem total de microrganismos .....	62
4.2.2.8. Teor alcoólico.....	63
4.2.2.9. Rendimento fermentativo (RF).....	63
4.2.2.10. Produtividade da fermentação (PF) .....	63
4.2.2.11. Teor de açúcares redutores e glicerol.....	63
4.2.2.12. Teor de ácidos orgânicos.....	64
4.2.2.13. Análise de trealose .....	64
4.2.2.14. Análise de proteínas.....	65
4.2.2.15. Determinação do zinco.....	66
4.2.3. Análise dos dados .....	66
4.3. Resultados e Discussão.....	67
4.4. Conclusão.....	82
Referências .....	82
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89

## RESUMO

### Produção de leveduras enriquecidas em zinco

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, destacando-se pelo investimento na utilização do milho como matéria-prima. A produção de etanol a partir do milho gera subprodutos significativos para a receita das usinas, como os grãos secos de destilaria (DDG), que são empregados como ração animal devido ao seu alto teor proteico. Esse conteúdo proteico é majoritariamente atribuído às leveduras presentes no processo fermentativo. Estas, por sua vez, apresentam a capacidade intrínseca de acumular minerais em suas células, entre eles o zinco, micronutriente que participa de diversas funções biológicas. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a tolerância e a capacidade adaptativa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, a altas concentrações de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>). Além disso, investigar os efeitos dessa adaptação nos parâmetros fermentativos utilizando hidrolisado de milho como substrato. Os resultados demonstraram que a levedura conseguiu se desenvolver em meio com até 1250 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. Após o processo adaptativo, as leveduras adquiriram a capacidade de crescer em meio com até 1400 mg L<sup>-1</sup> do referido composto mineral, contudo, apresentaram alterações metabólicas. Em relação à fermentação, os resultados indicaram que a presença de zinco impactou negativamente nos parâmetros fermentativos, resultando em menor rendimento e produtividade de etanol, especialmente na concentração de 1400 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. No entanto, essa concentração mais alta favoreceu acúmulo de maior concentração de zinco nas leveduras, atingindo 5635,7 mg kg<sup>-1</sup> de zinco por biomassa seca de levedura, indicando o potencial para gerar biomassa enriquecida com esse micronutriente. Essa biomassa, quando associada ao DDG, configura um produto com alto teor proteico, proporcionando os benefícios nutricionais do zinco. Conclui-se que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, é capaz de tolerar 1250 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub> e, com a evolução adaptativa, pode tolerar 1400 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. Apesar de se adaptar a altas concentrações de ZnSO<sub>4</sub>, a levedura sofre alteração no seu metabolismo celular, o que afeta o tempo de geração, o rendimento e a produtividade na fermentação.

Palavras-chave: Enriquecimento, Zinco, Evolução adaptativa, *Saccharomyces cerevisiae*, Hidrolisado de milho

## ABSTRACT

### Production of zinc-enriched yeasts

Brazil is the world's second largest producer of ethanol and stands out for its investment in the use of corn as a raw material. The production of ethanol from corn generates significant by-products for the mills' revenues, such as distillers dried grains (DDG), which are used as animal feed due to their high protein content. This protein content is mostly attributed to the yeasts present in the fermentation process. These, in turn, have the intrinsic ability to accumulate minerals in their cells, including zinc, a micronutrient that participates in various biological functions. In this context, the aim of this study was to assess the tolerance and adaptive capacity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain Thermosacc<sup>®</sup>, to high concentrations of zinc sulphate (ZnSO<sub>4</sub>). It also investigated the effects of this adaptation on fermentation parameters using corn hydrolysate as a substrate. The results showed that the yeast was able to grow in a medium containing up to 1250 mg L<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub>. After the adaptive process, the yeasts were able to grow in a medium containing up to 1400 mg L<sup>-1</sup> of the mineral compound, although they showed metabolic changes. With regard to fermentation, the results indicated that the presence of zinc had a negative impact on fermentation parameters, resulting in a lower ethanol yield and productivity, especially at a concentration of 1400 mg L<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub>. However, this higher concentration favored the accumulation of a higher concentration of zinc in the yeast, reaching 5635.7 mg kg<sup>-1</sup> of zinc per dry biomass of yeast, indicating the potential to generate biomass enriched with this micronutrient. This biomass, when combined with DDG, produces a product with a high protein content, providing the nutritional benefits of zinc. It is concluded that the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain Thermosacc<sup>®</sup>, is able to tolerate 1250 mg L<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub> and, with adaptive evolution, can tolerate 1400 mg L<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub>. Despite adapting to high concentrations of ZnSO<sub>4</sub>, the yeast undergoes changes in its cellular metabolism, which affects generation time, yield and productivity in fermentation.

Keywords: Enrichment, Zinc, Adaptive evolution, *Saccharomyces cerevisiae*, Corn hydrolysate

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda global por energia e a diminuição contínua das reservas de petróleo incentivam a procura por fontes energéticas alternativas, principalmente aquelas provenientes de materiais renováveis. Além disso, a preocupação mundial com as mudanças climáticas e a necessidade de diminuir as emissões de gases do efeito estufa têm estimulado a utilização dos biocombustíveis como alternativa aos combustíveis fósseis (USMANI; MOHAMMAD; ANSARI, 2023).

O Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor de etanol do mundo, destacando-se por seus contínuos investimentos em novas tecnologias para aprimorar a produtividade. Diante do cenário de excesso de oferta de milho no mercado interno, principalmente na região Centro-Oeste, e da busca por inovações que impulsionem a eficiência na produção de etanol, o Brasil está direcionando a sua atenção para a produção desse biocombustível a partir do milho (MENDIBURU et al., 2022).

A cadeia produtiva do etanol de milho apresenta subprodutos de alto valor agregado, como é o caso dos grãos secos de destilaria (Dried Distillers Grains- DDG), que se destacam por sua significativa concentração de proteínas, além de contar com fibras, minerais e vitaminas em sua composição. As proteínas desse subproduto têm origem no gérmen e nas células de leveduras empregadas no processo de fermentação alcoólica. Devido às suas características nutricionais, o DDG é uma opção vantajosa para a alimentação animal, podendo ser utilizado como substituto das rações convencionais ou complementar na nutrição animal (MOHAMMADI; VENKITASAMY; WEN, 2021).

As leveduras utilizadas no processo de obtenção de etanol possuem a capacidade de incorporar minerais às suas células, fazendo a bioconversão de parte do metal inorgânico em orgânico (GHAREKHANI et al., 2015). Dentre os minerais, o zinco desempenha diversas funções nas atividades biológicas dos organismos humanos e animais, visto que atua como componente estrutural enzimático e agente catalítico em diversas reações. A função do zinco se estende ao metabolismo de lipídios, proteínas, carboidratos e outros elementos essenciais (BANASZAK; GÓRNA; PRZYSLAWSKI, 2021).

Atualmente, inúmeros estudos destacam a suplementação de diversas cepas de leveduras com nutrientes minerais. Nos últimos anos, observa-se o aumento significativo no interesse pela incorporação de minerais traço na forma orgânica para a alimentação humana e animal, reduzindo a dependência da suplementação na forma inorgânica. Esse interesse é impulsionado pelos resultados de investigações que apontam maior biodisponibilidade dos minerais,

resultando em melhor absorção pelos indivíduos (MAARES et al., 2022; HOU et al., 2020; MOTA et al., 2022).

A incorporação de metais nas leveduras pode ser efetuada ao induzir alterações celulares provocadas por estressantes, incentivando as células a evoluírem de maneira adaptativa. A abordagem da evolução adaptativa torna os experimentos mais simples, uma vez que requer apenas o cultivo prolongado de células em condições que favoreçam a seleção natural daquelas que desenvolverem mutações vantajosas (SANDBERG et al., 2019).

A associação de leveduras enriquecidas com zinco ao DDG se apresenta como uma alternativa promissora para a suplementação desse micronutriente na alimentação animal. Esse processo não apenas contribui para viabilizar a produção em larga escala, mas também demonstra vantagens econômicas ao agregar valor ao DDG/DDGS.

Desta maneira, o presente estudo teve como objetivos avaliar a influência do sulfato de zinco em meio de cultivo no metabolismo e no crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, submetida a uma evolução adaptativa. Além disso, analisar o desempenho fermentativo dessas leveduras enriquecidas em zinco durante a fermentação em hidrolisado de milho.

## Referências

- BANASZAK, Michalina; GÓRNA, Ilona; PRZYSŁAWSKI, Juliusz. Zinc and the innovative zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein adipokine play an important role in lipid metabolism: A critical review. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 2023, 2021.
- GHAREKHANI, A. et al. Effect of dietary supplementation with zinc enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on immunity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Iranian journal of veterinary research**, v. 16, n. 3, p. 278, 2015.
- HOU, Lele et al. Selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* improves the meat quality of broiler chickens via activation of the glutathione and thioredoxin systems. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6045-6054, 2020.
- MAARES, Maria et al. Zinc availability from zinc-enriched yeast studied with an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 71, p. 126934, 2022.
- MENDIBURU, Andrés Z. et al. Ethanol as a renewable biofuel: Combustion characteristics and application in engines. **Energy**, v. 257, p. 124688, 2022.
- MOHAMMADI SHAD, Zeinab; VENKITASAMY, Chandrasekar; WEN, Zhiyou. Corn distillers dried grains with solubles: production, properties, and potential uses. **Cereal Chemistry**, v. 98, n. 5, p. 999-1019, 2021.

- MOTA, Layna Amorim et al. Ability of the *Saccharomyces cerevisiae* Y904 to tolerate and adapt to high concentrations of selenium. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 16, 2022.
- SANDBERG, Troy E. et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. **Metabolic Engineering**, v. 56, p. 1-16, 2019.
- USMANI, Rahil Akhtar; MOHAMMAD, Abdul Saboor; ANSARI, Sameer Shakeel. Comprehensive biofuel policy analysis framework: a novel approach evaluating the policy influences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 183, p. 113403, 2023.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção de etanol biocombustível utilizando o milho como matriz energética

Nos últimos anos, o debate em torno da utilização dos combustíveis fósseis se intensificou, principalmente nos países em desenvolvimento, devido às quantidades de dióxido de carbono que seus componentes liberam para a atmosfera, contribuindo negativamente para as mudanças climáticas. Com o intuito de mitigar os impactos ambientais, esses países estão investindo na produção de biocombustíveis como fonte de energia renovável (DE JONG et al., 2017).

Os biocombustíveis são considerados alternativas sustentáveis para substituir os combustíveis fósseis, destacando-se pela capacidade de absorção de carbono pelas plantas através do processo de fotossíntese. Esse processo contribui para remoção de grandes quantidades de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) da atmosfera, atenuando os efeitos do agravamento do efeito estufa (MANOCHIO et al., 2017; PEREIRA et al., 2019). Além disso, o uso de biocombustíveis promove a independência energética e incentiva a agroindústria.

Entre os biocombustíveis alternativos, o etanol é o mais produzido e difundido mundialmente, sendo obtido a partir de diversas culturas. Inicialmente, o Brasil concentrava-se na produção de etanol anidro para atuar como componente da produção da gasolina C. No entanto, o cenário mudou com o lançamento do Programa Nacional do Álcool (Proalcool) em 1975, em resposta à crise internacional do petróleo de 1973 (BENITES-LAZARO; MELLO-THÉRY; LAHSEN, 2017). O Proalcool incentivou o desenvolvimento do motor a álcool, e com o surgimento do motor flex-fuel, houve um aumento na produção de etanol hidratado para abastecer veículos automotores.

A constante adoção de novas tecnologias impulsionou o aumento da produtividade do etanol no país, especialmente com a implementação do RenovaBio, Política Nacional de Biocombustíveis aprovada em 2017. Essa política estabelece metas anuais de descarbonização para o setor de combustíveis, alinhadas aos compromissos nacionais no âmbito do Acordo de Paris (GRANGEIA; SANTOS; LAZARO, 2022). O RenovaBio visa reduzir as emissões de gases do efeito estufa até 2030 e fomentar o desenvolvimento da indústria do etanol, criando um mercado de créditos de descarbonização (CBios).

Segundo a Renewable Fuels Association (2023), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, sendo a cana-de-açúcar a principal matéria-prima. Além de oferecer biomassa para a combustão, a cana-de-açúcar tem um papel importante no desenvolvimento econômico do país, visto que interfere diretamente na geração de renda e no aumento do PIB brasileiro.

Além da cana-de-açúcar, o Brasil tem investido em novas tecnologias para a produção de biocombustíveis a partir de outras matérias-primas, como o etanol de milho. Este tem recebido significativos investimentos nos últimos anos, impulsionando sua rápida expansão. Diferente dos Estados Unidos, onde o processo de produção utiliza milho de primeira safra e fontes tradicionais de energia, o setor de biocombustíveis brasileiro prioriza o milho de segunda safra (rotacionado com a cultura da soja) e fontes renováveis (NEVES, 2021).

O aumento da produção de milho no país, principalmente na região Centro-Oeste, não foi acompanhado por um desenvolvimento proporcional da infraestrutura logística. Isso resultou em condições rodoviárias inapropriadas e acúmulo de milho estocado. Diante desse cenário, os produtores locais decidiram converter os excedentes de milho em etanol e produtos de valor agregado (MOREIRA et al, 2020). Inicialmente, o etanol de milho foi integrado às usinas *flex*, aproveitando a infraestrutura e a energia disponíveis durante a entressafra da cana-de-açúcar. Análises econômicas realizadas no princípio indicaram que a produção de etanol de milho não comprometia os benefícios ambientais do etanol de cana-de-açúcar e demonstrava viabilidade econômica em regiões com oferta de milho a preços baixos e alta demanda por ração animal (MILANEZ et al., 2014). Ao longo dos anos, foram feitos altos investimentos para a construção de plantas autônomas de etanol de milho, e o surgimento dessas usinas continua crescendo rapidamente, aumentando a renda e a atividade econômica do país.

## **2.2. Os subprodutos da produção de etanol de milho**

Apesar do etanol ser o produto principal nas usinas que utilizam o milho como matéria-prima, este não é o único gênero comercial dessa indústria. Durante as etapas de fermentação e destilação, três coprodutos podem ser obtidos: o óleo de milho, útil para a produção de biodiesel ou bioeletricidade; os grãos úmidos de destilaria (Wet Distillers Grains- WDG), destinados à alimentação animal; e os solúveis, ricos em macro e micronutrientes, que podem ser concentrados para a obtenção de xarope de milho ou incorporados no WDG, originando o WDGS (Wet Distillers Grains with Solubles). Quando o WDG e o WDGS são submetidos a um processo de secagem, outros coprodutos são gerados: os grãos secos de destilaria (Dried Distillers Grains- DDG) e os DDGS (Dried Distillers Grains with Solubles), que também são comercializados para a alimentação animal (DE FREITAS et al., 2018).

Os subprodutos provenientes da produção de etanol de milho apresentam valor agregado significativo como fontes de receitas das usinas. O processo mais comumente utilizado para a produção de etanol combustível a partir do milho é a moagem a seco, cujo coproduto primário é o DDG, que possui vida útil prolongada devido à baixa umidade (LIU; ROSENTRATER,

2016). Estima-se que, para cada tonelada de milho, são produzidos 401 litros de etanol anidro e 323 kg de DDGS (DA SILVA; CASTAÑEDA-AYARZE, 2021).

O DDG apresenta alto valor proteico e é rico em fibras, minerais e vitaminas. As proteínas desse subproduto são, basicamente, provenientes do gérmen e das células de leveduras utilizadas no processo de fermentação. O DDG é uma alternativa economicamente viável para a alimentação de animais monogástricos, ruminantes, e domésticos, sendo comercializado principalmente nas regiões em que é produzido, podendo substituir parte das rações convencionais ou atuar como complemento na nutrição animal (MOHAMMADI; VENKITASAMY; WEN, 2021).

As leveduras empregadas no processo de fermentação durante a produção de etanol de milho são integradas ao DDG. A proporção de proteínas contidas nessas leveduras representa, em média, 40% da massa seca da célula. Além disso, alguns componentes da parede celular desses microrganismos, como os oligossacarídeos expressos na forma de mananoproteínas, conferem efeitos benéficos ao organismo de animais monogástricos (BARBOSA, 2016). Os mananoligossacarídeos, contudo, não são digeridos no trato gastrointestinal e atuam como prebióticos, visto que previnem a colonização de bactérias patogênicas (UTIYAMA et al., 2006).

Outros componentes presentes nas células de levedura são importantes para o desenvolvimento e o bom funcionamento do organismo animal, como os nucleotídeos, que melhoram a digestibilidade e a absorção dos nutrientes, estimulando o sistema imunológico (ANDRADE et al., 2011). Dessa forma, a levedura proveniente da fermentação desempenha uma função crucial e aumenta o valor agregado do DDG, uma vez que melhora o valor nutritivo desse subproduto.

### **2.3. Utilização de leveduras para o consumo animal e humano**

Com o constante aumento da população global, a produção de alimentos ricos em proteínas tornou-se um desafio urgente, tanto para o consumo animal quanto para o consumo humano. Estima-se que a população atingirá 9,7 bilhões de pessoas até 2050, aumentando significativamente a demanda por fontes de proteínas (JACH et al., 2022). Nesse cenário, constantemente estão sendo projetadas novas estratégias científicas e nutricionais para o desenvolvimento de fontes alternativas de proteínas.

Os microrganismos despontam como opções tecnologicamente atraentes para a indústria alimentícia, visto que oferecem diversas vantagens e aplicações que contribuem para a produção eficiente. Dentre esses microrganismos, as leveduras se destacam como um dos

grupos mais explorados pelo ser humano, tanto em termos quantitativos quanto econômicos. Nenhum outro grupo de microrganismos está mais intimamente associado ao progresso e ao bem-estar humano do que as leveduras (HALÁSZ; LÁSZTITY, 2017). Do ponto de vista tecnológico, as leveduras apresentam vantagens em relação a outros microrganismos, graças à sua capacidade de assimilar uma ampla variedade de substratos, à sua alta velocidade de multiplicação e à facilidade de separação da sua biomassa (SPOLIDORIO et al., 2013).

As leveduras têm a capacidade única de utilizar uma ampla variedade de substratos para a produção eficiente de biomassa, proteína e concentrado de aminoácidos essenciais, como a lisina e a metionina, que são nutrientes limitados em muitos alimentos de origem vegetal e animal (SUMAN et al., 2015; UCHAKALWAR; CHANDAK, 2014). Esse aspecto versátil das leveduras favorece a sua utilização, visto que crescem mais rapidamente que plantas ou animais, produzindo grandes quantidades de biomassa a partir de quantidades relativamente pequenas de substratos, independentemente da estação do ano (ADEDAYO et al., 2011).

Diversos atributos benéficos são associados à inclusão de leveduras na dieta de animais bovinos, aves e na aquicultura (AGBOOLA et al., 2021; ABDELRAHMAN, 2013). Esses benefícios abrangem melhorias no ganho de peso corporal e eficiência alimentar, além do fortalecimento da saúde e da imunidade (ROZEBOOM et al., 2005). Em alguns casos, a utilização dessas leveduras destacou-se pela capacidade dos carboidratos presentes na parede celular prevenirem infecções entéricas (WALKER; JALUKAR; BRAKE, 2018). Além disso, esses carboidratos mitigam a liberação de agentes patogênicos (ADHIKARI et al., 2023).

A biomassa proteica resultante das leveduras pode ser uma alternativa valiosa em comparação com as fontes tradicionais. O uso estratégico da biomassa de levedura como suplemento nutricional pode oferecer uma solução importante para o desafio da escassez de alimentos, especialmente em países em desenvolvimento. Essa abordagem não apenas diversifica as fontes de nutrientes disponíveis, mas também oferece uma resposta sustentável às demandas crescentes por alimentos em todo o mundo (BAJIC et al., 2022).

#### **2.4. Leveduras: aspectos biológicos e metabólicos**

No contexto dos aspectos biológicos, as leveduras têm sido objeto de investigação intensiva devido à relação entre as funções metabólicas e as estruturas química e morfológica da célula. Essas características podem variar de acordo com o nutriente disponível, as condições ambientais, a idade ou o estado fisiológico das células (SAINZ et al., 2003). Dado que as células de leveduras são eucarióticas, elas compartilham funções fundamentais similares às células animais e vegetais (ZHAO, 2017).

As leveduras são compostas principalmente por carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), enxofre (S) e fósforo (P) presentes em macromoléculas, além de íons e elementos traços que desempenham papéis estruturais e funcionais no metabolismo das células (WALKER, 1998). A Tabela 2.1 apresenta os principais elementos necessários para esses microrganismos e suas respectivas funções.

Em relação ao metabolismo, é importante salientar que ele é atribuído ao somatório de todas as reações químicas que acontecem no interior de um organismo vivo. Quanto aos aspectos metabólicos, as leveduras são organismos aeróbios facultativos, o que significa que têm a capacidade de crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, adaptando seu metabolismo conforme a fonte de carbono e nitrogênio disponíveis. As fontes de carbono mais utilizadas pelas leveduras são os carboidratos, como glicose, frutose, maltose e sacarose. Além disso, algumas leveduras podem usar fontes de carbono não convencionais, como biopolímeros, ácidos graxos e ácidos orgânicos (RENVOISÉ et al., 2014).

As leveduras são, portanto, microrganismos reconhecidos como economicamente importantes devido a duas reações de rendimento energético: a fermentação e a respiração oxidativa. Esses dois processos metabólicos são catabólicos, dessa forma, envolvem a degradação de substratos para a liberação de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Essa produção de energia acontece em quantidades e efetividade diferentes, dependendo do tipo de metabolismo empregado (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006).

**Tabela 2.1-** Elementos nutricionais das leveduras e suas funções

Elemento	Fonte	Funções celulares
Carbono	Carboidratos	Estrutura e fonte de energia
Hidrogênio	Prótons provenientes no meio ácido	Força motriz para transporte de prótons através da membrana
Oxigênio	O <sub>2</sub> , ar	Substrato para a respiração envolvendo enzimas oxidativas, bem como síntese de ergosterol e outros ácidos graxos insaturados
Nitrogênio	Sais de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , uréia, aminoácidos	Presentes em proteínas, enzimas e ácidos nucleicos
Fósforo	Fosfatos	Estrutura de membranas e ácidos nucleicos
Potássio	Sais de K <sup>+</sup>	Balço iônico e atividade enzimática
Magnésio	Sais de Mg <sup>2+</sup>	Estrutura celular de organelas e atividade enzimática
Enxofre	Sulfatos	Aminoácidos e vitaminas
Cálcio	Sais de Ca <sup>2+</sup>	Mensageiro na modulação de respostas de crescimento e metabolismo
Cobre	Sais de Cu <sup>2+</sup>	Cofatores de enzimas da cadeia respiratória
Ferro	Sais de Fe <sup>3+</sup>	Citrocromos, cofatores de enzimas da cadeia respiratória
Manganês	Sais de Mn <sup>2+</sup>	Atividade enzimática
Zinco	Sais de Zn <sup>2+</sup>	Atividade enzimática
Níquel	Sais de Ni <sup>2+</sup>	Atividade da urease
Molibdênio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Metabolismo do nitrato e vitamina B <sub>12</sub>

Fonte: WALKER, 1998

Alguns fatores devem ser ponderados a fim de evitar o estresse nas células de leveduras, como a presença de etanol e de CO<sub>2</sub>, o estresse mecânico, a temperatura, o pH, a falta de nutrientes, o estresse osmótico, entre outros (RUIS; SCHULLER, 1995). Quando a levedura é exposta à alta osmolaridade, ela sofre modificações celulares resultantes das forças físico-mecânicas. Além disso, as células ativam processos de defesa primários para instigar a reparação e recuperação, provocando o restabelecimento da homeostase celular diante das novas circunstâncias (MAGER; SIDERIUS, 2002).

Em resposta à exposição da levedura à elevada osmolaridade do ambiente circundante, ocorre uma rápida perda de água intracelular nas células, resultando na diminuição da pressão de turgor e, conseqüentemente, no encolhimento celular. A *Saccharomyces cerevisiae* utiliza o

glicerol como seu principal soluto compatível, acumulando-o internamente para recuperar o turgor celular (HOHMANN; MAGER, 2007).

Esses fatores estressantes interferem também na concentração de carboidratos de reserva presentes na célula. No caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o glicogênio e a trealose são os carboidratos de reserva que desempenham um papel importante na manutenção da viabilidade, na proteção celular e no desenvolvimento de novas células (PAULILLO; YOKOYA; BASSO, 2003).

Em condições de limitação de carboidratos, o glicogênio é o principal carboidrato de reserva armazenado na célula. A trealose, apesar de ser considerada um estoque de energia, sua principal função é manter a integridade das membranas e das proteínas da levedura, o que confere proteção contra fatores ambientais estressantes (FRANÇA; PANEK; ELEUTHERIO, 2007). Nas circunstâncias em que as leveduras estão sendo cultivadas em meios desprovidos de nutrientes como o nitrogênio, o enxofre ou o fósforo, a velocidade de crescimento e o acúmulo desses carboidratos de reserva diminuem. O glicogênio e a trealose são acumulados principalmente na fase final de crescimento da levedura, quando a glicose ainda está sendo ofertada, mas não há disponibilidade de nitrogênio. Além disso, a levedura também armazena trealose quando é submetida à fermentação em temperatura elevada (DE VIRGILIO et al., 1994).

Com a acumulação da trealose, as leveduras adquirem a capacidade de enfrentar a dessecação quase completa, exibindo tolerância significativa a condições extremas, como exposição prolongada à radiação de alta energia e variações de temperatura (WOMERSLEY, 1981). Essas descobertas incentivaram o interesse em compreender os mecanismos pelos quais a trealose contribui para a proteção das leveduras, explorando as aplicações desse conhecimento no armazenamento de alimentos ou materiais biológicos sensíveis. Portanto, o papel da trealose na preservação celular está associado à prevenção de danos nas membranas, substituindo as moléculas de água que normalmente se encontram nas superfícies externa e interna da bicamada lipídica (ELEUTHERIO et al., 2015).

Quando as células são submetidas à ausência de fonte de energia, à temperatura elevada (37°C a 45°C) e à agitação constante, elas passam por um processo chamado de estarvação. Nessas condições, os carboidratos acumulados durante a fermentação tradicional são metabolizados, possibilitando a obtenção de energia para que as células realizem suas atividades biológicas. Dessa forma, as leveduras passam a realizar uma fermentação endógena, de modo que mais etanol é produzido. Além disso, o teor proteico da biomassa resultante

aumenta, visto que ocorre a diminuição da concentração de carboidratos por unidade de peso seco de levedura (GASCH; WERNER-WASHBURNE, 2002).

O processo de estarvação e a fermentação endógena provocam a perda de biomassa de levedura seca, no entanto, os ganhos com a recuperação do etanol e com o teor de proteínas são positivos. Ao final da fermentação endógena, o etanol é recuperado por deflegmação, e as leveduras são termolisadas. Geralmente, as células de levedura são submetidas a esses dois procedimentos quando as indústrias querem produzir biomassa com altos teores de proteínas, com o intuito de utilizá-las para a suplementação animal (FERREIRA; AMORIM; BASSO, 1999; THOMSSON; GUSTAFSSON; LARSSON, 2005).

## 2.5. *Saccharomyces cerevisiae*

De acordo com a National Center for Biotechnology Information (NCBI), a classificação taxonômica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é especificada como *Ascomycota*, pertencente à classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae*. Essa levedura é um dos organismos eucarióticos mais fáceis de cultivar e manipular, sendo provavelmente o mais bem compreendido. Dessa forma, é considerada um microrganismo seguro e um modelo ideal para estudar o mecanismo de bioabsorção, alta capacidade de absorção de metais e alta produção de biomassa (FOROUGH et al., 2022).

O gênero *Saccharomyces* constitui um grupo de leveduras de vasto conhecimento humano, e a espécie mais conhecida é a *cerevisiae*, muito utilizada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de biocombustíveis. Além de ser utilizada para a fabricação de produtos, essas leveduras podem ser incorporadas na dieta de animais para serem utilizadas como suplemento alimentar, a fim de melhorar o desempenho desses organismos. As leveduras têm de 34 a 46% de proteínas e são ricas em vitamina B, além de serem altamente digeríveis (VIEIRA, 2016).

A *Saccharomyces cerevisiae* utiliza preferencialmente a glicose em vez de outras fontes de carbono, pois esta pode entrar diretamente na via glicolítica. Quando a glicose não está disponível, entretanto, fontes alternativas de carbono são utilizadas para a produção de energia metabólica e biomassa celular (TURCOTTE et al., 2009). A temperatura ideal para o crescimento ótimo da levedura é entre 25 e 35°C. O pH ideal para o desenvolvimento desses microrganismos é entre 4,5 e 5,5 (KUNDIYANA, 2010).

Uma das linhagens que compõe as preparações comerciais de leveduras secas utilizadas para a produção de álcool combustível e de bebidas alcoólicas é a *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup>. Segundo a Lallemand Biofuels & Distilled Spirits (LBDS), essa linhagem foi desenvolvida com o intuito de ser utilizada em fermentações com altas concentrações de glicose

e de álcool. Ela é capaz de tolerar altos níveis de ácidos orgânicos, além de possuir melhores índices de produtividade e eficiência industrial, produzindo mais etanol em menos tempo.

## **2.6. Minerais: funções e importância na alimentação animal**

Os minerais fazem parte da categoria de nutrientes que são fundamentais na alimentação animal, pois participam de diversas funções metabólicas. Esses elementos integram as estruturas de biomoléculas, influenciam no crescimento e na manutenção de tecidos, atuam como cofatores enzimáticos, ativam ações hormonais, regulam a pressão osmótica e o equilíbrio ácido-base, entre outras funções cruciais (SUTTLE, 2022). Frequentemente a suplementação mineral se faz necessária devido à baixa biodisponibilidade desses elementos na alimentação animal (PATRA; LALHRIATPUII, 2020).

Os minerais podem ser classificados considerando seus requisitos e funções no organismo. Os macrominerais são assim denominados devido os organismos necessitarem de uma grande quantidade deles, enquanto os microminerais ou minerais traços são exigidos em menores quantidades (LALL; KAUSHIK, 2021). Os principais macrominerais são o cálcio, o fósforo, o potássio, o enxofre, o sódio, o cloro e o magnésio. Já os microminerais que participam de funções metabólicas em animais são o ferro, o zinco, o cobre, o iodo, o manganês, o cobalto, o molibdênio e o selênio (SILVA, 2017).

De maneira geral, os minerais desempenham quatro categorias principais de funções nos organismos: estruturais, participando na formação das estruturas que compõem órgãos e tecidos do corpo; fisiológicas, auxiliando na regulação da pressão osmótica e no equilíbrio ácido-base; catalisadoras, atuando como catalisadores enzimáticos, coenzimas ou componentes específicos da estrutura de metaloenzimas e hormônios; e funções de regulamentação, envolvendo o controle da replicação e diferenciação celular (WU, 2017).

Minerais orgânicos são resultantes da combinação de um ou mais minerais com substâncias orgânicas, tais como os aminoácidos, carboidratos e proteínas. Essas ligações com compostos orgânicos favorecem uma absorção quase completa, visto que suas associações com os compostos orgânicos dificultam a sua dissociação à medida que passa pelo sistema digestivo, elevando assim a biodisponibilidade (BYRNE et al., 2021). Além disso, os minerais orgânicos destacam-se por sua estabilidade, elevada disponibilidade biológica, ausência de complicações decorrentes de interações com outros nutrientes da dieta e maior tolerância pelo organismo animal, resultando em uma atividade aprimorada (CONDÉ, 2014).

## 2.7. Zinco: propriedades elementares, aspectos metabólicos e fisiológicos

A nutrição é um dos fatores que influenciam diretamente no funcionamento dos organismos, por isso os sistemas vivos contam com vários macronutrientes e micronutrientes capazes de auxiliar na manutenção dos mesmos. Entre os micronutrientes, o zinco (Zn) é um oligoelemento essencial para sustentar a vida. Ele regula diversos processos bioquímicos e fisiológicos nos seres vivos, além de atuar sobre o metabolismo intermediário dos nutrientes (CUNHA et al., 2022).

O zinco participa de diversas atividades biológicas no corpo, uma vez que atua como componente estrutural enzimático ou agente catalítico nas reações enzimáticas (GAUDRÉ, 2016); está envolvido no metabolismo de lipídios, carboidratos, proteínas, entre outros elementos (BANASZAK; GÓRNA; PRZYSLAWSKI, 2021); participa da regulação do apetite (RAMIAH, 2020); além de atuar na produção e secreção de hormônios (BESERRA, 2021.). Esse micromineral também está associado ao estresse oxidativo por ser cofator de enzimas como a superóxido dismutase, enzima que ajuda a diminuir o desenvolvimento de radicais livres (BALTACI; MOGULKOC; BALTACI, 2019).

O zinco é o segundo elemento vestigial mais importante para a saúde animal, ou seja, são necessárias pequenas quantidades desse micronutriente para assegurar um crescimento e desenvolvimento adequados (SINGH; AGARWAL, 2021). A privação prolongada e severa de zinco resulta em sérios prejuízos ao sistema imunológico e aumenta a incidência de infecções intestinais (GAMMOH; RINK, 2017). Por outro lado, a administração adequada de zinco tem a capacidade de tratar doenças e reverter os sintomas da deficiência desse metal (HAASE; OVERBECK; RINK, 2008).

O zinco é um elemento essencial para o crescimento e para o metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*. Em particular, o zinco atua como cofator e como componente estrutural em muitas enzimas, incluindo a álcool desidrogenase, enzima terminal do caminho da fermentação (RAJ; RAMASWAMY; PLAPP, 2014). Por apresentarem uma parede celular complexa, as leveduras possuem um sítio adicional de adsorção, quando comparadas às células desprovidas de parede. Esse processo de adsorção está sujeito à disponibilidade de grupos funcionais na superfície da célula e depende também da natureza do metal. Alguns fatores podem interferir na seletividade da captura do metal pela célula, como a concentração de íons livres, o cátion metálico, a eletronegatividade e a carga do ligante (AMIRNIA; MARGARITIS; RAY, 2012).

As leveduras demonstram a capacidade de absorver o zinco em suas células por meio de um processo bifásico de acumulação. A primeira fase, denominada de captura passiva ou

metabolismo independente, envolve a adsorção do metal à superfície da célula. Posteriormente, ocorre a segunda fase, conhecida como captura ativa ou metabolismo dependente, na qual há um acúmulo ativo mediado por ATP através da membrana plasmática (NAIK et al., 2022; DE NICOLA et al., 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um sistema de transporte composto por transportadores de baixa e alta afinidade. Os transportadores de baixa afinidade têm pouca participação na restituição das necessidades dos metais e são menos seletivos com relação aos metais transportados. Por outro lado, os transportadores de alta afinidade são seletivos para seus metais e são meticulosamente regulados de acordo com o metal específico pretendido. Vale ressaltar que a levedura em questão possui múltiplos transportadores de zinco que permitem a absorção desse metal (GUERINOT, 2000).

A homeostase do zinco em leveduras acontece através dos transportadores de membrana ZRT1 e ZRT2, sendo o primeiro um transportador de alta afinidade e o segundo um transportador de baixa afinidade, ambos regulados por um fator de transcrição denominado Zap1, principal molécula reguladora da homeostase de zinco (SCHNEIDER et al., 2015). O transportador de zinco ZRT1 é expresso sob condições de deficiência do metal no citoplasma, enquanto o transportador ZRT2 é expresso em resposta ao excesso de zinco. Após estar dentro do citoplasma, o metal se liga às metaloproteínas ou é transportado para as organelas, como as mitocôndrias (GITAN, 1998).

Nas células que apresentam alta concentração de zinco em seu interior, os transportadores ZRT1p e ZRT2p deslocam o zinco para dentro dos vacúolos, no qual ele é armazenado, evitando que a célula atinja níveis elevados desse metal em seu citoplasma (TRISTÃO et al., 2014). Em contrapartida, quando o zinco se torna limitante e a célula se encontra em uma situação de escassez desse metal, a atividade de Zap1 aumenta a transcrição dos genes dos transportadores ZRT1, ZRT2 e ZRT3. Assim, o zinco armazenado nos vacúolos pode ser mobilizado para o citoplasma através do transportador de zinco vacuolar ZRT3p, a fim de abastecer a quantidade de zinco lábil (EIDE, 2003).

Se os níveis celulares de zinco aumentarem consideravelmente, como acontece quando células com deficiência desse metal são expostas a concentrações elevadas, o zinco intracelular irá desencadear a endocitose dos transportadores ZRT1p e ZRT2p. Essas proteínas serão posteriormente degradadas no vacúolo. Dessa forma, a homeostase do zinco é mantida por meio de um equilíbrio entre os sistemas de regulação da transcrição e pós transcrição, bem como as proteínas transportadoras que eles controlam (GAITHER; EIDE, 2001).

## 2.8. Suplementação de leveduras com zinco

Atualmente, existem muitos estudos que relatam a suplementação de diversas linhagens de leveduras com nutrientes minerais (PANKIEWICZ et al., 2017; HOU et al., 2020; MOTA et al., 2022). Nos últimos anos, o interesse na incorporação de minerais traço na forma orgânica para a alimentação animal tem crescido, diminuindo a ocorrência da adição na forma inorgânica. Este interesse tem sido estimulado devido os resultados de pesquisas que mostram a melhora no crescimento, na reprodução e na sanidade dos animais alimentados com minerais orgânicos (ULLAH et al., 2020; MAYASULA, 2022).

A espécie de zinco (orgânica ou inorgânica), influencia na disponibilidade e absorção do íon metálico no trato intestinal, sendo importante a escolha de um suplemento de zinco adequado para cada organismo (BROWN et al., 2004). Compostos de zinco baseados em matrizes ricas em proteínas, como as leveduras enriquecidas, são considerados fontes promissoras desse mineral. Além da elevada biodisponibilidade para micronutrientes e do alto valor proteico, as vantagens da levedura englobam o cultivo simples e rápido, proporcionando uma grande quantidade de biomassa em curto prazo (MEENA et al., 2020). A produção de leveduras enriquecidas em zinco pode ser realizada por meio do cultivo das células em substratos ricos em zinco, nos quais esse elemento é natural incorporado à biomassa de células de leveduras vivas (DE NICOLA; WALKER, 2011).

A incorporação de metais às leveduras pode ser realizada por meio da indução de alterações celulares causadas por ambientes adversos, impelindo as células a evoluírem adaptativamente. A estratégia da evolução adaptativa simplifica experimentos, envolvendo a cultura prolongada de células em ambientes propícios para a seleção natural das que adquirem mutações benéficas. A evolução adaptativa é muito estudada em microrganismos devido à facilidade de manutenção de grandes populações celulares, alta taxa de divisão e tamanho genômico, garantindo uma ampla diversidade genética (SHENDURE et al., 2017). O aumento do sequenciamento de DNA e a engenharia genômica impulsionaram essa abordagem, permitindo a identificação de mutações e a introdução de modificações desejadas nas cepas. Ao ser fundamentada na seleção natural, a evolução adaptativa enriquece mutantes mais aptos, permitindo otimização da linhagem sem conhecimento prévio das alterações genéticas necessárias (ARNOLD, 2018).

A biomassa enriquecida com zinco é um suplemento nutricional promissor para este micronutriente essencial (MAARES et al., 2022). As leveduras possuem capacidade de enriquecimento de elementos metálicos. Dessa forma, elas são capazes de acumular zinco em suas próprias estruturas celulares, obtendo esse metal a partir de soluções aquosas, e

convertendo zinco inorgânico em orgânico. Esse processo torna a produção em larga escala facilmente reproduzível e economicamente vantajosa, quando comparada com a síntese de outros suplementos orgânicos de zinco (GHAREKHANI et al., 2015).

## Referências

- ABDELRAHMAN, Mutassim Mohamed. Effects of feeding dry fat and yeast culture on broiler chicken performance. **Turkish journal of veterinary & animal sciences**, v. 37, n. 1, p. 31-37, 2013.
- ADEDAYO, M.; AJIBOYE, E.; ODAIBO, A. Single cell proteins: as nutritional enhancer. **Adv. Appl. Sci. Res**, v. 2, n. 5, p. 396-409, 2011.
- ADHIKARI, P. A. et al. Effect of enzyme-modified yeast products on *Salmonella Enteritidis* colonization in different organs of laying hens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 32, n. 2, p. 100277, 2023.
- AGBOOLA, Jeleel Opeyemi et al. Yeast a major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 2, p. 949-970, 2021.
- ALIZADEH, M. et al. Effect of yeast-derived products and distillers dried grains with solubles (DDGS) on growth performance and local innate immune response of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 334-345, 2016.
- AMIRNIA, Shahram; MARGARITIS, Argyrios; RAY, Madhumita B. Adsorption of mixtures of toxic metal ions using non-viable cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 43-63, 2012.
- ANDRADE, Carla de et al. Levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 788-796, 2011.
- ARNOLD, Frances H. Directed evolution: bringing new chemistry to life. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 16, p. 4143-4148, 2018.
- AZAD, S. Kamran; SHARIATMADARI, Farid; TORSHIZI, MA Karimi. Production of zinc-enriched biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Elementology**, v. 19, n. 2, 2014.
- BAJIC, Bojana et al. Biotechnological production of sustainable microbial proteins from agro-industrial residues and by-products. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 107, 2022.
- BALTACI, Abdulkerim Kasim; MOGULKOC, Rasim; BALTACI, Saltuk Bugra. The role of zinc in the endocrine system. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 32, n. 1, 2019.

- BANASZAK, Michalina; GÓRNA, Ilona; PRZYŚLAWSKI, Juliusz. Zinc and the innovative zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein adipokine play an important role in lipid metabolism: A critical review. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 2023, 2021.
- BARBOSA, José Guilherme Morschel. **Efeitos da suplementação de levedura autolisada de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desempenho e a imunidade intestinal de frangos de corte**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BESERRA, Jéssica Batista et al. Relation between zinc and thyroid hormones in humans: a systematic review. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 11, p. 4092-4100, 2021.
- BENITES-LAZARO, L. L.; MELLO-THÉRY, N. A.; LAHSEN, M. Business storytelling about energy and climate change: The case of Brazil's ethanol industry. **Energy research & social science**, v. 31, p. 77-85, 2017.
- BROWN, Kenneth H. et al. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document 1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. **Food and nutrition bulletin**, v. 25, n. 1 Suppl 2, p. S99-S203, 2004.
- BYRNE, Laurann et al. Influence of the chelation process on the stability of organic trace mineral supplements used in animal nutrition. **Animals**, v. 11, n. 6, p. 1730, 2021.
- CONDÉ, M. S. et al. Minerais quelatados na nutrição de suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 11, n. 4, p. 3547-3565, 2014.
- CUNHA, Thais A. et al. Association between zinc and body composition: An integrative review. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, p. 126940, 2022
- DA SILVA, Anderson Luís; CASTAÑEDA-AYARZA, Juan Arturo. Macro-environment analysis of the corn ethanol fuel development in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 135, p. 110387, 2021.
- DE FREITAS, Silene Maria et al. Situação Atual e Perspectivas da Produção Brasileira de Etanol de Milho, 2018.
- DE JONG, Sierk et al. Life-cycle analysis of greenhouse gas emissions from renewable jet fuel production. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 1-18, 2017.
- DE NICOLA, Raffaele et al. Zinc accumulation and utilization by wine yeasts. **International Journal of Wine Research**, 2009.
- DE NICOLA, Raffaele; WALKER, Graeme M. Zinc interactions with brewing yeast: impact on fermentation performance. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 69, n. 4, p. 214-219, 2011.
- De VIRGILIO, C.; HOTTIGER, T.; DOMINGUEZ, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The role of trahalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast I. Genetic evidence

that trehalose is a thermoprotectant. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.219, p. 179-86, 1994

EIDE, David J. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1532S-1535S, 2003.

ELEUTHERIO, Elis et al. Revisiting yeast trehalose metabolism. **Current Genetics**, v. 61, p. 263-274, 2015.

FERREIRA, L. V.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Fermentation of endogenous trehalose and glycogen by *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Science and Technology**, v. 19, p. 29-32, 1999.

FOROUGH, Saraei et al. Application of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from industrial effluent for zinc biosorption and zinc-enriched SCP production for human and animal. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022.

FRANÇA, Mauro B.; PANEK, Anita D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Oxidative stress and its effects during dehydration. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 621-631, 2007.

GAITHER, L. Alex; EIDE, David J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. **Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis: Recent Insights and Current Trends**, p. 65-84, 2001.

GAMMOH, Nour Zahi; RINK, Lothar. Zinc in infection and inflammation. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 624, 2017.

GASCH, Audrey P.; WERNER-WASHBURN, Margaret. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. **Functional & integrative genomics**, v. 2, p. 181-192, 2002.

GAUDRÉ, D. et al. Nutritional zinc requirements in growing-finishing pigs are there options for reducing mineral-form dietary zinc? **Cahiers de l'IFIP**, v. 3, n. 1, p. 9-17, 2016.

GHAREKHANI, A. et al. Effect of dietary supplementation with zinc enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on immunity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Iranian journal of veterinary research**, v. 16, n. 3, p. 278, 2015.

GITAN, Raad S. et al. Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 44, p. 28617-28624, 1998.

GRANGEIA, Carolina; SANTOS, Luan; LAZARO, Lira Luz Benites. The Brazilian biofuel policy (RenovaBio) and its uncertainties: An assessment of technical, socioeconomic and institutional aspects. **Energy Conversion and Management: X**, v. 13, p. 100156, 2022.

GUERINOT, Mary Lou. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1465, n. 1-2, p. 190-198, 2000.

- HAASE, Hajo; OVERBECK, Silke; RINK, Lothar. Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: current status and future perspectives. **Experimental gerontology**, v. 43, n. 5, p. 394-408, 2008.
- HALÁSZ, Anna; LÁSZTITY, Radomir. **Use of yeast biomass in food production**. CRC Press, 2017.
- HOHMANN, Stefan; MAGER, Willem H. (Ed.). **Yeast stress responses**. Springer Science & Business Media, 2007.
- HOU, Lele et al. Selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* improves the meat quality of broiler chickens via activation of the glutathione and thioredoxin systems. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6045-6054, 2020.
- JACH, Monika Elżbieta et al. Yeast protein as an easily accessible food source. **Metabolites**, v. 12, n. 1, p. 63, 2022.
- KEMMET, N. et al. RFA- Renewable Fuels Association. RFA Board of Directors: Ethanol Industry Outlook 2023. Washington, DC., 2023.
- KUNDIYANA, Dimple K. et al. Influence of temperature, pH and yeast on in-field production of ethanol from unsterilized sweet sorghum juice. **Biomass and bioenergy**, v. 34, n. 10, p. 1481-1486, 2010.
- LALL, Santosh P.; KAUSHIK, Sadasivam J. Nutrition and metabolism of minerals in fish. **Animals**, v. 11, n. 09, p. 2711, 2021.
- LIU, KeShun; ROSENTRATER, Kurt A. (Ed.). **Distillers grains: production, properties, and utilization**. CRC press, 2016.
- MAARES, Maria et al. Zinc availability from zinc-enriched yeast studied with an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 71, p. 126934, 2022.
- MAGER, Willem H.; SIDERIUS, Marco. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.
- MANOCHIO, C. et al. Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 743-755, 2017.
- MAYASULA, Venkata Krishnaiah et al. Organic zinc and copper supplementation–associated changes in gene expression and protein profiles in buck spermatozoa. **Biological Trace Element Research**, p. 1-14, 2022.
- MEENA, Kunal et al. Mineral-enriched yeast biomass: A promising mineral food and feed supplement. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2020. p. 155-170.
- MENDIBURU, Andrés Z. et al. Ethanol as a renewable biofuel: Combustion characteristics and application in engines. **Energy**, v. 257, p. 124688, 2022.

- MILANEZ, Artur Yabe et al. **A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política.** <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/1921>, 2014.
- MOHAMMADI SHAD, Zeinab; VENKITASAMY, Chandrasekar; WEN, Zhiyou. Corn distillers dried grains with solubles: production, properties, and potential uses. **Cereal Chemistry**, v. 98, n. 5, p. 999-1019, 2021.
- MOREIRA, Marcelo MR et al. Socio-environmental and land-use impacts of double-cropped maize ethanol in Brazil. **Nature Sustainability**, v. 3, n. 3, p. 209-216, 2020.
- MOTA, Layna Amorim et al. Ability of the *Saccharomyces cerevisiae* Y904 to tolerate and adapt to high concentrations of selenium. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 16, 2022.
- NAIK, R. Purshotham et al. Effect of different zinc sources and concentrations on the biomass yield of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Biological Trace Element Research**, p. 1-4, 2022.
- NEVES, Marcos Fava (org.). **Etanol de milho: Cenário atual e perspectivas para a cadeia no Brasil.** Ribeirão Preto: UNEM, 2021. *E-book* (116p.) color. ISBN: 978-65-00-21078-1. Disponível em: [https://www.sna.agr.br/wp-content/uploads/2021/05/Etanol-de-Milho-no-Brasil-Fava-Neves-et-al-2021\\_compressed.pdf](https://www.sna.agr.br/wp-content/uploads/2021/05/Etanol-de-Milho-no-Brasil-Fava-Neves-et-al-2021_compressed.pdf). Acesso em: 21 ago. 2023.
- PANKIEWICZ, Urszula et al. Effect of pulsed electric fields (PEF) on accumulation of selenium and zinc ions in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1361-1370, 2017.
- PATRA, Amlan; LALHRIATPUII, Melody. Progress and prospect of essential mineral nanoparticles in poultry nutrition and feeding: a review. **Biological Trace Element Research**, v. 197, n. 1, p. 233-253, 2020.
- PAULILLO, Silene Cristina de Lima; YOKOYA, Fumio; BASSO, Luiz Carlos. Mobilization of endogenous glycogen and trehalose of industrial yeasts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 249-254, 2003.
- PEREIRA, Lucas G. et al. Comparison of biofuel life-cycle GHG emissions assessment tools: The case studies of ethanol produced from sugarcane, corn, and wheat. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 110, p. 1-12, 2019.
- RAJ, Savarimuthu Baskar; RAMASWAMY, S.; PLAPP, Bryce V. Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. **Biochemistry**, v. 53, n. 36, p. 5791-5803, 2014.
- RAMIAH, Suriya Kumari et al. Effects of zinc oxide nanoparticles on regulatory appetite and heat stress protein genes in broiler chickens subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 10, p. skaa300, 2020.
- RENVOISÉ, Margaux et al. Quantitative variations of the mitochondrial proteome and phosphoproteome during fermentative and respiratory growth in. 2014.

- RODRIGUES, Fernando; LUDOVICO, Paula; LEÃO, Cecília. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**, p. 101-121, 2006.
- ROZEBOOM, D. W. et al. Effects of mannan oligosaccharide and an antimicrobial product in nursery diets on performance of pigs reared on three different farms. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 11, p. 2637-2644, 2005.
- RUIS, Helmut; SCHÜLLER, Christoph. Stress signaling in yeast. **Bioessays**, v. 17, n. 11, p. 959-965, 1995.
- SAINZ, Javier et al. Modelagem do metabolismo de leveduras e dinâmica de processos em fermentação descontínua. **Biotecnologia e bioengenharia**, v. 81, n. 7, pág. 818-828, 2003.
- SANDBERG, Troy E. et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. **Metabolic Engineering**, v. 56, p. 1-16, 2019.
- SCHNEIDER, Rafael de Oliveira et al. Effects of zinc transporters on *Cryptococcus gattii* virulence. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.
- SHENDURE, Jay et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. **Nature**, v. 550, n. 7676, p. 345-353, 2017.
- SILVA, FILIPE AGUIAR E. Avaliação do consumo e determinação da mobilidade mineral em bovinos suplementados com fontes quelatadas e inorgânicas de microneráteis, 2017.
- SINGH, N. B.; AGARWAL, Anupam; UZO-GOD, Onuegbu Chris. Zinc nanomaterials: A safe animal feed supplement. **Zinc-Based Nanostructures for Environmental and Agricultural Applications**, p. 385-401, 2021.
- SPOLIDORIO, Denise M. Palomari et al. **Microbiologia e Imunologia Geral e Odontológica-Vol. 1-Série Abeno**. Artes Médicas Editora, 2013.
- SUMAN, Gour et al. Single cell protein production: a review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 9, p. 251-262, 2015.
- SUTTLE, Neville. **Mineral nutrition of livestock**. GB: Cabi, 2022.
- THERMOSACC DRY. **Lallemand Biofuels & Distilled Spirits**. 2022. Disponível em: <<https://www.lbds.com/en/asia-pacific/products/thermosacc-dry/>>. Acesso em: 22 de agosto de 2022.
- THOMSSON, Elisabeth; GUSTAFSSON, Lena; LARSSON, Christer. Starvation response of *Saccharomyces cerevisiae* grown in anaerobic nitrogen-or carbon-limited chemostat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3007-3013, 2005.
- TRISTÃO, Gabriel Brum et al. Identificação de metaloproteínas associadas a cobre, ferro e zinco codificadas pelos genomas de *Paracoccidioides* spp. 2014.

- TURCOTTE, Bernard et al. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 1, p. 2-13, 2009.
- UCHAKALWAR, P. R.; CHANDAK, A. M. Production of single cell protein from fruits waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 5, n. 4, p. 770-776, 2014.
- ULLAH, Aman et al. Zinc application in combination with zinc solubilizing *Enterobacter* sp. MN17 improved productivity, profitability, zinc efficiency, and quality of desi chickpea. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, p. 2133-2144, 2020.
- USMANI, Rahil Akhtar; MOHAMMAD, Abdul Saboor; ANSARI, Sameer Shakeel. Comprehensive biofuel policy analysis framework: A novel approach evaluating the policy influences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 183, p. 113403, 2023.
- UTIYAMA, Carlos Eduardo et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2359-2367, 2006.
- VIEIRA, Vanessa Amaro. **Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) na alimentação de vacas da raça Jersey**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista.
- WALKER, G. K.; JALUKAR, S.; BRAKE, J. The effect of refined functional carbohydrates from enzymatically hydrolyzed yeast on the transmission of environmental *Salmonella* Senftenberg among broilers and proliferation in broiler housing. **Poultry Science**, v. 97, n. 4, p. 1412-1419, 2018.
- WALKER, G.W. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley, 1998.
- WOMERSLEY, Christopher. A micromethod for the extraction and quantitative analysis of "free" carbohydrates in nematode tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 1, p. 182-189, 1981.
- WU, Guoyao. **Principles of animal nutrition**. crc Press, 2017.
- ZHAO, Richard Yuqi. Yeast for virus research. **Microbial Cell**, v. 4, n. 10, p. 311, 2017.



### 3. CAPACIDADE DAS LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*, LINHAGEM THERMOSACC<sup>®</sup>, DE TOLERAR ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO DE ZINCO POR MEIO DA EVOLUÇÃO ADAPTATIVA

#### Resumo

As leveduras são um grupo versátil de microrganismos eucarióticos, que são amplamente aplicados em processos biotecnológicos de diversos setores e apresentam a capacidade de agregar minerais às células. Entre esses minerais, o zinco destaca-se como o segundo elemento vestigial mais importante para o funcionamento adequado de vários organismos. Nesse contexto, o emprego de leveduras enriquecidas com zinco emerge como um promissor suplemento alimentar. Essa abordagem aumenta o valor agregado das células e fornece os benefícios do micronutriente, como o aprimoramento do sistema imune e regulação do metabolismo intermediário de nutrientes, entre outros. Diante disso, o objetivo desse estudo foi investigar a concentração máxima de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup> tolera no meio de cultivo e, a partir desta informação, induzir à evolução adaptativa desse microrganismo a concentrações mais elevadas de zinco. Foi analisado o desenvolvimento das leveduras em diferentes concentrações de  $\text{ZnSO}_4$  (0, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500  $\text{mg L}^{-1}$ ) no meio de cultivo YEPD (yeast, extract, peptone and dextrose). Em seguida, foram realizados aumentos gradativos do micronutriente a cada novo ciclo, em concentrações crescentes de 5  $\text{mg L}^{-1}$ . Os parâmetros investigados durante a pesquisa incluíram a contagem total de microrganismos, o tempo necessário para o crescimento das leveduras, a viabilidade celular e as características morfológicas das células. No ensaio de tolerância observou-se que as leveduras apresentaram crescimento em meio com até 1250  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , embora tenham exibido aumento no tempo de geração, quando comparadas ao grupo controle (0  $\text{mg L}^{-1}$ ). Após o processo adaptativo, as leveduras adquiriram a capacidade de se desenvolver em meio com até 1400  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , todavia, houve redução gradual na quantidade de células vivas à medida que a concentração de sulfato de zinco foi aumentada no meio de cultivo. Além disso, o estudo utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que as células adaptadas apresentaram alterações na parede celular em resposta ao estresse osmótico exercido pelo zinco. Conclui-se que, as leveduras da linhagem Thermosacc<sup>®</sup> foram capazes de evoluir adaptativamente em meio de cultivo com altas concentrações de sulfato de zinco, o que pode possibilitar perspectivas para novas aplicações biotecnológicas e desenvolvimento de produtos enriquecidos nos minerais.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, Enriquecimento, Zinco, Evolução adaptativa, Tempo de geração.

#### Abstract

#### **Ability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Thermosacc<sup>®</sup> strain, to tolerate high concentrations of zinc sulphate through adaptive evolution**

Yeasts are a versatile group of eukaryotic microorganisms that are widely used in biotechnological processes in various sectors and have the ability to add minerals to their cells. Among these minerals, zinc stands out as the second most important trace element for the proper

functioning of various organisms. In this context, the use of zinc-enriched yeasts is emerging as a promising food supplement. This approach increases the added value of the cells and provides the benefits of the micronutrient, such as improving the immune system and regulating the intermediate metabolism of nutrients, among others. The aim of this study was to investigate the maximum concentration of zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4$ ) that the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup> can tolerate in the culture medium and, based on this information, to induce the adaptive evolution of this microorganism to higher concentrations of zinc. The development of yeasts in different concentrations of  $\text{ZnSO}_4$  (0, 250, 500, 750, 1000, 1250 and 1500  $\text{mg L}^{-1}$ ) in the YEPD (yeast, extract, peptone and dextrose) medium was analyzed. Gradual increases of the micronutrient were then made with each new cycle, at increasing concentrations of 5  $\text{mg L}^{-1}$ . The parameters investigated during the research included the total count of microorganisms, the time required for yeast growth, cell viability and the morphological characteristics of the cells. In the tolerance test, it was observed that the yeasts grew in a medium containing up to 1250  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{ZnSO}_4$ , although they showed an increase in generation time when compared to the control group (0  $\text{mg L}^{-1}$ ). After the adaptive process, the yeasts acquired the ability to grow in medium with up to 1400  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{ZnSO}_4$ , however, there was a gradual reduction in the amount of live cells as the concentration of zinc sulphate was increased in the culture medium. In addition, the study using scanning electron microscopy (SEM) revealed that the adapted cells showed changes in the cell wall in response to the osmotic stress exerted by zinc. It can be concluded that the yeasts of the Thermosacc<sup>®</sup> strain were able to evolve adaptively in a culture medium with high concentrations of zinc sulphate, which could provide prospects for new biotechnological applications and the development of products enriched in the mineral.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Enrichment, Zinc, Adaptive evolution, Generation time.

### 3.1. Introdução

As leveduras são microrganismos conhecidos pela sua importância nos processos biotecnológicos, sendo exploradas ao longo de milênios para o benefício da humanidade. Apresentam a capacidade de produzir ou modificar diversos produtos para variadas aplicações, como alimentos fermentados, bebidas, enzimas industriais, biocombustíveis, proteínas unicelulares, entre outros. Além disso, estudos ressaltam que as leveduras podem ser utilizadas para expandir a produção agrícola, impulsionar a produção de medicamentos, atuar na melhoria do ambiente e fortalecer a resistência a doenças (OBAEDA, 2021).

Entre as espécies de leveduras amplamente utilizadas, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*, em virtude de apresentar propriedades industriais desejáveis, como rápido crescimento, metabolismo eficiente para o consumo de diversos substratos e elevada produtividade, gerando quantidades significativas de produtos em períodos relativamente curtos (GOMBERT; VAN MARIS, 2015). Essa espécie também possui a capacidade de tolerar diversos fatores de estresse ambiental e adquirir mutações genéticas por meio da seleção natural em condições de cultivo adversas, evoluindo de forma adaptativa (POSTARU et al., 2023; SANDBERG et al., 2019).

As leveduras ainda apresentam a característica intrínseca de acumular minerais em suas células, podendo ser utilizadas como veículos promissores para fornecer alguns micronutrientes para a alimentação humana e animal (MAYASULA et al., 2021). Dentro desse contexto, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* tornou-se um modelo biológico para o estudo de transporte de minerais e seu acúmulo nas células, devido à sua simplicidade de cultivo e à alta disponibilidade de células para a realização de experimentos, mas principalmente por apresentar organização celular semelhante às demais células eucarióticas (FONSECA, 2021).

Os minerais compõem as estruturas de biomoléculas, interferem no crescimento e na manutenção de tecidos, participam como cofatores enzimáticos, ativam ações hormonais, regulam a pressão osmótica e o equilíbrio ácido-base, além de desempenhar outras funções (SUTTLE, 2022). Dentre os minerais, o zinco se destaca por ser um oligoelemento essencial para sustentar a vida, uma vez que participa de diversos processos biológicos e fisiológicos nos seres vivos, além de atuar sobre o metabolismo intermediário dos nutrientes (CUNHA et al., 2022).

O zinco é um elemento essencial para o crescimento e para o metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*; no entanto, quantidades excessivas desse mineral podem ser potencialmente tóxicas para as células, causando danos à função que essas desempenham (CHENG et al., 2017). Estudos indicam a possibilidade de enriquecer células de leveduras com esse micronutriente, porém é importante estabelecer a concentração adequada de zinco no meio de cultivo, principalmente para compreender melhor a resposta das leveduras e otimizar seu desenvolvimento (WANI et al., 2023).

O enriquecimento de células de leveduras em zinco possibilita aumentar o valor agregado desses microrganismos, sendo uma estratégia sustentável para garantir suplementação nutricional, principalmente em regiões que sofrem com o déficit desse micronutriente. Por esses motivos, o objetivo desse estudo foi determinar a concentração de sulfato de zinco tolerada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, seguida da adaptação a altas concentrações desse metal por meio da evolução adaptativa, a fim de obter microrganismos enriquecidos em zinco capazes de representar uma fonte nutricional adequada.

## **3.2. Material e Métodos**

### **3.2.1. Local da pesquisa**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (LTSBio), situado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (Setor de Açúcar e Alcool) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

### 3.2.2. Estudo da tolerância da *Saccharomyces cerevisiae* ao sulfato de zinco

Para os ensaios de tolerância, foi utilizada a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, desidratada, viva (93% de viabilidade celular), mantida sob vácuo, obtida no comércio internacional. Como fonte de zinco, foi utilizada uma solução de sulfato de zinco heptaidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), a qual foi incorporada no meio de cultura YEPD (yeast, extract, peptone and dextrose), composto por 0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar ( $\text{m v}^{-1}$ ).

Todos os materiais foram submetidos à esterilização em autoclave (121°C, 1 atm, 20 min) para prevenir a incidência de contaminação. As soluções de  $\text{ZnSO}_4$  foram preparadas e autoclavadas separadamente, a fim de evitar que os metais fossem complexados com as substâncias do meio de cultivo durante a esterilização; as concentrações dessas soluções variaram de acordo com a quantidade de micronutriente a ser adicionado no meio de cultivo. Os procedimentos foram conduzidos em condições assépticas, dentro de uma câmara de fluxo laminar.

Os tratamentos apresentaram as concentrações indicadas na Tabela 3.1. O cultivo foi realizado em quadruplicatas, em placas de Petri contendo 20 mL de substrato e 100  $\mu\text{L}$  de inóculo. Para isso, foi realizada uma pré-ativação das leveduras em uma solução de glicose (20  $\text{g L}^{-1}$ ), na qual foi inoculada com 3% de levedura ( $\text{m v}^{-1}$ ). Posteriormente, foram feitas diluições seriadas e as diluições de  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  foram plaqueadas pelo método de *spread-plate*, que consistiu em espalhar o material com o auxílio de esferas de vidro, fazendo a semeadura por toda a superfície da placa. As placas foram incubadas a  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  durante 48 h, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (ASSUNÇÃO, 2011; MOTA et al., 2022).

**Tabela 3.1-** Tratamentos estudados no ensaio de tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, ao ZnSO<sub>4</sub>.

Tratamento	Concentração de ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )
T0 (Controle)	0
T1	250
T2	500
T3	750
T4	1000
T5	1250
T6	1500

A análise de tolerância consistiu em avaliar o aparecimento de colônias até completarem as 48 h, considerando que as células de levedura que cresceram até esse período foram tolerantes à concentração de sulfato de zinco contida no meio. Quando, no entanto, as colônias não foram formadas até o período estipulado, a concentração de zinco incorporada ao meio foi considerada tóxica para as células de leveduras (ASSUNÇÃO, 2011; MOTA et al., 2022).

### 3.2.3. Estudo da adaptação da *Saccharomyces cerevisiae* em meio enriquecido com sulfato de zinco

Com base nos resultados obtidos no estudo de tolerância, a concentração máxima na qual as leveduras se desenvolveram foi estipulada como o ponto inicial do processo de adaptação. No primeiro ciclo, a adaptação iniciou com o meio de cultivo YEPD contendo a concentração pré-estabelecida de sulfato de zinco. Posteriormente, foram realizados aumentos gradativos do micronutriente a cada novo ciclo, em concentrações crescentes de 5 mg L<sup>-1</sup>, totalizando 31 ciclos.

O estudo de adaptação foi realizado em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio YEPD em sua forma líquida, sendo inoculados 3% de levedura (m v<sup>-1</sup>). A incubação ocorreu em agitador *shaker*, com agitação constante de 120 rpm, em ambiente com temperatura controlada (30°C ± 2°C). Após ser atingida a concentração celular na ordem de 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup> do inóculo, verificada por meio de microscopia óptica, 10% do volume do reator foi centrifugado (4000 rpm, 10 min, 25°C) e a biomassa foi transferida para o meio com a próxima concentração de zinco (ROEPCKE, 2007).

O aumento progressivo da concentração de zinco nos demais meios de cultivo foi realizado conforme descrito anteriormente no Item 3.2.3. Foi considerado um ciclo de

adaptação para cada cultivo em diferente concentração de zinco. Dessa forma, a adaptação iniciou com a concentração de 1250 mg L<sup>-1</sup> e finalizou com 1400 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. Nesta etapa, foram estudados dois tratamentos com 6 repetições, em que T0 consistiu em uma concentração de 0 mg L<sup>-1</sup>, enquanto o tratamento T1 variou a concentração de ZnSO<sub>4</sub> a cada novo ciclo.

### 3.2.3.1. Viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular e da concentração de células da população de leveduras foi realizada por meio da coloração diferencial de células vivas e mortas, utilizando a análise microscópica de uma suspensão das leveduras coradas com azul de metileno 0,1%, conforme descrito Pierce (1970). Para realizar esse procedimento, uma alíquota de 500 µL de cada repetição dos tratamentos foi coletada e diluída 10 vezes em água destilada. Em seguida, 300 µL da diluição foram transferidos para um tubo contendo 300 µL de azul de metileno 0,1% (diluição 2x), e essa nova suspensão foi homogeneizada em um agitador de tubos (IKA, modelo MS 3 Digital). Posteriormente, 10 µL da suspensão foram transferidos para uma câmara de Neubauer, que foi levada para a contagem das células em microscópio óptico (Nikon®) com objetiva de 40x (aumento de 400x). As células coradas foram identificadas como mortas, enquanto as incolores foram consideradas viáveis. Os parâmetros foram calculados utilizando as Equações 3.1 e 3.2.

$$V (\%) = \frac{\text{número de células incolores}}{\text{número de células incolores} + \text{número de células coradas}} \times 100$$

Equação 3.1

$$N^{\circ} \text{células/mL} = \text{média do total de células} \times 2,5 \times 10^5 \times \text{diluição}$$

Equação 3.2

### 3.2.3.2. Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para observar as mudanças na morfologia das células adaptadas, os tratamentos com concentrações média e máxima de zinco foram analisados em microscópio eletrônico de varredura. Para isso, a biomassa de cada tratamento foi armazenada em um microtubo Eppendorf contendo o fixador Karnovsky modificado (2,5% de gluceraldeído, 2,5% de formaldeído, tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2 CaCl<sub>2</sub> 0,001M). Para o preparo das amostras, foi adicionada uma gota de poli-L-lisina na lamínula, que permaneceu em repouso por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada uma gota da amostra em suspensão, que ficou em repouso por 30 minutos. As lamínulas foram colocadas na gaiola, e as amostras passaram por desidratação com a adição de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e

100%), cada concentração por um período de 30 minutos, sendo a última repetida 3 vezes. Posteriormente, as amostras foram secas até o ponto crítico (CO<sub>2</sub>). Finalmente, as lamínulas foram fixadas nos stubs e submetidas ao processo de metalização, permitindo a visualização das amostras no microscópio eletrônico de varredura com aumento de 14000 vezes (KITAJIMA, 1999).

### 3.2.4. Estatística e análise dos resultados

O delineamento experimental utilizado nos ensaios foi o inteiramente casualizado. O programa estatístico Origin, versão 2022b (OriginLab Corporation), foi utilizado para gerar os gráficos. No caso do experimento de adaptação, o gráfico de regressão linear foi criado utilizando o programa estatístico SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software Inc., 2018).

## 3.3. Resultados e Discussão

### 3.3.1. Estudo da tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, à presença de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>)

A partir do estudo da tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de sulfato de zinco, foi possível observar alterações no tempo de crescimento do microrganismo. Os resultados indicam que os tratamentos T0, T1, T2 e T3 apresentaram a formação de colônias após 24 h de incubação; em contrapartida, os tratamentos T4 e T5 desenvolveram colônias apenas depois de 48 h. Considerando o comportamento observado, é admissível supor que a levedura estudada apresentou aumento do tempo de geração, ocasionado pela presença do zinco no meio de cultivo. Por outro lado, não foi observado crescimento de colônias no tratamento T6, conforme mostrado na Figura 3.1.

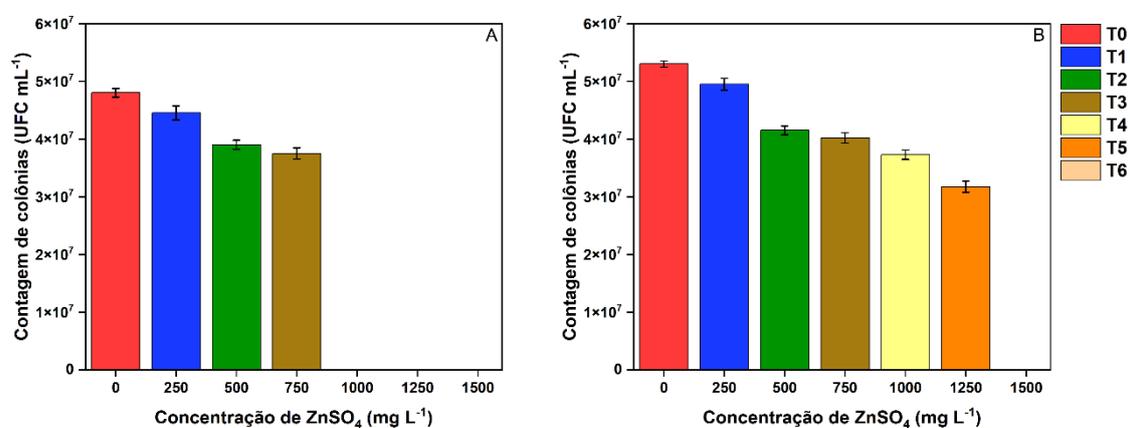
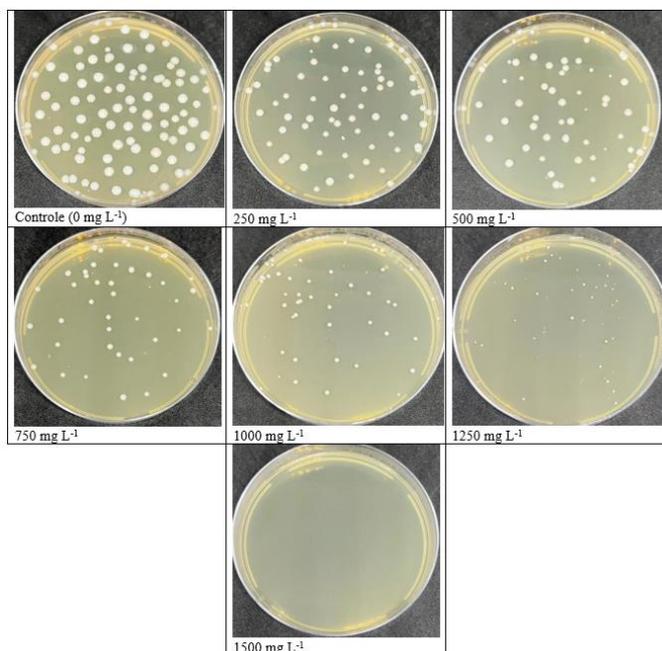


FIGURA 3.1- Contagem de unidades formadoras de colônias de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup> em meio YEPD com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub>. (A) Contagem após 24 h de

incubação a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . (B) Contagem após 48 h de incubação a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As contagens foram realizadas na diluição  $10^{-6}$ .

O tratamento controle (T0) foi aquele que apresentou maior número de colônias, com  $5,3 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  após 48 h de incubação, seguido dos demais tratamentos com  $4,95 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (T1),  $4,15 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (T2),  $4,02 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (T3),  $3,72 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (T4) e  $3,17 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (T5). Esses resultados indicam que o zinco apresentou efeito inibitório sobre a velocidade do crescimento e multiplicação das células, uma vez que o número de colônias formadas ao fim do período de incubação diminuiu à medida que a concentração de  $\text{ZnSO}_4$  aumentou, conforme pode ser visualizado na Figura 3.2.



**Figura 3.2-** Crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup>, em meio YEPD, inoculadas na diluição  $10^{-6}$ , após 48 h de incubação a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Devido à ausência de colônias na concentração de  $1500 \text{ mg L}^{-1}$ , foi necessário definir novos tratamentos com concentrações contidas dentro dos intervalos previamente estudados. Dessa forma, foram introduzidos os tratamentos T7 ( $1300 \text{ mg L}^{-1}$ ) e T8 ( $1400 \text{ mg L}^{-1}$ ) a fim de verificar o aparecimento de colônias de leveduras nessas novas concentrações ajustadas. Após a inoculação e a incubação das placas, foi observada a ausência de crescimento de colônias nas condições experimentais de ambos os tratamentos. Como o T1 ( $1250 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi tratamento de concentração máxima em que se obteve crescimento celular dentro do tempo estimado de incubação (48 h), essa foi, portanto, a quantidade de sulfato de zinco tolerada pela levedura.

Resultados semelhantes aos deste estudo foram observados por Belucco (2008) ao investigar a tolerância de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em meio YEPD

enriquecido com diferentes concentrações de sulfato de zinco (0, 200, 400, 800, 1000 e 1200 mg L<sup>-1</sup>). No estudo, verificou-se que o crescimento das leveduras e o tempo de formação das colônias também foram alterados à medida que o zinco foi acrescentado ao meio. Assim, o autor concluiu que a concentração máxima tolerada pela levedura estudada foi de 800 mg L<sup>-1</sup> e que o tempo necessário de incubação (30°C ± 1°C) para o aparecimento das colônias foi de 48 h. No mesmo estudo, foi observada também a diminuição do número de colônias e do tamanho delas com o aumento do zinco.

No estudo desenvolvido por García-Béjar et al. (2020), foi avaliado o crescimento de quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (EB21, EB34, EB57, EB83) em YEPD suplementado com diferentes concentrações de nitrato de zinco (1, 25, 50, 75 e 100 mg L<sup>-1</sup>), incubadas a 30°C por 120 h. Os autores classificaram o crescimento dessas leveduras como forte ou fraco, chegando à conclusão de que apenas duas das cepas estudadas foram capazes de tolerar a suplementação de até 100 mg L<sup>-1</sup> de Zn (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Os autores afirmaram que a tolerância ao zinco está diretamente relacionada à estirpe e ao sal utilizado, inferindo que o desempenho do crescimento é afetado quando algum desses fatores é alterado. Isso também foi relatado por Muñoz et al. (2012), em que estudaram o crescimento de diferentes espécies de leveduras em meios contendo zinco e verificaram que a toxicidade do metal apresentou diferentes níveis.

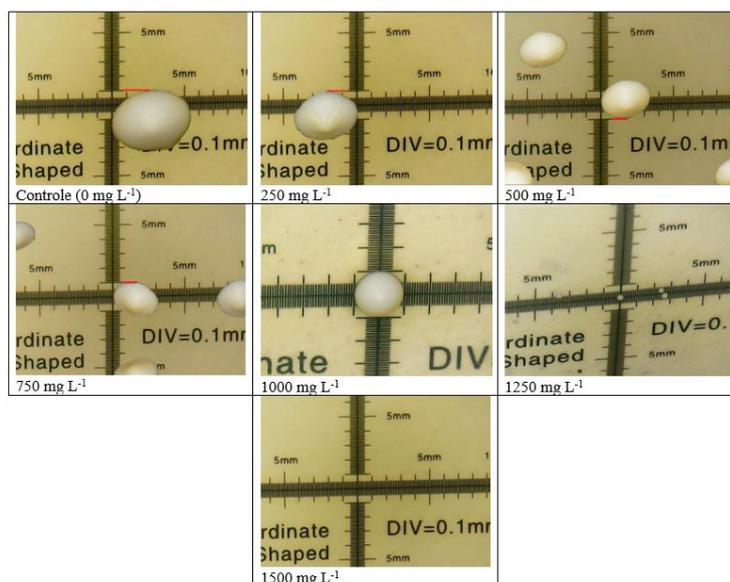
Naik et al. (2022) investigaram o impacto de diferentes fontes e concentrações de zinco no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* SC 3455. Os autores examinaram três sais de zinco (cloreto, nitrato e sulfato) em concentrações de 0, 300, 600, 900 e 1200 mg L<sup>-1</sup>, incorporados ao meio YEPD. Nesse estudo, foi observado que, independentemente da fonte, à medida que a concentração de zinco aumentava, ocorria uma redução no crescimento celular. No entanto, os autores relataram que houve diferença na intensidade do efeito do zinco nas células quando as fontes foram comparadas entre si, sendo que o sulfato apresentou efeito mais brando. De acordo com os pesquisadores, a diminuição no crescimento das células ocorreu devido à concentração elevada do íon zinco no substrato, o que pode ter afetado a permeabilidade das membranas ao potássio, resultando na diminuição do crescimento da levedura.

A presença de íons de Zn<sup>2+</sup> em quantidades adequadas no meio de cultivo aumenta a taxa de crescimento das células de levedura, bem como a produção de etanol. No entanto, uma concentração elevada desses íons em um substrato nutritivo pode ser tóxica, provocando diminuição do crescimento da levedura e afetando a sua capacidade fermentativa (STEHLIK-TOMAS et al., 2004). Segundo Zhao; Bai (2012), o excesso de zinco é tóxico para a célula de levedura e deve ser controlado dentro de um intervalo de concentração adequado.

Além da variação no tempo de formação das colônias durante o ensaio de tolerância, foi possível observar a existência de colônias com tamanhos variados, também decorrente da alteração no tempo de geração das leveduras. Para analisar esse parâmetro, foi considerado o tempo de incubação de 48 h, e os valores correspondentes estão expressos na Tabela 3.2, podendo ser visualizados por meio da Figura 3.3.

**Tabela 3.2-** Tamanhos das colônias de *Saccharomyces cerevisiae* Themossacc®, em mm, formadas após 48 h de incubação a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Tratamento	Concentração de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Tamanho do diâmetro (mm)
T0 (Controle)	0	5,1 – 5,4
T1	250	4,0 – 4,3
T2	500	3,2 – 3,4
T3	750	2,7 – 3,0
T4	1000	1,8 – 2,0
T5	1250	0,1 – 0,3
T6	1500	-



**Figura 3.3-** Colônias de *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc® em meio YEPD com diferentes concentrações de  $\text{ZnSO}_4$ , inoculadas na diluição  $10^{-6}$ , observadas por microscópio digital monocular (aumento de 5x) após 48 h de incubação a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Em um estudo conduzido por Galván Márquez et al. (2018), foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de óxido de zinco ( $0,1 - 1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e nanopartículas de prata ( $0,003 - 0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em células de *Saccharomyces cerevisiae* S288C, cultivadas em meio YEPD

(30°C, 48 h). Conforme os resultados do estudo, as nanopartículas causaram redução de 30% no tamanho das colônias formadas, quando comparadas ao controle (sem adição de metais). Os autores concluíram que esse impacto foi atribuído à inibição do crescimento da levedura na presença das micropartículas, sendo que o ZnO afetou a função e a integridade da parede celular, enquanto a exposição à Ag diminuiu a transcrição, reduziu a endocitose e levou a um sistema de transporte de elétrons disfuncional.

Diversos estudos mostram que o efeito inibitório no crescimento de leveduras é exercido também pelo excesso de outros metais, como é o caso do selênio (MOTA et al., 2022; RAJASHREE; MUTHUKUMAR, 2013; ASSUNÇÃO, 2011), do cobre (BERTERAME et al., 2018; FERREIRA, 2015; ADAMO et al., 2012) e do ferro (SORRIBES-DAUDEN et al., 2022; RESENDE, 2012; BLUMER, 2002). De acordo com Babele (2019), as células eucarióticas empregam diversos mecanismos para regular o equilíbrio de compostos dentro da célula, como o acúmulo em organelas e a desintoxicação. Uma vez que os metais não podem ser degradados como os compostos tóxicos orgânicos, eles acabam sendo acumulados nas células e interferem na fisiologia celular. Muitos metais, incluindo o zinco, podem influenciar na fluidez da membrana, o que contribui para a sua toxicidade (KIM; KIM; KUMAR, 2019).

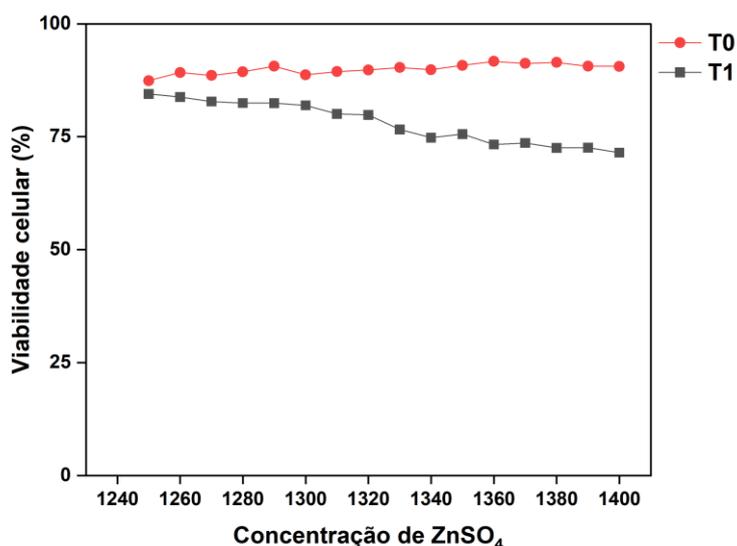
Essas referências ressaltam a importância de estabelecer a faixa ideal de concentração de sulfato de zinco no meio de cultivo, principalmente para aprofundar a compreensão da resposta da levedura em estudo.

### **3.3.2. Estudo de adaptação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, a elevadas concentrações de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>)**

Os resultados do estudo de tolerância permitiram estabelecer a concentração de 1250 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de zinco para iniciar o processo de adaptação. A partir do cultivo de adaptação das leveduras, com o aumento gradativo da concentração de sulfato de zinco no meio, foi possível induzir o aumento da tolerância das células à concentração ZnSO<sub>4</sub>, passando de 1250 mg L<sup>-1</sup> para 1400 mg L<sup>-1</sup>. Com esse resultado, pode-se afirmar que as leveduras evoluíram de forma adaptativa, uma vez que adquiriram a capacidade de crescer em meio com uma concentração de zinco superior à encontrada no ensaio de tolerância.

O processo adaptativo teve duração de 464,76 h e, apesar da adaptação evolutiva alcançada, foi possível observar que os parâmetros analisados sofreram alterações. A Figura 3.4 apresenta os valores de viabilidade celular ao longo dos ciclos de adaptação. Foi observado que, à medida que a concentração de zinco aumentou no meio de cultivo, a quantidade de células metabolicamente ativas diminuiu. O tratamento T1 iniciou o processo de adaptação com

84,48%  $\pm$  0,44 e, ao final do ciclo 31, apresentou 71,46%  $\pm$  0,45 de viabilidade celular. Por outro lado, como o controle (T0) não foi submetido ao efeito do ZnSO<sub>4</sub>, esse grupo manteve as células ativas e teve um acréscimo na viabilidade, iniciando o primeiro ciclo com 87,42%  $\pm$  0,49 e finalizando o último ciclo com 90,67%  $\pm$  0,21. Segundo Zhao et al. (2020), além de apresentar toxicidade para o crescimento celular, o excesso de zinco no meio de cultivo pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma celular, causando danos a várias moléculas biológicas, induzindo à peroxidação lipídica e resultando na morte celular.



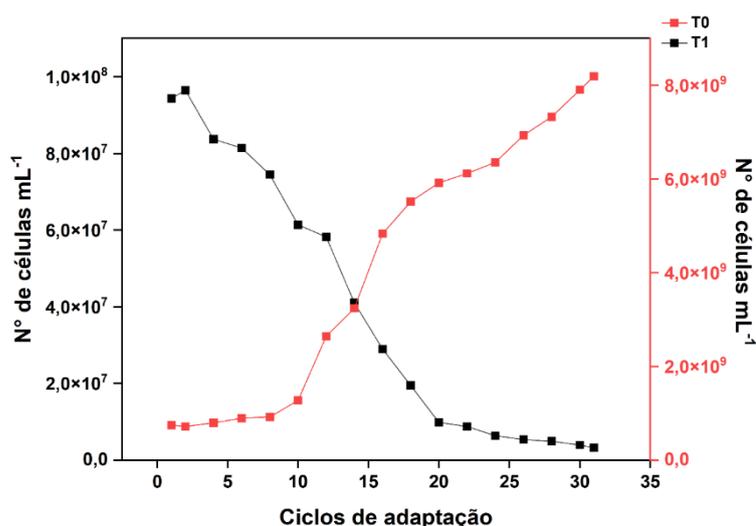
**Figura 3.4-** Viabilidade celular após cada ciclo de adaptação sob 30°C  $\pm$  2°C e 120 rpm, levando em consideração concentrações crescentes de ZnSO<sub>4</sub> e diferentes tempos de incubação.

No que diz respeito ao período de crescimento das leveduras para atingir uma concentração de 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup>, foi observado que as células apresentaram resistência ao desenvolvimento quando submetidas às maiores concentrações de ZnSO<sub>4</sub>, exigindo um tempo maior para completarem um ciclo de adaptação, conforme descrito resumidamente na Tabela 3.3. Resultados semelhantes foram observados por Shet et al. (2011) quando testaram dois métodos de enriquecimento de *Saccharomyces cerevisiae* com sulfato de zinco. No primeiro método, adicionaram a solução de zinco no início da inoculação da levedura no mosto de YEPD, enquanto no segundo, adicionaram o zinco após 24 h de incubação (250 rpm, 30°C). Em ambos os métodos foram avaliadas as concentrações de 0,0574 g L<sup>-1</sup>, 0,143 g L<sup>-1</sup> e 1,4372 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. Os autores verificaram que o zinco adicionado ao meio, independentemente do modo de adição utilizado, inibiu o crescimento celular das leveduras e aumentou o tempo de geração das mesmas.

**Tabela 3.3-** Resumo do tempo de crescimento das leveduras durante os ciclos de adaptação

Ciclo de adaptação	Concentração de ZnSO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)
1	1250	10
5	1270	10,67
10	1295	11,5
15	1320	13,92
20	1345	15,58
25	1370	19,17
30	1395	21,67
31	1400	22,33

Quanto à concentração celular, no primeiro ciclo, a presença de íons de Zn<sup>2+</sup> aumentou a taxa de crescimento das células de levedura, uma vez que a concentração estava próxima à tolerada. Após o segundo ciclo, porém, foi identificada uma redução do número de células, resultado que persistiu ao longo dos 31 ciclos, conforme representado na Figura 3.5. Em contrapartida, as leveduras do grupo controle registraram um aumento de 1 log no decorrer dos 31 ciclos, visto que não tiveram a interferência do zinco no crescimento celular.



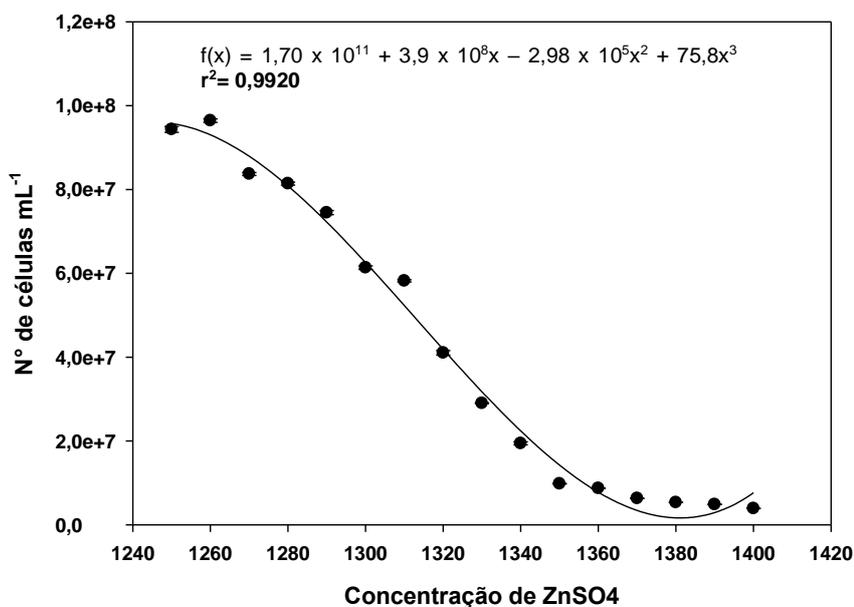
**Figura 3.5-** Concentração celular após cada ciclo de adaptação sob 30°C ± 2°C e 120 rpm, levando em consideração concentrações crescentes de ZnSO<sub>4</sub> e diferentes tempos de incubação.

Em um estudo realizado por Gorter et al. (2016), foi investigada a dinâmica de adaptação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* expostas a mudanças graduais e abruptas na

concentração de cloreto de zinco no meio de cultivo. Os pesquisadores constataram que a levedura estudada apresentou evolução contínua na presença de altas concentrações do mineral, mas a alteração do meio de cultivo afetou a sobrevivência da população. Os resultados deste estudo corroboram com aqueles do estudo de Gorter et al. (2016), haja vista que a viabilidade e a concentração celular das leveduras foram decrescentes à medida que os níveis de sulfato de zinco foram aumentando.

Ainda conforme relatado por Gorter et al. (2016), a mudança gradual da concentração de  $ZnCl_2$  permitiu maior adaptação quando comparada com a mudança abrupta de zinco no meio. Isso se deve ao impacto das pequenas alterações, que provocaram mutações na estrutura do genoma das leveduras, induzindo à evolução adaptativa e resultando em maior capacidade de tolerância ao metal. Em termos gerais, a maioria dos metais apresenta potencial mutagênico baixo e não causa danos diretos, mas pode desencadear a interferência em moléculas e sistemas de reparo do DNA (WYSOCKI; TAMÁS, 2010).

Com o objetivo de analisar se o efeito do  $ZnSO_4$  no crescimento celular foi significativo, realizou-se a regressão linear para os dados referentes ao T1, e a curva obtida melhor se ajustou em uma equação cúbica, conforme mostrado na Figura 3.6. O aumento da concentração de zinco apresentou significância na diminuição da concentração celular, visto que  $p < 0,0001$ .

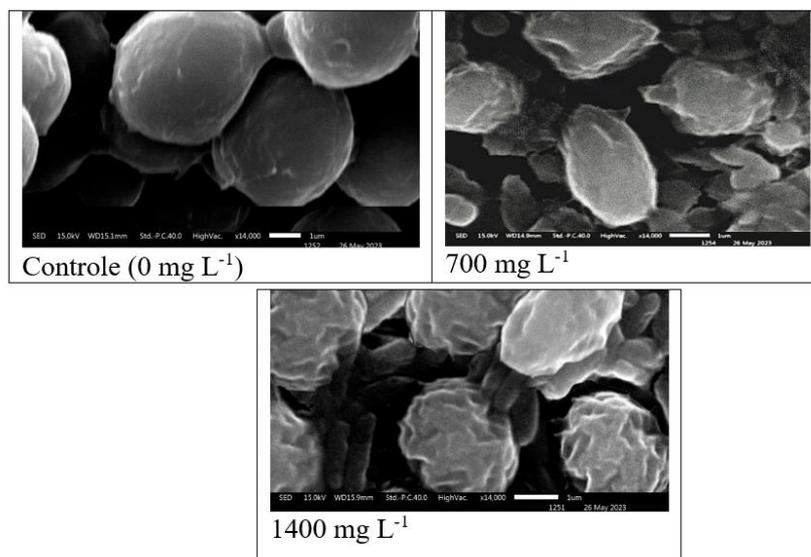


**Figura 3.6-** Curva de regressão linear para T1, submetido ao aumento gradativo de  $ZnSO_4$

Em um estudo realizado por Sheyki et al. (2018), investigou-se o efeito de diferentes concentrações de zinco no crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, levando em consideração uma fonte orgânica (zinco-treonina) e uma fonte inorgânica (sulfato de zinco). Os pesquisadores avaliaram três concentrações de ambas as substâncias (2,5, 5 e 7,5 g L<sup>-1</sup>), no qual inocularam 1 % de levedura (m v<sup>-1</sup>) em meio YEPD e realizaram a incubação por 48 h (160 rpm, 27,4 °C). De acordo com esse estudo, a presença de zinco, independente da sua forma, afetou negativamente o crescimento das leveduras em comparação ao grupo controle (sem adição de zinco). Os autores verificaram ainda que à medida que as concentrações de zinco aumentaram, as contagens de células de levedura diminuíram significativamente em relação ao controle. Dessa forma, concluiu-se que a velocidade de divisão celular sofreu redução devido à presença do zinco no meio. O presente estudo corrobora com esses resultados, visto que, após a adaptação, a quantidade de células viáveis do T0 foi maior que a do T1.

Barbulescu et al. (2010) investigaram o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ICCF 349 e *Saccharomyces bayanus* ICCF 385 na presença de diferentes concentrações de cobre, zinco e manganês (1000 mg L<sup>-1</sup> e 1250 mg L<sup>-1</sup>). Os autores constataram que, nas concentrações mais altas dos microelementos, as células de levedura de ambas as espécies tiveram as viabilidades afetadas e tornaram-se inativas do ponto de vista biológico. Como resultado, a concentração celular também foi alterada com o aumento dos minerais no meio de cultivo.

Além do impacto na viabilidade, concentração celular e tempo de geração, o cultivo das leveduras em meio com altas concentrações de ZnSO<sub>4</sub> causou mudanças na morfologia das células enriquecidas em zinco, como evidenciado nas imagens de microscopia eletrônica de varredura apresentadas na Figura 3.7. Após a adaptação, foi observada a redução no tamanho das células e o surgimento de rugosidades na parede celular. Essas alterações podem ser atribuídas à influência do sal de zinco no meio, o qual modifica a pressão osmótica exercida nas células de levedura durante o cultivo (HOHMANN; MAGER, 2007). De acordo com Kliss et al. (2002), as leveduras têm a capacidade de ajustar sua parede celular e alterar o volume em resposta a choques osmóticos. Esse fenômeno ocorre devido ao aumento da osmolaridade externa, que resulta na entrada de solutos e na saída de água da célula (SERRANO; RODRIGUEZ-NAVARRO, 2001).



**Figura 3.7-** Microscopia Eletrônica de Varredura das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup> adaptadas em meio YEPD com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub>, após incubação sob 30°C ± 2°C e 120 rpm.

O comportamento morfológico das células adaptadas neste estudo indica que as leveduras foram afetadas pelo estresse osmótico imposto pelo sulfato de zinco. Resultados semelhantes foram obtidos por Mota et al. (2022), que investigaram o efeito de diferentes concentrações de selenito de sódio (60, 120 e 240 mg L<sup>-1</sup>) no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* Y904. Os autores verificaram que a adição do sal ao meio provocou enrugamento da parede celular, alterando o formato das células, enquanto as células do grupo controle (sem adição de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) não sofreram modificações. Os resultados do presente estudo corroboram com os apresentados por Mota et al. (2022), uma vez que os autores concluíram que a formação de sulcos na parede celular foi uma resposta ao estresse osmótico.

Em uma pesquisa realizada por Saldanã et al. (2021), células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram inoculadas em meio contendo diferentes concentrações de cloreto de potássio. As células submetidas a diferentes osmolaridades apresentaram evidente redução de volume, perdendo sua forma esférica e exibindo uma superfície rugosa. Por outro lado, as leveduras cultivadas na ausência de KCl, mantiveram sua superfície lisa e um formato arredondado. Bankar et al. (2018) encontraram resultados similares em um estudo realizado com *Yarrowia lipolytica*, cultivada em meio enriquecido com nanopartículas de zinco. Os autores constaram alterações na morfologia das leveduras devido ao estresse causado pelo metal, com a diminuição no diâmetro e no volume das células à medida que zinco foi adicionado ao meio.

Os parâmetros analisados ao longo deste estudo evidenciam as modificações pelas quais as leveduras passaram para preservar a sua sobrevivência diante do estresse induzido pelo enriquecimento do meio de cultivo com sulfato de zinco. Essas alterações refletem a capacidade intrínseca das leveduras de ajustar seus processos fisiológicos para se adaptarem a condições ambientais adversas (TSE; WIENS; REANEY, 2021).

### 3.4. Conclusão

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, demonstrou a capacidade de crescer e tolerar 1250 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de zinco incorporado no meio de cultivo YEPD. Além disso, o processo de adaptação dessas leveduras permitiu induzir a evolução adaptativa, possibilitando a tolerância de até 1400 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. O processo adaptativo, contudo, alterou as funções fisiológicas das células, ocasionando redução da divisão celular e aumento do tempo de geração. Por fim, a presença do sulfato de zinco causou mudanças morfológicas nas células adaptadas, uma vez que a pressão osmótica exercida pelo ZnSO<sub>4</sub> alterou o volume da célula e a superfície da parede celular.

A tolerância e adaptação de leveduras em meios com altas concentrações de zinco sugerem que os resultados encontrados nesse estudo estão consistentes e que o comportamento da cepa estudada frente ao zinco, ainda não reportada na literatura, é semelhante ao de outras linhagens de leveduras submetidas ao enriquecimento com esse micronutriente.

### Referências

- ADAMO, Giusy Manuela et al. Laboratory evolution of copper tolerant yeast strains. **Microbial cell factories**, v. 11, p. 1-11, 2012.
- ASSUNÇÃO, Mónica Alexandra da Silva. **Avaliação da tolerância ao selênio de diferentes espécies de leveduras em ensaios de fermentação**. 2011. Tese de Doutorado. ISA/UTL.
- BABELE, Piyoosh Kumar. Zinc oxide nanoparticles impose metabolic toxicity by de-regulating proteome and metabolome in *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 64-73, 2019.
- BABELE, Piyoosh Kumar et al. Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemosphere**, v. 213, p. 65-75, 2018.
- BANKAR, Ashok et al. Morphological response of *Yarrowia lipolytica* under stress of heavy metals. **Canadian journal of microbiology**, v. 64, n. 8, p. 559-566, 2018.

- BARBULESCU, I. D. et al. Obtaining yeast biomass enriched with copper, zinc and manganese. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 1, p. 5008-5016, 2010.
- BELLUCO, André Eduardo de Souza. **Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação nutricional e probiótico**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BERTERAME, Nadia Maria et al. Copper homeostasis as a target to improve *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to oxidative stress. **Metabolic Engineering**, v. 46, p. 43-50, 2018.
- BLUMER, Solange Aparecida Groppo. **Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CHENG, Cheng et al. Development of stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains by metabolic engineering: New aspects from cell flocculation and zinc supplementation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 123, n. 2, p. 141-146, 2017.
- CORREA, Fabiane Fernanda de Barros. Desenvolvimento de um bioprocesso utilizando-se resíduos para produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* e etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. 2015.
- CUNHA, Thais A. et al. Association between zinc and body composition: An integrative review. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, p. 126940, 2022.
- FERREIRA, Dayvison Soares. **Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae***. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- FONSECA, Marina Wajsenzon da et al. Estudo do potencial antioxidante da própolis verde, do artepelin C e do ácido rosmarínico sobre a funcionalidade mitocondrial em células de *Saccharomyces cerevisiae*. 2021.
- GALVÁN MÁRQUEZ, Imelda et al. Zinc oxide and silver nanoparticles toxicity in the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0193111, 2018.
- GARCÍA-BÉJAR, Beatriz et al. Study of the bioremediatory capacity of wild yeasts. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 11265, 2020.
- GOMBERT, Andreas K.; VAN MARIS, Antonius Ja. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current opinion in biotechnology**, v. 33, p. 81-86, 2015.
- GORTER, Florian A. et al. Dynamics of adaptation in experimental yeast populations exposed to gradual and abrupt change in heavy metal concentration. **The American Naturalist**, v. 187, n. 1, p. 110-119, 2016.
- HOHMANN, Stefan; MAGER, Willem H. (Ed.). **Yeast stress responses**. Springer Science & Business Media, 2007.

- KIM, Jong-Joo; KIM, You-Sam; KUMAR, Vijay. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. **Journal of Trace elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 226-231, 2019.
- KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2. ed. Piracicaba. NAP/MEPA ESALQ. 48p. 1999.
- KLIS, Frans M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.
- MAYASULA, Venkata K. et al. Trace minerals for improved performance: a review of Zn and Cu supplementation effects on male reproduction in goats. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 1-8, 2021.
- MOTA, Layna Amorim et al. Ability of the *Saccharomyces cerevisiae* Y904 to tolerate and adapt to high concentrations of selenium. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 16, 2022.
- MUÑOZ, A. J. et al. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 210, p. 325-332, 2012.
- NAIK, R. Purshotham et al. Effect of Different Zinc Sources and Concentrations on the Biomass Yield of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. **Biological Trace Element Research**, p. 1-4, 2022.
- OBAEDA, B. A. Yeasts as a source of single cell protein production: A review. **Plant Archives**, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2021.
- PIERCE, J. S. (1970), Analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Inst. of Brew**, 76, 442-443.
- POSTARU, Madalina et al. Cellular stress impact on yeast activity in biotechnological processes: a short overview. **Microorganisms**, v. 11, n. 10, p. 2522, 2023.
- RAJASHREE, K.; MUTHUKUMAR, T. Preparation of selenium tolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, n. 3, p. 46-53, 2013.
- RESENDE, Thaís Prata Terra de. Avaliação da ação de complexos de ferro na tolerância ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae*. 2012.
- ROEPCKE, Clarisse Brunning Schmitt. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico, 2007.
- SALDAÑA, Carlos et al. Alterações rápidas e reversíveis no volume celular em resposta ao estresse osmótico em leveduras. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 52, p. 895-903, 2021.

- SANDBERG, Troy E. et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. **Metabolic Engineering**, v. 56, p. 1-16, 2019.
- SERRANO, Ramón; RODRIGUEZ-NAVARRO, Alonso. Ion homeostasis during salt stress in plants. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 4, p. 399-404, 2001.
- SHET, Anil R. et al. Enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* with zinc and their impact on cell growth. **Biotechnol. Bioinf. Bioeng**, v. 1, n. 4, p. 523-527, 2011.
- SHEYKHI, Farogh et al. The effect of different concentrations of organic and inorganic zinc on the growth and zinc content in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Biological Journal of Microorganism**, v. 7, n. 28, p. 103-109, 2018.
- SORRIBES-DAUDEN, Raquel et al. Adaptation of *Saccharomyces* species to high-iron conditions. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 22, p. 13965, 2022.
- STEHLIK-TOMAS, Vesna et al. Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 115-120, 2004.
- SUTTLE, Neville. **Mineral nutrition of livestock**. GB: Cabi, 2022.
- TSE, Timothy J.; WIENS, Daniel J.; REANEY, Martin JT. Production of bioethanol—A review of factors affecting ethanol yield. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 268, 2021.
- WANI, Atif Khurshid et al. Contribuição da levedura e da sua biomassa para a preparação de materiais industrialmente essenciais: uma bênção para a economia circular. **Relatórios de tecnologia de recursos biológicos**, p. 101508, 2023.
- WYSOCKI, Robert; TAMÁS, Markus J. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 925-951, 2010.
- ZHAO, Xin-Qing; BAI, Feng-wu. Zinc and yeast stress tolerance: micronutrient plays a big role. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 176-183, 2012.
- ZHAO, Yun-ying et al. Identification of the genetic requirements for zinc tolerance and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 2, p. 479-488, 2020.



#### 4. FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADO DE MILHO UTILIZANDO LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*, LINHAGEM THERMOSACC®, PREVIAMENTE ADAPTADAS A ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SULFATO DE ZINCO

##### Resumo

O Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor de etanol do mundo, com um crescimento de mais de 500 % na produção de biocombustível a partir de milho nos últimos 5 anos. A cadeia produtiva do etanol de milho gera subprodutos de grande valor comercial, sendo os grãos secos de destilaria (DDG) e os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) responsáveis por cerca de 30% da receita nas usinas. Na maioria das vezes, o DDG e o DDGS são empregados como ração animal, visto que são ricos em nutrientes e possuem alto valor proteico, características provenientes das leveduras utilizadas no processo fermentativo. Esses microrganismos possuem a habilidade de absorver ou adsorver minerais às suas células, entre eles o zinco. Este micronutriente é importante para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, plantas e animais. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar a influência do sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) nas leveduras e o impacto em parâmetros fermentativos do hidrolisado de milho, utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc® adaptadas a altas concentrações de zinco. Para isso, foram conduzidos ensaios fermentativos utilizando mostos de hidrolisado de milho enriquecidos em  $ZnSO_4$ , em duas concentrações (700 e 1400 mg L<sup>-1</sup>), além de uma fermentação controle sem adição de  $ZnSO_4$  (0 mg L<sup>-1</sup>). Os resultados demonstraram que no mosto com a concentração de 1400 mg L<sup>-1</sup> de  $ZnSO_4$ , houve a maior incorporação de zinco nas leveduras (5635,7 mg kg<sup>-1</sup> – base seca). Em relação aos parâmetros fermentativos (teor alcoólico, biomassa, rendimento e produtividade), ambos os mostos enriquecidos em zinco promoveram impactos negativos sobre o rendimento e a produtividade de etanol. A maior concentração de zinco resultou em menor conversão de substrato em produto, com uma redução de 9% em relação ao controle. Conclui-se que a levedura da linhagem Thermosacc® apresenta habilidade para gerar biomassa enriquecida com zinco, constituindo uma potencial fonte orgânica desse mineral. No entanto, o cultivo de leveduras adaptadas a altas concentrações de zinco no meio teve impacto sobre o rendimento e a produtividade da fermentação. Além disso, a incorporação dessas leveduras enriquecidas no DDG pode gerar um produto melhorado com alto teor proteico, agregando os benefícios do zinco.

**Palavras-chave:** Zinco, Biomassa, *Saccharomyces cerevisiae*, Rendimento fermentativo, Hidrolisado de milho.

##### Abstract

**Fermentation of corn hydrolysate using *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, Thermosacc® strain, previously adapted to high concentrations of zinc sulfate**

Brazil is the second largest producer of ethanol in the world, with a growth of more than 500 % in the production of biofuel from corn in the last 5 years. The corn ethanol production chain generates by-products of great commercial value, with distillers dried grains (DDG) and

distillers dried grains with solubles (DDGS) accounting for around 30% of the plants' revenue. Most of the time, DDG and DDGS are used as animal feed, as they are rich in nutrients and have a high protein value, characteristics that come from the yeasts used in the fermentation process. These microorganisms have the ability to absorb or adsorb minerals to their cells, including zinc. This micronutrient is important for the growth and development of microorganisms, plants and animals. In this context, the aim of this study was to investigate the influence of zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4$ ) on yeasts and the impact on fermentation parameters of corn hydrolysate, using *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup> yeasts adapted to high concentrations of zinc. To this end, fermentation trials were carried out using corn hydrolysate musts enriched in  $\text{ZnSO}_4$  at two concentrations (700 and 1400 mg L<sup>-1</sup>), as well as a control fermentation without the addition of  $\text{ZnSO}_4$  (0 mg L<sup>-1</sup>). The results showed that in the must with a concentration of 1400 mg L<sup>-1</sup> of  $\text{ZnSO}_4$ , there was the greatest incorporation of zinc into the yeast (5635.7 mg kg<sup>-1</sup> - dry basis). With regard to fermentation parameters (alcohol content, biomass, yield and productivity), both musts enriched in zinc had a negative impact on ethanol yield and productivity. The higher concentration of zinc resulted in a lower conversion of substrate into product, with a 9% reduction compared to the control. It can be concluded that the Thermosacc<sup>®</sup> yeast strain has the ability to generate zinc-enriched biomass, making it a potential organic source of this mineral. However, the cultivation of yeasts adapted to high concentrations of zinc in the medium had an impact on the yield and productivity of the fermentation. In addition, incorporating these enriched yeasts into DDG can generate an improved product with a high protein content, adding the benefits of zinc.

**Keywords:** Zinc, Biomass, *Saccharomyces cerevisiae*, Fermentation yield, Corn hydrolysate.

#### 4.1. Introdução

Nas últimas três décadas é cada vez mais forte o consenso da humanidade que é preciso reduzir as emissões de gases de efeitos estufa (GGE), devido ao consumo de combustíveis fósseis, devido ao seu impacto direto sobre o clima global e a economia. Nesse contexto, os biocombustíveis estão em constante ascensão, visto que contribuem para a redução da poluição e das emissões de gases de efeito estufa (GEE), fatores significativos nas mudanças climáticas em escala global. Diante disso, os países em desenvolvimento estão buscando acelerar a transição energética através do emprego de políticas sustentáveis (GRANGEIA; SANTOS, LAZARO, 2022).

Entre os biocombustíveis, destaca-se o etanol, produto oriundo da fermentação alcoólica. O Brasil, como o segundo maior produtor de etanol do mundo, utiliza a cana-de-açúcar como a sua principal matéria-prima (MANOCHIO et al., 2017). Apesar da abundância desse recurso, o país também tem direcionado investimentos para outra fonte de matéria prima para a produção de etanol: o milho.

A produção de etanol a partir de milho gera subprodutos de alto valor agregado, como os grãos secos de destilaria (Dried Distillers Grains- DDG), que são utilizados na produção de ração animal devido ao seu valor nutricional (SCHOLEY; BURTON, 2019). O DDG possui

alto valor proteico e é rico em fibras, minerais e vitaminas, representando uma fonte significativa de receita para as usinas. Estima-se que, para cada tonelada de milho, sejam produzidos 430 litros de etanol anidro, 363 kg de DDG e 13 kg de óleo de milho (MOREIRA et al, 2020). As proteínas desse subproduto são principalmente derivadas do gérmen e das células de leveduras utilizadas no processo de fermentação. As leveduras, por sua vez, possuem aproximadamente 34 a 46% de proteínas e também são ricas em vitamina B, além de serem altamente digeríveis (VIEIRA, 2016).

Uma das cepas presentes nas formulações comerciais de leveduras secas, empregadas na produção de etanol combustível e de bebidas alcoólicas, é a *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup>. De acordo com informações fornecidas pela Lallemand Biofuels & Distilled Spirits (LBDS), essa linhagem foi desenvolvida com o intuito de ser utilizada em fermentações caracterizadas por elevadas concentrações de glicose e álcool. Ela é capaz de tolerar altos níveis de ácidos orgânicos, além de possuir habilidade para atingir altos índices de produtividade e eficiência industrial, resultando em alta produção de etanol em intervalos de tempo reduzidos.

As leveduras utilizadas no processo fermentativo possuem a capacidade de assimilar minerais às suas células a partir de meios enriquecidos com fontes inorgânicas. Esse processo inclui a conversão de parte desses minerais inorgânicos em formas orgânicas, facilitando assim a absorção desses micronutrientes (YU et al., 2020; SOARES; SOARES, 2012). A incorporação desses micronutrientes nas leveduras pode elevar consideravelmente o valor nutricional do DDG, conferindo a esse produto a competência de proporcionar não apenas a suplementação nutricional, mas também os benefícios intrínsecos associados aos minerais incorporados. Essa característica destaca a importância das leveduras não apenas no âmbito da produção de etanol, como também na qualidade nutricional aprimorada do DDG.

Diversos estudos reportam que o enriquecimento de leveduras mediante a adição de zinco, micronutriente importante para diversas funções biológicas dos organismos. Este mineral influencia no crescimento, desenvolvimento neurológico, equilíbrio hormonal, além de exercer atividade antioxidante e atuar como componente estrutural em diversas biomoléculas, incluindo proteínas, enzimas, DNA e RNA (MARTÍNEZ-NAVARRO et al., 2023). Entretanto, a incorporação desse mineral nas células depende da fonte e da cepa de levedura utilizadas, uma vez que cada espécie apresenta sua tolerância à presença de zinco (MUÑOZ et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi investigar a capacidade fermentativa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, em mosto de hidrolisado de milho enriquecido com sulfato de zinco. O propósito foi verificar a influência do zinco nos parâmetros

fermentativos e obter resultados sobre a utilização dessa levedura enriquecida como estratégia para potencializar o valor agregado do DDG.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1. Local da pesquisa

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (LTSBio), situado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (Setor de Açúcar e Álcool) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

### 4.2.2. Ensaio de fermentação alcoólica utilizando hidrolisado de milho enriquecido com sulfato de zinco

Os ensaios foram realizados para avaliar o processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes concentrações de sulfato de zinco no meio de cultivo. Os tratamentos estudados estão descritos na Tabela 4.1 e foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados, em quadruplicata, totalizando 12 unidades experimentais. A levedura utilizada na fermentação foi a *Saccharomyces cerevisiae*, da linhagem Thermosacc<sup>®</sup>, que passou previamente por um processo de evolução adaptativa em meio YEPD com altas concentrações de ZnSO<sub>4</sub>, conforme descrito por Mota et al. (2022).

**Tabela 4.1-** Tratamentos estudados no ensaio de fermentação

Tratamento	Concentração de ZnSO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
T0	0
T1	700
T2	1400

#### 4.2.2.1. Multiplicação celular

Após o processo de adaptação, foi realizada uma multiplicação celular das leveduras, com o objetivo de obter quantidades suficientes de biomassa para o ensaio fermentativo. Para isso, as leveduras foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio YEPD (0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona e 5% de glicose (m v<sup>-1</sup>)), suplementados com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub>, conforme os tratamentos descritos na Tabela 4.1. A incubação ocorreu em *shaker*, sob agitação constante de 120 rpm, em ambiente com temperatura controlada (30°C ± 2°C), ao longo de 24 h. Depois do período de incubação, o volume total dos reatores foi centrifugado (4000 rpm, 10 min, 25°C) e a biomassa resultante foi transferida para Erlenmeyers

com volumes maiores de meio de cultivo, contendo concentrações mais elevadas de glicose. Esse aumento de volume foi realizado na proporção de 5:1, enquanto, a cada ciclo de multiplicação, a concentração de glicose no meio foi acrescida em 1% (m v<sup>-1</sup>) (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999).

#### **4.2.2.2. Processo de obtenção do hidrolisado e dos particulados de milho**

O milho foi adquirido no comércio local e, em seguida, os grãos foram moídos a fim de se obter grânulos com diâmetro  $\leq 2$  mm. Esses grânulos foram posteriormente suspensos em água, utilizando a proporção de 65 g de milho triturado para cada 100 mL de água destilada. Antes de iniciar a hidrólise, o pH foi ajustado para 5,8 com NaOH (5 M). A temperatura do mosto formado foi elevada para 87°C, e a enzima alfa-amilase foi adicionada na concentração de 0,1% m m<sup>-1</sup>. O controle de temperatura foi realizado com o auxílio de um banho-maria, a suspensão de particulado de milho foi mantida sob agitação constante (180 rpm) durante 150 min, promovendo a gelatinização e a dextrinização do amido.

Em seguida, a temperatura do material gelatinizado foi reduzida para 65°C. A enzima amiloglicosidase foi incorporada na concentração de 0,1% m m<sup>-1</sup>, e o amido sob hidrólise foi submetido à agitação constante (180 rpm), com controle de temperatura durante 150 min. Esse processo visava promover a sacarificação, culminando na obtenção do hidrolisado de milho (CORREA, 2015).

Concluída a etapa de obtenção do hidrolisado de milho, o material passou por um processo de centrifugação (4000rpm, 20 min, 25°C) para separar os particulados de milho. O sobrenadante resultante foi coletado e submetido a uma filtração utilizando um filtro de algodão. Para a etapa subsequente de clarificação, 5 g de fosfato monobásico de sódio foram adicionados a cada 2 L de hidrolisado de milho. O material foi então submetido a um tratamento térmico em autoclave, mantido em vapor corrente por 15 minutos, seguido por autoclavagem a uma temperatura de 121°C e pressão de 1atm por 20 min. Após o tratamento térmico, o hidrolisado foi deixado em repouso por 48 horas, e o sobrenadante foi posteriormente sifonado. O material foi submetido a uma nova etapa de filtração, com o auxílio de uma bomba a vácuo (Primatec, modelo 132), e utilizando filtros quantitativos com diâmetros de 14 e 8  $\mu$ m. Os particulados de milho foram submetidos a um processo de secagem em estufa a 50°C por 48 h, seguido por uma nova trituração até atingirem um diâmetro de 2 mm, sendo, por fim, armazenados sob vácuo.

#### **4.2.2.3. Preparo do mosto para a fermentação**

O hidrolisado de milho filtrado foi diluído com água destilada para alcançar um mosto com  $150 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares redutores totais (ART). O teor de sólidos solúveis totais foi determinado em refratômetro de bancada (Schmidt Haensch, modelo ATR-BR). Com base nessa medição, foi realizado o ajuste do teor de sólidos solúveis para  $15^\circ\text{Brix}$ . Em seguida, os materiais utilizados para a fermentação foram submetidos à esterilização em autoclave ( $121^\circ\text{C}$ , 1 atm, 20 min).

A fermentação alcoólica foi conduzida em Erlenmeyers de 500 mL, com o volume útil de trabalho de 200 mL de mosto. Foi realizada a inoculação das leveduras adaptadas (7g m.s.) com as respectivas concentrações de  $\text{ZnSO}_4$  para cada tratamento, conforme descrito na Tabela 4.1. Todo o processo de inoculação foi realizado em uma câmara de fluxo laminar para prevenir a incidência de contaminação. Foram coletadas amostras iniciais de cada tratamento após a inoculação das leveduras, visando determinar a viabilidade celular. Os reatores foram colocados sob agitação constante (120 rpm) e à temperatura de  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### **4.2.2.4. Monitoramento do desprendimento de $\text{CO}_2$ durante a fermentação**

Ao longo do ensaio fermentativo monitorou-se o desprendimento de  $\text{CO}_2$  para determinar o término do processo. Com o auxílio de uma balança semi-analítica, foi realizada a pesagem dos reatores a cada hora, sendo considerado o fim da fermentação quando os pesos dos reatores se estabilizaram (ZAGO et al., 1996).

#### **4.2.2.5. Viabilidade celular**

A determinação da viabilidade das leveduras foi realizada por meio da coloração diferencial de células vivas e mortas, utilizando a análise microscópica de uma suspensão das leveduras coradas com azul de metileno 0,1%, conforme descrito Pierce (1970). Essa análise foi realizada no início e a cada 3 h até a conclusão do processo fermentativo de todos os tratamentos. Para realizar esse procedimento, alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de cada repetição dos tratamentos foram coletadas e diluídas 10 vezes em água destilada. Em seguida, 300  $\mu\text{L}$  da diluição foram transferidos para um tubo contendo 300  $\mu\text{L}$  de azul de metileno 0,1% (diluição 2x), e essa nova suspensão foi homogeneizada em um agitador de tubos (IKA, modelo MS 3 Digital). Posteriormente, 10  $\mu\text{L}$  da suspensão foram transferidos para uma câmara de Neubauer, que foi levada para a contagem das células em microscópio óptico (Nikon®) com objetiva de 40x (aumento de 400x). As células coradas foram identificadas como mortas, enquanto as incolores foram consideradas viáveis. O parâmetro foi calculado utilizando a Equação 4.1.

$$V (\%) = \frac{\text{número de células incolores}}{\text{número de células incolores} + \text{número de células coradas}} \times 100$$

Equação 4.1

#### 4.2.2.6. Biomassa

Finalizada a fermentação, a biomassa produzida durante o processo fermentativo foi determinada pelo peso úmido, de acordo com Zago et al. (1996). Para isso, o vinho fermentado foi centrifugado (4000 rpm, 15 min, 25°C) e, em seguida, o peso da biomassa precipitada foi medido em balança semi-analítica e subtraído do peso da biomassa inicial que foi inoculada. Após o processo fermentativo, parte das biomassas de cada tratamento foi incorporada nos particulados de milho 10% (m m<sup>-1</sup>), a fim de compor amostras semelhantes ao DDG. Os sobrenadantes de levedurados coletados foram armazenados sob congelamento (-18°C) para posteriores análises físico-químicas.

#### 4.2.2.7. Contagem total de microrganismos

Para a contagem de leveduras, o cultivo foi realizado em triplicatas, em placas de Petri contendo 20 mL de substrato e 100 µL de inóculo. O meio de cultura utilizado foi o YEPD, composto por 0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar (m v<sup>-1</sup>). Foram realizadas diluições seriadas até as diluições de 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>, que foram plaqueadas pelo método de *spread-plate*, que consistiu em espalhar o material com o auxílio de esferas de vidro, fazendo a semeadura por toda a superfície da placa. As placas foram incubadas a 30°C ± 2°C durante 48 h, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (MOTA et al., 2022).

Para avaliar a incidência de contaminação dos reatores durante o processo fermentativo, foram coletadas amostras no início e final de cada repetição dos tratamentos. O material coletado foi submetido a uma diluição seriada, e as diluições de 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup> foram plaqueadas utilizando o método de *spread-plate*. O meio de cultivo nessa etapa foi o YEPD (0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar (m v<sup>-1</sup>)), contendo a concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> de cicloheximida. As placas foram incubadas a 30°C ± 2°C durante 48 h para subsequente contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (MARTINS, 2018).

#### 4.2.2.8. Teor alcoólico

O teor alcoólico do vinho delevedurado foi medido a partir da destilação de 25 mL coletados de cada amostra pertencente a cada unidade experimental. A destilação foi conduzida em um destilador para álcool (Tecnal, modelo TE-10), no qual o volume de 25 mL foi coletado na saída do condensador do equipamento. Em seguida, foi realizada a medição da densidade usando um densímetro digital (Schmidt Haensch, modelo 5000), na temperatura de trabalho de  $20^{\circ}\text{C} \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ , de acordo com Zago et al. (1996). A leitura realizada no equipamento foi expressa como o percentual do volume de álcool puro existente no volume da mistura ( $v v^{-1}$ ), correspondente ao °GL.

#### 4.2.2.9. Rendimento fermentativo (RF)

O cálculo do rendimento fermentativo foi conduzido com base na equação estequiométrica de Gay-Lussac para fermentação alcoólica, no qual o rendimento de 100% é alcançado com a formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir de 100 g de açúcares redutores totais. Dessa maneira, o rendimento fermentativo foi determinado considerando a concentração de açúcares redutores totais nos mostos e as concentrações de etanol presentes nos vinhos delevedurados de cada tratamento. Portanto, o rendimento fermentativo foi calculado de acordo com a Equação 4.2:

$$RF (\%) = \frac{g \text{ de etanol obtidos no vinho}}{g \text{ de ART fornecido} \times 0,5111} \times 100$$

Equação 4.2

#### 4.2.2.10. Produtividade da fermentação (PF)

A produtividade da fermentação foi calculada conforme a Equação 4.3, considerando o teor alcoólico dos vinhos ao final da fermentação e o tempo total de fermentação. Os resultados da produtividade foram expressos em gramas de etanol por litro por hora ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).

$$PF (\%) = \frac{\text{concentração de etanol no vinho (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}} \times 100$$

Equação 4.3

#### 4.2.2.11. Teor de açúcares redutores e glicerol

Para determinar as concentrações de glicerol, glicose, frutose e sacarose, aplicou-se a cromatografia iônica, seguindo a metodologia descrita por Eith et al. (2006). Para isso, foi utilizado um cromatógrafo de íons (Metrohm, modelo 930 Compact IC), equipado com a coluna

Metrosep Carb 2 - 150/4.0 e um detector amperométrico. A temperatura da coluna foi mantida constante a 35°C. A solução de eluente era composta por hidróxido de sódio 100 mM e acetato de sódio 20 mM, e o fluxo de trabalho foi fixado em 1,0 mL min<sup>-1</sup>. As amostras de mosto foram diluídas 200x, enquanto as amostras de vinho foram diluídas 20x com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram filtradas com filtro de nylon de 0,45 µm. Todas as amostras foram medidas em triplicata, e o volume de amostra injetado foi de 20 µL.

#### **4.2.2.12. Teor de ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia iônica, seguindo o método descrito por Eith et al. (2006). Foi utilizado o cromatógrafo de íons (Metrohm, modelo 930 Compact IC), equipado com a coluna Metrosep Organic Acids – 250/7.8 e um detector de condutividade. A temperatura da coluna foi mantida constante a 25°C. A solução de eluente era composta por ácido sulfúrico 0,5 mM e acetona 15% (v v<sup>-1</sup>), e foi aplicado um fluxo de trabalho de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Foi utilizada uma solução de LiCl 20 mM para a regeneração do supressor químico. As amostras foram diluídas 10x e filtradas por meio de filtro de nylon de 0,45 µm. O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

#### **4.2.2.13. Análise de trealose**

A trealose foi extraída à frio das células, conforme descrito por Trevelyan e Harrison (1956). Para isso, 2 mL de ácido tricloroacético 0,5 M foram adicionados a 0,012 g de biomassa de leveduras (massa seca) de cada unidade experimental. As suspensões de leveduras foram mantidas por 20 min sob 0°C, em seguida centrifugadas (3000 rpm, 5 min, 25°C), e o sobrenadante foi diluído 5x.

Para a quantificação da trealose foi utilizado o método da Antrona, conforme descrito por Brin (1966). Em tubos de ensaio, de cada amostra de sobrenadante, 300 µL foram pipetados misturados com 3 mL de uma solução composta por antrona 0,05% e tiourea 1% (m v<sup>-1</sup>). Um tubo foi feito com água deionizada no lugar de amostra, para zerar o equipamento. O conteúdo foi homogeneizado com o auxílio de agitador de tubos (IKA, modelo MS 3 Digital) e os tubos de ensaios contendo as amostras foram acondicionados em suporte para tubos e colocados em banho-maria, a 100°C por 10 min, seguido por resfriamento à temperatura ambiente. Após o resfriamento, foi realizada uma nova homogeneização e as amostras foram lidas em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UVmini- 1240) a um comprimento de onda de 620 nm.

#### 4.2.2.14. Análise de proteínas

A análise de proteínas foi realizada no Laboratório de Frutas e Hortaliças, situado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

Foi empregado o método Kjeldhal, conforme a metodologia descrita por Galvani e Gaertner (2006). Inicialmente, 0,1 g de cada amostra foi pesado em tubo de digestão, aos quais foram adicionados 5 mL de uma solução digestora composta por selenito de sódio 0,042 M, sulfato de cobre 0,067 M, sulfato de sódio 0,4 M e ácido sulfúrico 10 M. A digestão ocorreu em um bloco digestor, com aumento gradual da temperatura de 50°C em 50°C, alcançando 350°C. cada temperatura foi mantida por 1 h, totalizando 7 h de digestão. Posteriormente, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente. Foram adicionados 10 mL de água destilada e as amostras foram encaminhadas para a destilação.

Na etapa de destilação, em um Erlenmeyer, foi adicionado 5 mL de ácido bórico 0,32 M e 6 gotas da solução indicadora (vermelho de metila + verde de bromocresol + etanol) – solução receptora. Posteriormente, utilizando um destilador de nitrogênio (Tecnal, modelo TE-036/1), foram acoplados os tubos contendo as amostras e o Erlenmeyer com a solução receptora foi colocado na saída do equipamento. Em seguida, foram dispensados 15 mL de NaOH 11 N no tubo contendo as amostras, e a destilação foi conduzida até que todo o volume do tubo fosse evaporado, a amônia fosse condensada e coletada no Erlenmeyer com a solução receptora, até que esta solução dobrasse de volume e adquirisse coloração esverdeada. Para a quantificação do teor de nitrogênio, as amostras destiladas coletadas no Erlenmeyer foram tituladas utilizando ácido sulfúrico 0,02 N e o volume do ácido gasto na titulação foi anotado para a realização dos cálculos, conforme as Equações 4.4 e 4.5.

$$\% \text{ de nitrogênio total} = \frac{(V-V') \times fc \times N \times 14 \times 100}{P}$$

Equação 4.4

$$\% \text{ de proteína} = \% \text{ de nitrogênio} \times \text{fator de conversão de N em proteína da amostra}$$

Equação 4.5

Em que:

V = volume do ácido sulfúrico usado na titulação da amostra (mL);

V' = volume do ácido sulfúrico usado na titulação do branco (mL);

Fc = fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,02 N;

N = concentração da solução de ácido sulfúrico (0,02 N);

14 = peso molecular do nitrogênio;

100 = conversão em porcentagem;

P = peso da amostra utilizada (mg).

Os fatores de conversão utilizados nos cálculos foram: leveduras = 5,8; particulados de milho = 6,25.

#### 4.2.2.15. Determinação do zinco

As análises de zinco foram realizadas no Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho”, situado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

As amostras dos mostos iniciais e finais (2 mL cada), assim como as leveduras antes e após a fermentação (0,25 g cada), foram submetidas a uma digestão, seguindo o procedimento descrito por Catarino et al. (2010). Nessa etapa, foram adicionados 6 mL de ácido nítrico 20% e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30 %, e as amostras em frascos tipo PTFE foram digeridas em um forno micro-ondas (Ultrawave, modelo Milestone) durante 30 minutos, sob pressão de 160 bar e temperatura de 230°C. Após a digestão, as amostras líquidas foram diluídas 12,5 vezes, enquanto as amostras sólidas foram diluídas 100 vezes. Por fim, todas foram analisadas por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP- OES). Os parâmetros operacionais para a utilização do ICP- OES foram conforme descritos por Silva et al. (2009), apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2-** Parâmetros de operação para determinação de zinco por ICP- OES

Parâmetro	
Potência do gerador de radiofrequência	1,4 kW
Frequência do gerador de radiofrequência	40 MHz
Taxa de fluxo de gás plasma	15 L min <sup>-1</sup>
Taxa de fluxo de gás auxiliar	0,5 L min <sup>-1</sup>
Taxa de fluxo de gás transportador	0,8 L min <sup>-1</sup>
Taxa de absorção da solução	1,2 mL min <sup>-1</sup>
Tempo de integração	5 s
Comprimento de onda	213,856 nm

#### 4.2.3. Análise dos dados

O delineamento experimental empregado no ensaio fermentativo foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições, totalizando 12 unidades experimentais.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ( $p < 0,05$ ), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o software estatístico Rstudio (R Core Team, 2018). O programa Origin, versão 2022b (OriginLab Corporation), foi utilizado para gerar os gráficos.

### 4.3. Resultados e Discussão

A partir das análises realizadas ao longo do processo fermentativo, foram obtidos resultados que revelaram a influência do zinco nas leveduras e sobre parâmetros fermentação alcoólica. Os resultados de viabilidade celular das leveduras no início e final da fermentação estão expressos na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3-** Viabilidade ao longo do processo fermentativo

Tratamento	Viabilidade (%)					
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	14 h
T0	62,92 ± 1,1aB	68,98 ± 0,17aA	69,46 ± 0,88 aA	69,69 ± 1,32aA	-	-
T1	53,37 ± 0,96cD	62,12 ± 0,28bB	63,46 ± 0,24bA	61,53 ± 0,45bB	59,72 ± 0,41bC	-
T2	59,04 ± 0,35bC	59,21 ± 0,10cC	59,80 ± 0,06cB	60,91 ± 0,38bA	60,84 ± 0,05aA	60,80 ± 0,97A

\* Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como as leveduras passaram por um processo de multiplicação celular prolongado, constatou-se que as viabilidades iniciais de todos os tratamentos estavam abaixo de 70%, o que pode ser atribuído ao estresse induzido pelos metabólitos das leveduras, particularmente o etanol, produzidos durante a multiplicação. Um dos efeitos tóxicos do etanol nas células de *Saccharomyces cerevisiae* é a redução da atividade metabólica, provocada por alterações na composição lipídica da membrana, o que resulta na diminuição da taxa de crescimento celular (MARTINI et al., 2004 *apud* SAILWAL et al., 2020).

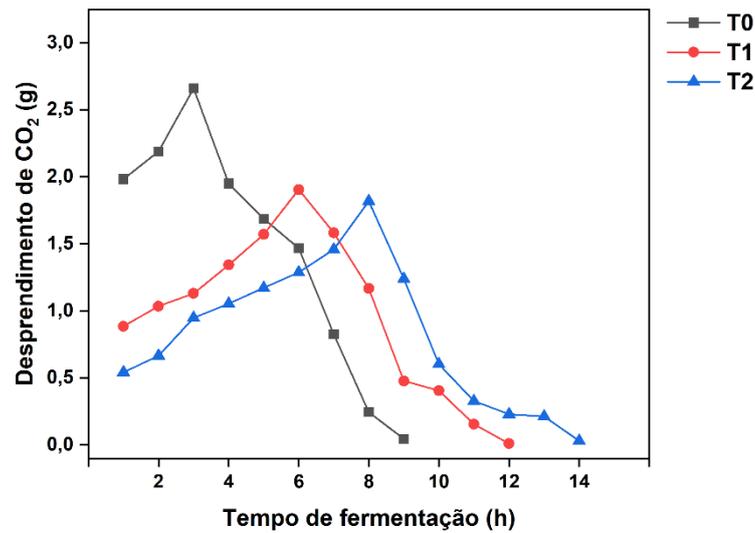
No estágio inicial, as viabilidades celulares das leveduras submetidas a todos os tratamentos diferiram entre si, com o valor de T0 destacando-se como o mais alto (62,92 %). Entretanto, ao longo do processo fermentativo, as viabilidades celulares das leveduras aumentaram em todos os tratamentos. De acordo com os resultados obtidos, as leveduras submetidas ao T1 foram aquelas que apresentaram o aumento de viabilidade mais significativo às 6 h (10,09 %). Considerando que a viabilidade inicial desse tratamento era a menor em comparação com os demais, é possível inferir que a presença do ZnSO<sub>4</sub> pode ter melhorado a

sáude das células e estimulado o aumento da viabilidade celular da levedura até essa fase. Os íons de zinco em quantidades adequadas no meio promovem aumento na taxa de crescimento de células de levedura, bem como a produção de etanol (JONES; GADD, 1990 *apud* SOUZA, 2012). Em contrapartida, mesmo com o T2 sendo exposto a uma maior concentração de  $\text{ZnSO}_4$ , o mesmo comportamento não foi observado, uma vez que o pico de viabilidade para esse tratamento ocorreu às 9 h. Isto pode indicar que na concentração de  $1400 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4$  a levedura precisa de mais tempo para obter os benefícios quanto à viabilidade celular.

Os resultados deste estudo foram semelhantes aqueles encontrados por Zhao et al. (2009), quando estudaram o efeito da suplementação de zinco na fermentação de leveduras floculantes (*Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*). Os autores investigaram diferentes concentrações de  $\text{ZnSO}_4$  (10, 50 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) em meio YEPD, observando uma melhora significativa na viabilidade celular de leveduras floculantes cultivadas na presença de zinco. No entanto, constataram que, na maior concentração, a viabilidade sofreu redução em comparação com os demais tratamentos. Os autores concluíram que é imprescindível conhecer a concentração de zinco que favorece o funcionamento adequado das células, uma vez que esse metal pode modificar a rota metabólica celular, resultando em maior produção e tolerância ao etanol.

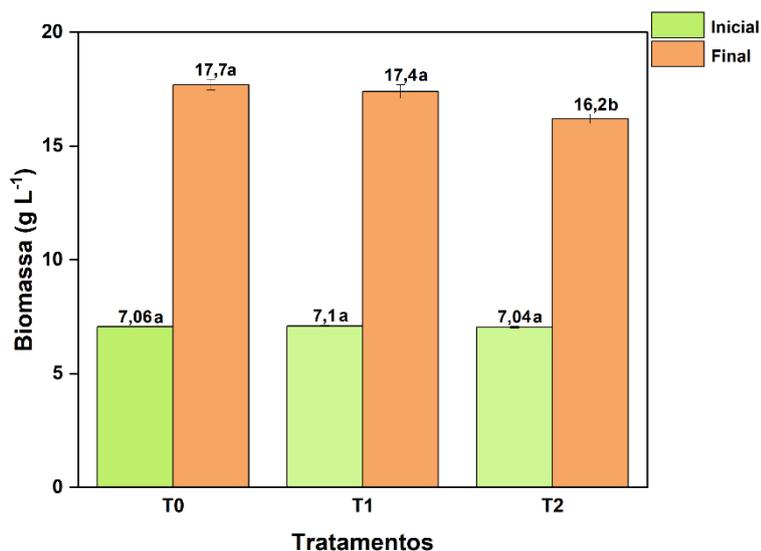
Ao final da fermentação, as leveduras submetidas ao T0 registraram o acréscimo de aproximadamente 11% na viabilidade celular, enquanto aquelas submetidas às condições dos tratamentos T1 e T2 apresentaram aumentos de cerca de 12% e 3%, respectivamente. É importante ressaltar que, ao considerar o tempo de incubação de 9 h, as condições experimentais do T1 revelaram aumento de 15% na viabilidade, superando o grupo controle (T0) em 4% no mesmo período. Isso reforça a possibilidade de que o zinco pode ter influenciado no melhor desempenho desse tratamento. De todo modo, é plausível afirmar que a concentração mais elevada de sulfato de zinco impactou negativamente na viabilidade das células, conforme evidenciado pelo menor percentual de aumento em T2 em comparação aos demais tratamentos.

Conforme visualizado na Figura 4.1, os tratamentos que continham  $\text{ZnSO}_4$  nos meios de cultivo apresentaram tempos de fermentação mais prolongados, de forma que o máximo de desprendimento em cada tratamento foi de 3 h para o T0, 7 h para o T1 e 9 h para o T2. Esses resultados estão em concordância com os dados de viabilidade celular, uma vez que o pico de desprendimento de  $\text{CO}_2$  coincidiu com o momento de maior viabilidade celular em cada tratamento.



**Figura 4.1-** Desprendimento de CO<sub>2</sub> ao longo do processo fermentativo em mostos com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub>.

Em relação à biomassa formada após o processo fermentativo, a Figura 4.2 indica que não houve diferença estatística entre os tratamentos T0 e T1, sugerindo que a concentração de zinco em T1 não interferiu negativamente na produção de biomassa. É possível inferir que, mesmo se T0 tivesse sido incubado pelo mesmo período que T1, sua produção de biomassa não teria apresentado aumento significativo. Isso se deve ao fato de que o desprendimento de CO<sub>2</sub> em T0 indicou a conclusão da fermentação, portanto o substrato residual não estava sendo convertido em produto. Foram observados incrementos de biomassa de aproximadamente 251% no T0, 245% no T1 e 230% no T2. Estes resultados sugerem que em meios com concentrações mais elevadas de zinco, mesmo quando a levedura foi previamente adaptada, pode ocorrer menor produção de biomassa do que no cultivo sem altas concentrações do ZnSO<sub>4</sub>.



**Figura 4.2-** Quantidade de leveduras ( $\text{g L}^{-1}$ ), em massa seca, de biomassa inicial e final em todos os tratamentos. Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas de mesma cor, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados destes estudos corroboram com aqueles observados por por Azad et al. (2014), os quais reportaram que durante a investigação dos efeitos da adição de diferentes concentrações de  $\text{ZnSO}_4$  (5, 10, 15, 30 e  $60 \text{ mg L}^{-1}$ ) no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5209, foi observado que, em concentrações baixas, o zinco aumentou ligeiramente a formação da biomassa da levedura estudada, exercendo efeito estimulante através da síntese de riboflavina, que contribuiu com o crescimento celular. No entanto, é importante ressaltar que, à medida que a concentração de  $\text{ZnSO}_4$  aumentava, a taxa de crescimento celular e a produção final de biomassa foram consideravelmente reduzidos. Os autores concluíram que o efeito inibitório do zinco no meio estava associado ao seu caráter tóxico em altas concentrações, resultando na inativação das células. É importante ressaltar que no estudo conduzido por esses autores, não foi realizada a evolução adaptativa das leveduras, e concentrações menores do que as utilizadas neste estudo já demonstraram o efeito inibidor do zinco na biossíntese celular. Além disso, é relevante destacar que os autores investigaram outra linhagem de levedura, o que pode influenciar nas respostas específicas ao zinco.

Em um estudo conduzido por Xue et al. (2008), foi analisada a influência do  $\text{ZnSO}_4$  na produção de biomassa durante a fermentação realizada por uma cepa floculante (SPSC01). Diferentes concentrações de sulfato de zinco ( $0 - 40 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram examinadas, e os pesquisadores observaram que o aumento na concentração de zinco no meio resultou em redução numérica da quantidade de biomassa produzida, embora sem diferenças estatisticamente significativas. Os autores inferiram que, em concentrações mais baixas de zinco, houve um estímulo no crescimento celular. Esse estudo evidencia que a capacidade do

zinco de estimular o crescimento celular depende das características específicas de cada linhagem.

Na Tabela 4.4, encontram-se os resultados referentes ao teor alcoólico, rendimento fermentativo, produtividade e concentração de açúcares redutores totais (ART). Os resultados obtidos permitem observar que o aumento na concentração de zinco no meio teve impacto sobre a produção de etanol, visto que os valores de produtividade de todos os tratamentos diferiram entre si. Uma possível explicação para os resultados pode ser o aumento do estresse osmótico nas células de leveduras à medida que se aumentou a concentração de  $ZnSO_4$  no substrato. Isso porque, segundo Wang et al. (2013), a pressão osmótica exercida pelos solutos presentes no meio pode inibir o metabolismo celular, reduzindo o rendimento fermentativo devido à incapacidade das células de fermentar os substratos.

**Tabela 4.4** – Valores obtidos para teor alcoólico, rendimento fermentativo, produtividade e ART

Tratamento	% Teor alcoólico (v v <sup>-1</sup> )	Rendimento fermentativo (%)	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	ART inicial (g L <sup>-1</sup> )*	ART final (g L <sup>-1</sup> )
T0	7,89 ± 0,016a	81,97 ± 0,256a	6,92 ± 0,014a	151,59 ± 0,021a	2,94 ± 0,210b
T1	7,26 ± 0,026b	75,59 ± 0,357b	4,78 ± 0,017b	151,59 ± 0,021a	3,15 ± 0,204b
T2	7,11 ± 0,038c	74,47 ± 0,505c	4,01 ± 0,022c	151,59 ± 0,021a	3,96 ± 0,440a

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

\* Açúcares redutores totais.

É importante salientar que, embora as quantidades de ART ao término do processo fermentativo para os tratamentos T0 e T1 não tenham demonstrado diferença estatística, o teor alcoólico desses tratamentos divergiu. Isso sugere que o grupo controle (T0) apresentou conversão mais eficiente de substrato em etanol, o que é evidenciado pelo rendimento fermentativo. Uma possível explicação para estes resultados pode ser que, em condições de estresse por minerais no meio, embora a célula consiga se adaptar e tolerar, ela tenha que desviar parte dos metabólitos intermediários da glicólise da glicose para a produção de outros compostos que não o etanol, a fim de suportar as condições peculiares do meio enriquecido em  $ZnSO_4$ . Conforme Lima, Basso e Amorim (2001), o rendimento fermentativo considerado satisfatório situa-se entre 90 e 92% do rendimento estequiométrico. Este intervalo reflete desvios dos carboidratos para a multiplicação celular e a produção de outros metabólitos.

Quando comparados ao grupo controle, o T1 apresentou redução de aproximadamente 8% no rendimento, ao passo que o T2 exibiu uma redução de cerca de 9%. Entretanto, ao comparar os dois tratamentos com  $ZnSO_4$ , o T2 teve uma redução de cerca de 1,5% em relação ao T1. Resultados distintos dos obtidos neste estudo foram relatados por De Nicola et al. (2009), que investigaram baixas concentrações de  $ZnSO_4$  (0,8 – 102,4 mg L<sup>-1</sup>) no desempenho fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* L-2226 e L-2256. Os autores verificaram que diferentes concentrações de zinco não influenciaram o desempenho da fermentação.

Ahmed et al. (2020) investigaram o efeito da suplementação de zinco na fermentação de duas cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (1308 e BY4741). Os autores verificaram que a produção de etanol aumentou na presença de 0,05 mM de  $Zn^{2+}$ , quando comparada ao grupo controle (sem adição). No entanto, constataram que a produção de etanol diminuiu significativamente quando a concentração de zinco ultrapassou 0,5 mM, sendo a redução mais expressiva na concentração de 0,76 mM. Os resultados levaram os autores a concluir que o nível ideal de zinco para o crescimento e a fermentação eficientes era intrínseco à linhagem de levedura estudada.

A Tabela 4.5 apresenta os valores referentes aos níveis de glicerol, ácidos orgânicos e contagem total de microrganismos. A presença de bactérias contaminantes desencadeia a competição por nutrientes. Dessa forma, os carboidratos disponíveis no meio, que deveriam ser convertidos em etanol pelas leveduras, sofrem desvio na rota metabólica e são consumidos pelos contaminantes (CECCATO-ANTONINI, 2018). Além disso, o desvio metabólico possibilita a produção e excreção de compostos secundários no meio, tais como os ácidos láctico e acético, que afetam a viabilidade e o desempenho das leveduras fermentativas (BASSO et al., 2014).

Em relação aos ácidos associados à contaminação bacteriana, como não ocorreram diferenças significativas nos valores de ácido acético entre os mostos iniciais e os mostos finais de T0 e T2, entende-se que as concentrações de ácido acético não sofreram alterações significativas nesses tratamentos. No entanto, foi verificado que os teores de ácido láctico presentes ao final dos ensaios fermentativos submetidos a esses tratamentos foram significativamente diferentes dos encontrados nos mostos iniciais. Dessa forma, é possível inferir que a contaminação bacteriana nesses casos foi predominantemente causada por bactérias homofermentativas. Isso ocorre porque, segundo Mazzeo et al. (2012), as bactérias lácticas homofermentativas produzem o ácido láctico como o principal produto do seu metabolismo.

O ácido succínico, por sua vez, pode atuar sinergicamente com o etanol, ocasionando uma ação antibacteriana (BASSO et al., 1997). Essa informação sugere que a menor contagem de bactérias no T2 pode ser atribuída à maior concentração de ácido succínico ao longo da fermentação, conforme pode ser observado na Tabela 4.5.

No que diz respeito ao glicerol, os resultados indicam que a presença do sulfato de zinco pode ter contribuído para o aumento significativo no estresse celular, mesmo após a adaptação. A levedura pode sintetizar glicerol como uma estratégia adaptativa para lidar com a pressão osmótica e acidez do meio (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). De acordo com Brewster et al. (1993), foram identificados os componentes de uma via de transdução de sinal que é ativada por alterações na osmolaridade do ambiente extracelular, e que demonstrou estar envolvida na produção de glicerol. Parte do declínio no rendimento e na produtividade dos tratamentos enriquecidos com  $ZnSO_4$  pode ser consequência do aumento induzido pela osmolaridade no desvio de carbono para a produção de glicerol.

**Tabela 4.5-** Resultados de glicerol, ácidos orgânicos e contagem total de microrganismos

Tratamento	Ácidos orgânicos (mg L <sup>-1</sup> )				Contagem total de bactérias	Contagem total de leveduras
	Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	Succínico	Lático	Acético	UFC mL <sup>-1</sup>	UFC mL <sup>-1</sup>
Inicial	-	-	0,097 ± 0,0c	0,07 ± 0,01b	-	-
T0	2,19 ± 0,13c	0,32 ± 0,03c	0,42 ± 0,04b	0,11 ± 0,04ab	2,53 x 10 <sup>2</sup>	2,87 x 10 <sup>9</sup>
T1	5,14 ± 0,11b	0,43 ± 0,04b	0,40 ± 0,03b	0,22 ± 0,1a	1,97 x 10 <sup>2</sup>	6,97 x 10 <sup>8</sup>
T2	6,23 ± 0,07a	0,61 ± 0,05a	0,77 ± 0,06a	0,18 ± 0,02ab	1,53 x 10 <sup>2</sup>	5,83 x 10 <sup>8</sup>

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em estudo realizado por Wan et al. (2015), foram investigados os efeitos da adição de zinco no metabolismo celular da *Saccharomyces cerevisiae* SPSC01 durante a fermentação do etanol na presença de ácido acético. Os autores relataram que a adição de 300 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de zinco resultou no aumento da produção de glicerol (4,6 g L<sup>-1</sup>), em comparação com o grupo controle (3,2 g L<sup>-1</sup>). Além disso, foi verificado que a produção de ácido succínico iniciou mais cedo na cultura suplementada com zinco. Os pesquisadores concluíram que o aumento da taxa de biossíntese de glicerol pela adição de zinco fortaleceu a resistência das células à toxicidade do ácido acético.

O teor de glicerol também está relacionado ao nível de trealose presente na célula, uma vez que a expressão dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela produção e decomposição desses compostos é notavelmente coregulada e aumentada em praticamente todas as condições de estresse (GASCH et al., 2000 *apud* BROACH, 2012). Mudanças significativas na expressão ocorrem no metabolismo do carbono, resultando na alteração do conjunto de isoenzimas e no aumento da capacidade de produzir glicerol e trealose, para fins de proteção celular (CAUSTON et al., 2001).

A trealose é acumulada principalmente na fase final do crescimento da levedura, quando a glicose ainda está sendo ofertada, mas não há disponibilidade de nitrogênio (DE VIRGILIO et al., 1994). Na Tabela 4.6, estão descritos os valores de trealose encontrados nas células de leveduras, os quais estão em concordância com os resultados de glicerol e com as observações Causton et al., (2001). É possível observar que ocorreram diferenças estatísticas entre nos valores de trealose nos tratamentos, tanto antes quanto depois da fermentação. Contudo, ao analisar cada tratamento separadamente, destaca-se que não houve diferença estatística nos níveis de trealose antes e depois da fermentação para os tratamentos T0 e T1. Isso pode ter ocorrido devido às células terem sido submetidas à multiplicação celular, que pode ter induzido a síntese de trealose antes do processo fermentativo. Por outro lado, as leveduras do T2

apresentaram diferença significativa entre os dois momentos avaliados, indicando que, apesar da adaptação prévia a altas concentrações de zinco, as células ainda sofreram níveis de estresse durante a fermentação que afetaram o metabolismo da síntese de trealose.

De todo modo, pode-se inferir que a presença do sulfato de zinco induziu estresse às células das leveduras. Ao final da fermentação, em comparação com o grupo controle, as leveduras submetidas ao T1 apresentaram aumento nos teores de trealose de aproximadamente 28%, ao passo que as do T2 exibiram aumento de cerca de 43%. Quando comparados os tratamentos contendo zinco, o T2 teve aumento de aproximadamente 12% em relação ao T1.

**Tabela 4.6-** Resultados de trealose antes e após o processo fermentativo

Tratamento	Trealose (mg 100 mg <sup>-1</sup> ) *	
	Antes	Depois
T0	7,91 ± 0,066cA	8,19 ± 0,171cA
T1	9,83 ± 0,248bA	10,47 ± 0,350bA
T2	10,98 ± 0,331aB	11,73 ± 0,432aA

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas, na mesma linha, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* Resultados expressos em massa seca.

Em estudo conduzido por Poreda e Tuszynsky (2007), foi investigada a influência de agentes estressantes, como diferentes concentrações de sulfato de zinco (80 – 500 mg L<sup>-1</sup>) e brix do mosto de malte, no metabolismo de trealose de *Saccharomyces carlsbergensis*. O zinco, em níveis mais altos e semitóxicos (acima de 250 mg L<sup>-1</sup>), provocou um aumento na síntese e no acúmulo de trealose, independentemente do brix do nutriente. Os autores concluíram que concentrações elevadas de zinco causaram inibição do crescimento, aumentaram o acúmulo de trealose e prolongaram o tempo de fermentação. Os resultados do presente estudo corroboram com os resultados encontrados por Poreda e Tuszynsky (2007). Descobertas semelhantes foram reportadas por Xue, Zhao e Bai (2010), que relataram que a adição de 50 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de zinco no meio YEPD aumentou 43,3% nos fluxos de carbono para a biossíntese de trealose em células de levedura floculante (SPSC01), enquanto houve uma diminuição significativa para a biossíntese de proteínas.

A trealose impede a desnaturação das proteínas de membrana celular em condições de estresse e suprime a agregação de proteínas desnaturadas, mantendo-as em estado parcialmente dobrado. No entanto, a presença contínua de trealose interfere no processo de redobramento, dificultando a reativação das proteínas desnaturadas pelo estresse (SETHI et al., 2018). Dessa forma, é necessário que ocorra a hidrólise da trealose para fornecer energia necessária para a

renaturação correta das proteínas durante a recuperação do estresse (SINGER; LINDQUIST, 1998 *apud* ELEUTHERIO et al., 2015). Além disso, a síntese de trealose pode competir por precursores metabólicos com outras vias, reduzindo os recursos disponíveis para a produção de proteínas menos essenciais para a célula (TREVISOL et al., 2011). Diante dessas informações, é plausível inferir que, em determinadas condições, o aumento da concentração de trealose pode ser inversamente proporcional ao teor de proteínas nas células.

A Tabela 4.7 exibe os valores de proteínas presentes nas células de leveduras após a fermentação. A partir dos resultados, pode-se observar que apenas as leveduras submetidas ao T2 diferiram significativamente das do grupo controle, apresentando uma redução de aproximadamente 8% em relação ao teor de proteínas, enquanto mostraram similaridade estatística com as submetidas ao T1. Portanto, o enriquecimento de leveduras com zinco não demonstrou efeitos muito pronunciados na síntese de proteínas das leveduras, quando essas células são previamente adaptadas a altas concentrações de zinco. Contudo, foi constatada a redução do teor de proteínas à medida que foi aumentada a concentração de zinco no meio, o que também pode estar associado ao estresse celular, como evidenciado pelo aumento dos níveis de trealose nas amostras.

**Tabela 4.7-** Teores de proteínas nas leveduras submetidas aos diferentes tratamentos após o processo fermentativo

Tratamento	Proteínas (%) *
T0	43,79 ± 0,82a
T1	42,34 ± 0,85ab
T2	40,45 ± 0,73b

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* Resultados expressos em massa seca.

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram relatados por Belucco (2008), que investigou diferentes concentrações de  $ZnSO_4$  para o enriquecimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Y904. O autor concluiu que, na concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de zinco, após 6 ciclos, foi quantificado o teor de 42,87% de proteínas nas células enriquecidas. Os resultados deste estudo corroboram com os resultados desse autor. Em pesquisa conduzida por Marson et al. (2020), foram encontrados valores de 41 a 49% de proteínas para leveduras *Saccharomyces sp.* Empregadas em cervejaria, enquanto Caballero-Córdoba e Sgarbieri et al. (2000) relataram 48,74%.

As leveduras, quando incorporadas aos particulados de milho, acrescentaram proteínas a estes, como evidenciado na Tabela 4.8. Verifica-se assim que, ao acrescentar as leveduras ao particulado de milho, as amostras diferiram apenas do particulado sem leveduras incorporadas. Os valores relatados por Da Silva, Netto e Scussel (2015) foram de 30,9% para o DDG, enquanto Schone et al. (2017) encontraram 20%. Já Corassa et al (2018) identificaram 30,9%. Os valores relatados na literatura apresentam uma ampla faixa de variação porque a quantidade de levedura residual no DDG depende de vários fatores, incluindo o método de fermentação, o grau de remoção da levedura durante o processo de destilação e secagem.

**Tabela 4.8-** Valores de proteína bruta (% , base seca) presentes nas amostras de particulado incorporado com de 10 % de leveduras enriquecidas em zinco.

Tratamento	Proteínas (%) *
Particulado de milho	11,77 ± 0,226b
Particulado + T0	14,88 ± 0,079a
Particulado + T1	14,70 ± 0,085a
Particulado + T2	14,51 ± 0,073a

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* Resultados expressos em massa seca.

Com relação aos valores de proteínas dos particulados com leveduras, obtidos no presente trabalho, é importante ressaltar que deve ser considerada a quantidade de levedura que foi incorporada nos particulados de milho, bem como a variação no processo de obtenção do DDG comercial. De todo modo, o incremento de 10% de leveduras enriquecidas em zinco resultou em aumentos de 26% para T0, 25% para T1 e 23% para T2. Esses resultados demonstram que a utilização de levedura enriquecida com zinco pode promover um acréscimo no conteúdo proteico do DDG, proporcionando melhorias nas características nutricionais do produto final.

Em relação às quantidades de zinco acumulado pelas biomassas das leveduras enriquecidas, os valores estão destacados na Tabela 4.9. Observa-se que todos os tratamentos diferiram entre si, tanto para mostos iniciais e finais quanto para leveduras iniciais e finais. Foi verificado também que, quando comparados dentro do mesmo tratamento, os mostos e leveduras também apresentaram diferenças estatísticas, sugerindo que, mesmo após a adaptação, as leveduras pertencentes aos tratamentos T1 e T2 ainda foram capazes de agregar zinco às suas células durante o processo fermentativo.

**Tabela 4.9-** Zinco total no mosto e acumulado nas células de leveduras.

Tratamento	Concentração de Zn total			
	Mosto inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Mosto final (mg L <sup>-1</sup> )	Levedura inicial (mg kg <sup>-1</sup> ) *	Levedura final (mg kg <sup>-1</sup> ) *
T0	0,79 ± 0,00cA	0,67 ± 0,00cB	1,97 ± 0,00cB	2,68 ± 0,06cA
T1	148,31 ± 0,35bA	23,19 ± 0,03bB	2773,04 ± 0,04bB	3149,76 ± 0,31bA
T2	307,83 ± 0,01aA	40,68 ± 0,11aB	4635,15 ± 0,03aB	5635,7 ± 0,16aA

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas, na mesma linha, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Resultados expressos em massa seca.

A partir dos resultados obtidos, nota-se que, para todos os tratamentos, as concentrações de Zn nos mostos finais diminuíram significativamente em comparação aos mostos iniciais. Essa redução foi de aproximadamente 15% para T0, 84% para T1 e 87% para T2. Portanto, é plausível supor que as leveduras absorveram ou adsorveram parte do zinco presente no mosto. Em relação aos níveis de zinco quantificados nas células, pode-se observar aumentos de aproximadamente 36% para T0, 13% para T1 e 21% para T2. Contudo, os teores iniciais e finais de Zn nas leveduras enriquecidas foram aproximadamente 2000 vezes maiores do que nas leveduras submetidas ao T0.

Considerando que as leveduras dos tratamentos contendo zinco passaram por uma evolução adaptativa antes da fermentação, pode-se inferir que as menores porcentagens de acúmulo em T1 e T2 durante o processo fermentativo, quando comparadas ao grupo controle, foram decorrentes do acúmulo de Zn agregado durante a adaptação, pois a concentração de zinco nas células de leveduras antes da fermentação já era milhares de vezes maiores do que na levedura não adaptada. É importante ressaltar a disparidade entre o acúmulo de zinco na fermentação e a quantidade de zinco removida pelas leveduras nos mostos. Uma explicação para esse fenômeno é que a concentração inicial de zinco nos mostos enriquecidos era centenas de vezes maiores do que no mosto do tratamento controle. De todo modo, ao comparar os resultados obtidos para as leveduras nos diferentes tratamentos, observa-se que o T2 exibiu as maiores concentrações de zinco nas leveduras após a fermentação, evidenciando que quanto maior a concentração do mineral no meio, maior foi a incorporação desse micronutriente às células.

As leveduras desenvolveram mecanismos para regular sua homeostase de zinco e manter o nível intracelular desse micronutriente relativamente constante, apesar das flutuações nas concentrações extracelulares de zinco (BIRD et al, 2020). Isso inclui a captação do zinco extracelular por meio da membrana plasmática, que se baseia no controle transcricional e pós-transcricional dos dois transportadores de zinco ZRT1 e ZRT2 (EIDE, 2003). Além disso, o sequestro de complexos de zinco em vacúolos é uma estratégia relevante para controlar a homeostase do zinco, prevenindo sua toxicidade e promovendo a desintoxicação, representando ainda um armazenamento celular extensivo desse mineral (NGUYEN; DZIUBA; LINDAHL, 2019).

Resultados muito semelhantes aos do presente estudo foram reportados por Maares et al (2022), que investigaram diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub> (0, 2,5, 5 e 10 mM) no cultivo de *Saccharomyces pastorianus* Rh em meio YEPD. A investigação foi combinada com um modelo de digestão humana in vitro para avaliar a biodisponibilidade e a bioconversão do zinco

inorgânico para orgânico. Os autores verificaram que o enriquecimento de Zn na levedura estudada dependeu do tempo de incubação e da concentração do micronutriente, de modo que na concentração de 5 mM, a levedura apresentou máxima absorção ( $5,9 \pm 1,0$  mg de zinco  $g^{-1}$  de levedura). Esses resultados são consistentes com os observados no presente estudo. Por fim, os pesquisadores concluíram que a levedura em questão representou uma fonte de zinco orgânico prontamente biodisponível.

SilleroVá et al. (2021) estudaram a capacidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de absorver zinco a partir de três fontes inorgânicas (nitrato, sulfato e cloreto de zinco). Os autores concluíram que a maior quantidade de zinco nas células foi obtida a partir da adição de nitrato de zinco. Todavia, para o sulfato de zinco, os pesquisadores encontraram o valor de 9440 mg  $kg^{-1}$  de zinco incorporados às células a partir de 1000 mg  $L^{-1}$  de fonte inorgânica. Foi destacado ainda que a concentração ideal de zinco é específica para cada cepa de levedura. Descobertas diferentes foram reportadas por Naik et al. (2022), que investigaram a incorporação das mesmas fontes de zinco no crescimento e enriquecimento de *Saccharomyces cerevisiae* em YEPD. Os autores testaram cloreto, nitrato e sulfato de zinco nas concentrações de 0, 30, 60, 90 e 120 mg  $100 mL^{-1}$ . Em concordância com o presente estudo, a maior quantidade de zinco nas células de levedura foi obtida quando adicionado na forma de  $ZnSO_4$  em uma concentração de 120 mg  $100 mL^{-1}$ , na qual os pesquisadores encontraram valores de zinco na biomassa final de 9889,67 mg  $kg^{-1}$  de biomassa.

Ao testarem duas fontes de zinco, uma orgânica (zinco-treonina) e uma inorgânica (sulfato de zinco), em meios de cultura para avaliar o crescimento e enriquecimento de *Saccharomyces cerevisiae*, Sheyhki et al. (2018) observaram que o maior teor de zinco na levedura foi alcançado quando submetida ao tratamento com 7,5 g  $L^{-1}$  de  $ZnSO_4$ , resultando em um teor de 115,67 mg  $g^{-1}$  de zinco na levedura. Os autores concluíram que a adição de zinco no meio de cultivo inibiu o crescimento da célula de levedura, provavelmente devido à redução na divisão celular.

O zinco está envolvido na regulação da estrutura e na atividade metabólica das leveduras, como a floculação e a divisão celular (BROMBERG et al., 1997 *apud* WIETSTOCK, 2015). No entanto, à medida que a concentração aumenta, a produção de biomassa tende a diminuir, e esta redução pode ser atribuída aos efeitos prejudiciais causados pela natureza tóxica do zinco. Isso ocorre devido à concentração elevada de íons de zinco no substrato nutritivo, afetando a permeabilidade das membranas ao potássio, o que resulta em uma diminuição no crescimento da levedura e, conseqüentemente, na obtenção de uma quantidade reduzida de biomassa enriquecida (LIU et al., 1997 *apud* ROBINSON; ISIKHUEMHEN, 2021).

#### 4.4. Conclusão

Os parâmetros analisados ao longo deste estudo destacam as alterações fisiológicas das leveduras durante os processos fermentativos em hidrolisado de milho, decorrentes da variação na concentração de sulfato de zinco. A suplementação de concentrações elevadas de zinco no meio, embora reduza a taxa de multiplicação celular, o consumo de substrato e a produção de metabólitos, ela favorece o enriquecimento das leveduras neste micronutriente.

Também foi verificado que substratos com altos teores de zinco em sua composição apresentaram menores rendimentos fermentativos. Portanto, a decisão de empregar essas leveduras deve ser baseada em considerações práticas e específicas para cada usina, avaliando a viabilidade de produzir DDG com maior valor nutricional, visando agregar valor ao produto ou favorecer a produção de etanol.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup> é apropriada para gerar uma biomassa enriquecida em zinco, podendo ser uma importante fonte orgânica desse mineral. Isso é evidenciado pela capacidade da levedura de incorporar mais que 5000 mg kg<sup>-1</sup> de zinco a partir de um meio contendo 1400 mg L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>. Além disso, a incorporação dessas leveduras enriquecidas no DDG pode contribuir para a elaboração de produto final com alto teor proteico e com os benefícios adicionais do zinco na forma orgânica.

#### Referências

- AHMED, Khalid et al. Effects of zinc combining with specific metal ions on ethanol tolerance of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 23, n. 3, p. 566-572, 2020.
- AZAD, S. Kamran; SHARIATMADARI, Farid; TORSHIZI, MA Karimi. Production of zinc-enriched biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Elementology**, v. 19, n. 2, 2014.
- BASSO, Thiago Olitta et al. Homo-and heterofermentative *lactobacilli* differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 169-177, 2014.
- BASSO, L. C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, v. 1530, p. 85-100, 2011.
- BASSO, Luiz Carlos; ALVES, D. M. G.; AMORIM, Henrique Vianna de. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 77-82, 1997.

- BELLUCO, André Eduardo de Souza. **Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação nutricional e probiótico**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BIRD, Amanda J.; WILSON, Stevin. Zinc homeostasis in the secretory pathway in yeast. **Current opinion in chemical biology**, v. 55, p. 145-150, 2020.
- BREWSTER, Jay L. et al. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science**, v. 259, n. 5102, p. 1760-1763, 1993.
- BRIN, Myron. Transketolase: Clinical aspects. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1966.
- BROACH, James R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics**, v. 192, n. 1, p. 73-105, 2012.
- BROMBERG, S. K. et al. Requirements for zinc, manganese, calcium, and magnesium in wort. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 55, n. 3, p. 123–128, jun. 1997.
- CABALLERO-CÓRDOBA, Glenys M.; SGARBIERI, Valdemiro C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 3, p. 341-351, 2000.
- CABALLERO-CÓRDOBA, Glenys M.; PACHECO, Maria Teresa B.; SGARBIERI, Valdemiro C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Food Science and Technology**, v. 17, p. 102-106, 1997.
- CALEGARI, Rubens Perez. **Ethanol production from the fermentation of sterilized wort by electron beam followed by methane production from its vinasse**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CATARINO, S. et al. Grape must mineralization by high pressure microwave digestion for trace element analysis: development of a procedure. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, p. 87-93, 2010.
- CAUSTON, Helen C. et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 2, p. 323-337, 2001.
- CECCATO-ANTONINI, Sandra Regina. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 80, 2018.
- CORASSA, Anderson et al. Uso de DDGS de milho para suínos: uma breve revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 2, p. 157, 2018.

- CORREA, Fabiane Fernanda de Barros. Desenvolvimento de um bioprocesso utilizando-se resíduos para produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* e etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. 2015.
- DA SILVA, Juliana Regina; NETTO, Diego Peres; SCUSSEL, Vildes Maria. Grãos secos de destilaria com solúveis, aplicação em alimentos e segurança—uma revisão. **Pubvet**, v. 10, p. 190-270, 2015.
- DE NICOLA, Raffaele et al. Zinc accumulation and utilization by wine yeasts. **International Journal of Wine Research**, 2009.
- DE VIRGILIO, Claudio et al. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, n. 1-2, p. 179-186, 1994.
- EIDE, David J. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1532S-1535S, 2003.
- EITH, C.; KOLB, M.; SEUBERT, A.; VIEHWEGERM, K. H. Práticas em cromatografia de íons: Uma introdução. 142 p. **Metrohm**, 2006.
- ELEUTHERIO, Elis et al. Revisiting yeast trehalose metabolism. **Current Genetics**, v. 61, p. 263-274, 2015.
- GALVANI, Fábio; GAERTNER, Eliney. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. 2006.
- GASCH, Audrey P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 12, p. 4241-4257, 2000.
- GRANGEIA, Carolina; SANTOS, Luan; LAZARO, Lira Luz Benites. The Brazilian biofuel policy (RenovaBio) and its uncertainties: An assessment of technical, socioeconomic and institutional aspects. **Energy Conversion and Management: X**, v. 13, p. 100156, 2022.
- JONES, Rodney P.; GADD, Geoffrey M. Ionic nutrition of yeast—physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 6, p. 402-418, 1990.
- LIMA, Urgel de Almeida; BASSO, Luiz Carlos; AMORIM, Henrique Vianna de. Produção de etanol. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, 2001.
- LIU, Xiu Fen et al. Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 18, p. 11763-11769, 1997.
- MAARES, Maria et al. Zinc availability from zinc-enriched yeast studied with an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 71, p. 126934, 2022.

- MANOCHIO, C. et al. Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 743-755, 2017.
- MARSON, Gabriela Vollet et al. Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: a systematic review on its characteristics, processing and potential applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 95, 2020.
- MARTÍNEZ-NAVARRO, Israel et al. Relationship of serum zinc levels with cardiometabolic traits in overweight and obese schoolchildren from Mexico City. **Biological Trace Element Research**, v. 201, n. 9, p. 4307-4319, 2023.
- MARTINI, Silvia et al. In vivo <sup>13</sup>C-NMR and modelling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 564, n. 1-2, p. 63-68, 2004.
- MARTINS, Bianca Chaves. **Recuperação e tratamento de água proveniente de vinhaça biodigerida e sua utilização em processos de produção de bioenergia**. 2018. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
- MAZZEO, Maria F. et al. Effect of inactivation of *ccpA* and aerobic growth in *Lactobacillus plantarum*: a proteomic perspective. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 13, p. 4050-4061, 2012.
- MOREIRA, Marcelo MR et al. Socio-environmental and land-use impacts of double-cropped maize ethanol in Brazil. **Nature Sustainability**, v. 3, n. 3, p. 209-216, 2020.
- MOTA, Layna Amorim et al. Ability of the *Saccharomyces cerevisiae* Y904 to tolerate and adapt to high concentrations of selenium. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 16, 2022.
- MUÑOZ, A. J. et al. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 210, p. 325-332, 2012.
- NAIK, R. Purshotham et al. Effect of Different Zinc Sources and Concentrations on the Biomass Yield of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. **Biological Trace Element Research**, p. 1-4, 2022.
- NGUYEN, Trang Q.; DZIUBA, Nathaniel; LINDAHL, Paul A. Isolated *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles contain low-molecular-mass transition-metal polyphosphate complexes. **Metallomics**, v. 11, n. 7, p. 1298-1309, 2019.
- PIERCE, J. S. Institute of brewing: analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 442-443, 1970.
- POREDA, Aleksander; TUSZYŃSKI, Tadeusz. Influence of magnesium and zinc ions on trehalose synthesis and fermentation activity in brewing yeast "*Saccharomyces carlsbergensis*". **Chemia i Inżynieria Ekologiczna**, v. 14, n. 2, p. 197-207, 2007.

- RIBEIRO, C., BLUMER, S., HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira: tecnologia do açúcar**. Piracicaba: ESALQ/Depto de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, V.2, 1999. 66p
- ROBINSON, Janelle R.; ISIKHUEMHEN, Omoanghe S.; ANIKE, Felicia N. Interações fúngico-metal: uma revisão da toxicidade e homeostase. **Revista de Fungos**, v. 3, pág. 225, 2021.
- ROSSI, Samantha et al. Zinc Tolerance of Special Yeasts and Lactic Acid Bacteria for Use in the Food Industry. **Fermentation**, v. 9, n. 6, p. 521, 2023.
- SAILWAL, Megha et al. Connecting the dots: Advances in modern metabolomics and its application in yeast system. **Biotechnology Advances**, v. 44, p. 107616, 2020.
- SCHOLEY, Dawn; BURTON, Emily. Producing Animal Feed as a Coproduct of Biorefining. In: **Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts**. Woodhead Publishing, 2019. p. 249-264.
- SCHONE, Rodrigo André et al. Resíduo seco de destilaria com solúveis (DDGS) na alimentação de frangos de corte (22-42 dias) 1. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, p. 548-557, 2017.
- SETHI, Ratnika et al. Discrete roles of trehalose and Hsp104 in inhibition of protein aggregation in yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 6, p. foy058, 2018.
- SHEYKHI, Farogh et al. The effect of different concentrations of organic and inorganic zinc on the growth and zinc content in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Biological Journal of Microorganism**, v. 7, n. 28, p. 103-109, 2018.
- ŠILLEROVÁ, Silvia et al. Preparation of zinc enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by cultivation with different zinc salts. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 689-695, 2021.
- SILVA, Edson Luiz; DOS SANTOS ROLDAN, Paulo; GINÉ, Maria Fernanda. Simultaneous preconcentration of copper, zinc, cadmium, and nickel in water samples by cloud point extraction using 4-(2-pyridylazo)-resorcinol and their determination by inductively coupled plasma optic emission spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1-3, p. 1133-1138, 2009.
- SINGER, Mike A.; LINDQUIST, Susan. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. **Molecular cell**, v. 1, n. 5, p. 639-648, 1998.
- SOARES, Eduardo V.; SOARES, Helena MVM. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 1066-1083, 2012.
- SOUZA, Rafael Barros de. **Análise do desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a composição mineral do meio**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

- THERMOSACC DRY. Lallemand Biofuels & Distilled Spirits, 2022. Disponível em: <<https://www.lbds.com/en/asia-pacific/products/thermosacc-dry/>>. Acesso em: 22 de agosto de 2022.
- TREVELYAN, W. E.; HARRISON, JSr. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, v. 62, n. 2, p. 177, 1956
- TREVISOL, Eduardo TV et al. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, p. 697-704, 2011.
- TSE, Timothy J.; WIENS, Daniel J.; REANEY, Martin JT. Production of bioethanol—A review of factors affecting ethanol yield. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 268, 2021.
- VIEIRA, Vanessa Amaro. **Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) na alimentação de vacas da raça Jersey**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista.
- WAN, Chun et al. The impact of zinc sulfate addition on the dynamic metabolic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to long term acetic acid stress treatment and identification of key metabolites involved in the antioxidant effect of zinc. **Metallomics**, v. 7, n. 2, p. 322-332, 2015.
- WANG, Liang et al. Impact of osmotic stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, p. 1-10, 2013.
- WIETSTOCK, P. C. et al. Uptake and release of Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn during beer production. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 73, n. 2, p. 179-184, 2015.
- XUE, C.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Effect of the size of yeast flocs and zinc supplementation on continuous ethanol fermentation performance and metabolic flux distribution under very high concentration conditions. **Biotechnology and bioengineering**, v. 105, n. 5, p. 935-944, 2010.
- XUE, Chuang et al. Improving ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by optimization of medium composition. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2257-2261, 2008.
- YAMADA, Eunice Akemi et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 423-432, 2003.
- YU, Qifang et al. Effect of the level and source of supplementary dietary zinc on egg production, quality, and zinc content and on serum antioxidant parameters and zinc concentration in laying hens. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6233-6238, 2020.

ZAGO, E. A.; SILVA, L. F. L.F.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H. V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar.** Piracicaba: ESALQ FERMENTEC, 1996.

ZHAO, X. Q. et al. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 1, p. 55-60, 2009.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo indicam as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc<sup>®</sup> foram capazes de tolerar a presença de sulfato de zinco no meio de cultivo e empregar mecanismos de sobrevivência para evoluir adaptativamente a maiores concentrações desse metal, apesar das alterações em suas funções fisiológicas.

O processo fermentativo de hidrolisado de milho contendo leveduras enriquecidas com zinco apresentou modificações nos parâmetros, em que elevadas concentrações de sulfato de zinco afetaram negativamente o processo, porém favoreceram o enriquecimento das células em maiores concentrações de zinco, aumentando as chances da bioconversão de zinco inorgânico para orgânico.

Quando associado ao uso do DDG, as leveduras enriquecidas em zinco emergem como uma alternativa promissora para a utilização na nutrição animal, favorecendo a sua produção comercial. Desta forma, o enriquecimento das leveduras com zinco complementa a utilização do DDG no mercado atual, contribuindo para alcançar o segundo Objetivo de Desenvolvimento Sustentável estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU), o qual incentiva o fomento de práticas sustentáveis para a obtenção de produtos de alto valor agregado, promovendo a melhoria da nutrição e a garantindo a segurança alimentar.