

ENRIQUECIMENTO COM FERRO EM LEVEDURA

Saccharomyces cerevisiae

SOLANGE APARECIDA GROPPO BLUMER

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro – 2002

ENRIQUECIMENTO COM FERRO EM LEVEDURA

Saccharomyces cerevisiae

SOLANGE APARECIDA GROppo BLUMER

Engenheiro Agrônomo

Orientador: **PROF. DR. JORGE HORII**

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro – 2002

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

Blumer, Solange Aparecida Groppo
Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae* /
Solange Aparecida Groppo Blumer. - - Piracicaba, 2002.
53 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Fermentação 2. Ferro 3. Leveduras 4. Ração I. Título

CDD 589.23

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

À RAUL, pela dedicação demonstrada.
À CAROLINE e CAMILA, que
são a razão de minha vida,

Dedico

Aos meus pais ANTONIO e LEONTINA
e ao meu irmão ANTONIO JOSÉ,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem O qual nada seria possível, e através Dele venci mais uma etapa de minha vida.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pela sabedoria na orientação, amizade e confiança constante ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Alcarde, pela participação e valiosas sugestões.

À Prof. Dra. Sônia Maria S. Piedade, pelas análises estatísticas dos dados.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pelos recursos oferecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos funcionários do Depto. De Agroindústria, em especial à minha amiga Rosemary, Silvino, Rubens, Gislaine e Vana, pela colaboração e alegrias compartilhadas.

Aos colegas do Curso de Pós - Graduação, em especial a Juliana, Antonio, Carlos, André, Ariovaldo, Marilisa, Fabiana, Beatriz.

À Denise Amaral, pela amizade e incentivo.

Àquela que se tornou uma grande amiga, Adriana Furlan Martin, pela sua efetiva participação, atenção e valiosas sugestões.

Às bibliotecárias Beatriz Helena Giongo, Mídiam Gustinelli, Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zuisly pelas colaborações nas correções.

A algumas pessoas especiais, cujos nomes não são citados aqui, gostaria de expressar toda a minha gratidão, admiração e respeito. Espero que de alguma maneira, realmente possa retribuir ao menos um pouco o que fizeram por mim, que certamente não será esquecido.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
RESUMO	xi
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 A fermentação	4
2.2 O processo convencional de secagem da levedura de sangria	7
2.3 Fatores que influem na composição da levedura de sangria.....	7
2.4 Leveduras	8
2.5 Caracterização e uso da levedura na ração animal sem tratamento de enriquecimento	10
2.6 O mercado de levedura seca no Brasil	11
2.7 Acúmulo de metais pelas leveduras.....	12
2.8 Importância do ferro no organismo animal.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Levedura	18
3.2 Meios de cultivo	18

3.2.2 Meio YEPD caldo para reativação e crescimento	19
3.2.3 Meio YEPD caldo para fermentação com fonte de ferro	20
3.3 Isolamento e purificação da cultura de leveduras	20
3.4 Teste para crescimento da levedura	21
3.5 Enriquecimento da levedura	21
3.6 Enriquecimento da levedura morta	22
3.7 Determinações analíticas químico-microbiológicas	23
3.7.1 Microbiológica	23
3.7.1.1 Viabilidade celular das leveduras	23
3.7.2 Química	23
3.7.2.1 Açúcares redutores totais	24
3.7.2.2 Ferro.....	24
3.8 Delineamento experimental e análise estatística dos dados	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Crescimento da levedura em meio com diferentes concentrações de ferro	26
4.2 Isolamento da levedura crescida em concentrações de 3,57; 7,14 e 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L	28
4.3 Crescimento da levedura isolada da placa com 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L em ágar com 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L	28
4.4 Enriquecimento da levedura em meio YEPD caldo para assimilação e fermentação com fonte de ferro	30
5 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
APÊNDICES	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Mecanismos de interação entre metais e células microbianas	14
2 Inibição da velocidade de crescimento em função dos teores de Fe ⁺² expressa em UFC/mL e períodos de tempo para contagem	27
3 Efeito inibitório da concentração de Fe ⁺² no crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
4 Acúmulo de Fe ⁺² pela levedura	35
5 Diferença de acúmulo de Fe ⁺² por ciclo	35

LISTA DE QUADROS

	Página
1 Adsorção de ferro pela levedura <i>S. cerevisiae</i> ao longo de cinco fermentações consecutivas	32
2 Acúmulo de ferro na matéria seca da levedura <i>S. cerevisiae</i> em cinco fermentações consecutivas	34
3 Teste F da levedura enriquecida	36
4 Teste de Tukey da levedura enriquecida	37
5 Acúmulo de ferro na levedura tratada termicamente	38

ENRIQUECIMENTO COM FERRO EM LEVEDURA

Saccharomyces cerevisiae

Autora: SOLANGE AP. GROPPA BLUMER

Orientador: Prof. Dr. JORGE HORII

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de adsorção de ferro pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* visando à incorporação em ração animal, utilizando, para isso, o sulfato ferroso. Foram realizados ensaios para determinar a tolerância de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* em concentração de ferro, onde se escolheu uma concentração para estudo de 5,36 mmoles de Fe^{+2} /L em função de inibição de crescimento e tempo para obtenção de massa satisfatória. Em seguida, foram realizadas cinco fermentações consecutivas para enriquecimento da levedura com Fe^{+2} , utilizando-se como inóculo todo o fermento recuperado da fermentação anterior descontada a alíquota tomada para a análise do teor de Fe^{+2} . Uma fermentação com células inativadas termicamente também foi realizada para determinar a capacidade de adsorção de Fe^{+2} pelas mesmas. Foi observado acúmulo crescente de Fe^{+2} na levedura a cada fermentação, iniciando-se por 1,43 mmoles de Fe^{+2} / kg de matéria seca para 6,68 mmoles de Fe^{+2} / kg de matéria seca após cinco fermentações consecutivas.

IRON ENRICHMENT IN *Saccharomyces cerevisiae*

Author: SOLANGE AP. GROppo BLUMER

Adviser: Prof. Dr. JORGE HORII

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the iron adsorption capacity of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, for animal food supplementation purpose. The iron tolerance of one *Saccharomyces cerevisiae* strain was evaluated, choosing 5.36 mmol Fe⁺² as the concentration for the further assays. Five consecutive fermentations were done for the iron enrichment of the yeast, using as inoculum the whole biomass formed in the previous fermentation except for the amount employed for iron determination. A batch assay with inactive cells was also conducted for the determination of Fe⁺² adsorption. Results showed an increasing accumulation of Fe⁺² in all fermentations, from 1.43 mmol kg⁻¹ of dry mass at the beginning, to 6.68 mmol kg⁻¹ of dry mass, after five consecutive fermentations.

1 INTRODUÇÃO

A importância de íons metálicos no metabolismo de fungos e leveduras é conhecida há muito tempo e vem sendo intensivamente estudada. No entanto, o exato papel desses íons no metabolismo celular, em muitos casos, não está completamente compreendido.

Alguns microrganismos exibem a propriedade de adsorver em sua superfície celular metais pesados e entre eles, fungos e leveduras apresentam maior tolerância para metais tóxicos podendo desenvolver-se em meios com altas concentrações desses elementos.

Uma outra característica importante de muitos fungos e leveduras é a sua capacidade de se desenvolver em condições adversas como baixo pH e altas temperaturas, tolerando condições ambientais extremas, o que pouco se observa em outros microrganismos.

O somatório dessas características, alta tolerância a metais pesados e desenvolvimento sob condições adversas, faz dos fungos e leveduras importantes adsorventes na remoção de metais tóxicos. É importante ressaltar que a biomassa microbiana é capaz de acumular metais bem como produtos produzidos ou derivados de células microbianas, estando vivas ou mortas.

A remoção de metais pesados do meio ambiente por fungos e leveduras é realizada por meio de mecanismos físico-químicos, como adsorção, ou dependentes de atividade metabólica, como transporte. Algumas interações físico-químicas podem estar indiretamente ligadas ao metabolismo, especialmente via síntese de constituintes

celulares ou metabólitos que podem atuar como eficientes quelantes de metais, ou ainda a criação de condições ambientais favoráveis, particularmente próximo à célula, facilitando a deposição de metais. Outros processos de acúmulo de metais por microrganismos são seqüestro e transporte, precipitação e reações de óxido-redução. O acúmulo de metais por via passiva, adsorção e/ou complexação é denominado biosorção. Entretanto, se esse acúmulo depender da atividade metabólica do microrganismo, trata-se, então, de bioacumulação.

A capacidade de concentração de metais apresentada por certos fungos e leveduras vem sendo utilizada na extração de espécies metálicas em meios aquosos. Dessa maneira, há grande interesse para a utilização de biomassas na biosorção para destoxificação de efluentes industriais, removendo componentes tóxicos deles. Por outro lado, nessa mesma operação, poderiam ser recuperados metais de valor industrial isoladamente, sendo, então, reciclados, o que minimiza os custos do processo industrial como um todo.

Uma outra aplicação para o processo seria no tratamento de águas poluídas, explorando as propriedades biosorventes da biomassa de levedura.

O interesse na utilização da biomassa por parte das indústrias é crescente devido às vantagens de aplicação, como baixo custo, eficácia e potencial de regeneração.

A propriedade de acumular metais pesados pela biomassa abre a possibilidade de estudos em condições tão variadas quanto são os substratos capazes de proporcionar o crescimento desses microrganismos. Particularmente, em vez de destoxificação por biosorção, a pesquisa no presente projeto foi direcionada para enriquecimento da biomassa por metais úteis à nutrição que poderiam ser adsorvidos ou absorvidos e esta transformada em componente orgânico de maior qualidade para a nutrição animal, ou ainda, de melhor alcance, um útil veículo para homogeneização de pequenas quantidades de determinados sais ou íons a serem dispersos em enormes quantidades de grãos ou de ração devidamente manufaturados com perfeita distribuição desses componentes que, mal distribuídos, não teriam a função esperada e, muito menos a eficiência aguardada.

Na presente pesquisa foi inicialmente verificada a influência da concentração de Fe^{+2} no meio de cultivo e a seguir desenvolvida uma seqüência de fermentações para sucessivo e gradativo enriquecimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A fermentação

A quase totalidade dos processos fermentativos para produção de álcool utilizados no Brasil baseia-se em processos intermitentes, e, entre esses, o sistema Melle-Boinot, com ligeiras alterações ou não, é utilizado pela maioria das destilarias de álcool de cana-de-açúcar. A marcha do processo Melle-Boinot segundo Almeida (1960), resumidamente, é a seguinte:

a-) terminada a fermentação do mosto, o vinho resultante deve ser descarregado de modo a esgotar, tanto quanto possível, todo o volume da dorna. Esse vinho, antes de ser enviado às centrífugas, deve passar, inicialmente, através de um filtro de malhas grossas, cerca de 3 mm, sendo bombeado a seguir para novos filtros, estes de malhas mais finas, cerca de 0,55 mm, para conferir proteção às turbinas. O vinho deve chegar às turbinas sob pressão de $0,7 \text{ kg/cm}^2$, saindo delas na forma de duas suspensões, uma concentrada de células de levedura com cerca de 60% de massa celular, e outra, que é a fase sobrenadante, contendo ainda pequenas partículas sólidas, entre as quais bactérias e resíduos mais leves.

b-) A fase sobrenadante, que é o vinho turbinado, é enviada para a dorna volante ou depósito intermediário de vinho, onde fica aguardando para ser destilada.

c-) A suspensão concentrada de células, chamada normalmente de leite ou creme de levedura, que será utilizada como inóculo da fermentação subsequente, é enviada para as cubas de tratamento providas de sistema de agitação, onde sofre adição de água (cerca de 1,5 a 2,0 vezes o volume de leite) e a suspensão é acidulada com ácido sulfúrico concentrado até pH 2,7 a 2,5. Nessas condições, a suspensão deve permanecer até cerca de quatro horas, para que parte das bactérias remanescentes do processo seja eliminada, e as que resistirem estejam em quantidades mínimas, de modo a não causarem maiores perturbações e perdas na fermentação posterior, já que esse creme de levedura assim tratado será retornado à dorna, iniciando nova rodada de fermentação.

A partir do leite ou creme de leveduras pode ser feita uma sangria, ou seja, um desvio de pequeno volume para originar um concentrado microbiano útil à complementação em ração animal. Antes porém, este concentrado deve passar por operações de lavagens, termólise, desalcoolização até a secagem para resultar em levedura seca.

De acordo com Horii (1997), a sangria deveria ser procedida unicamente após a centrifugação, sendo o leite desviado do processo normal de coleta para sofrer diluição e lavagens tanto para recuperar etanol quanto para reduzir impurezas sólidas e colóides que acompanham ou impregnam a superfície celular. O volume de sangria depende do conhecimento do acréscimo que se obtém na fermentação de cada destilaria em função de seu nível tecnológico. As leveduras lavadas necessitam ser novamente concentradas a teores compatíveis com os processos de secagem.

Segundo Desmonts (1966), citado por Berto (1985), a quantidade de levedura seca (LS) recuperada após a centrifugação do vinho nas destilarias de álcool de cana-de-açúcar depende das concentrações celulares específicas (C.C.E.) dos mostos. A recuperação possível deve variar proporcionalmente à C.C.E., mas os valores comerciais do álcool e do fermento seco devem ser considerados na escolha entre uma maior ou menor recuperação de fermento à custa de produção de álcool, pois o gasto de carboidratos para produzir um quilo de álcool ou um quilo de levedura seca tende a ser igual nos dois casos e gira em torno de 2,0 kg. Entretanto, punções de 1,5 a 2,5 kg de

levedura seca por hectolitro de álcool produzido pelo sistema Melle-Boinot não afetam, visivelmente, o rendimento alcoólico nem a velocidade de fermentação posterior.

Horii (1997) considerou que, em nossas destilarias, o teor de células deveria ser mantido em torno de 10 a 12% do volume de vinho por meio da sangria, o que nem sempre acontece em função de uma série de fatores que vão desde a qualidade da matéria-prima, os diversos tratamentos de caldo efetuados em diferentes níveis e rigores até a fermentação também conduzida em diferenciados patamares tecnológicos. Deve-se lembrar que a sangria faz-se necessária, uma vez que o excesso de fermento, além de não contribuir para o aumento de produção de álcool, ainda contribui para o aumento de consumo de insumos, ineficiência no tratamento de fermento e de aumento de processos infecciosos pela maior oferta de aminoácidos.

Pinotti (1984), relatou que em uma fermentação alcoólica, geralmente se procura reprimir a reprodução celular para aumentar o rendimento alcoólico; porém, a energia necessária à “construção” de um novo microrganismo em uma fermentação alcoólica já é sobejamente fornecida pela transformação dos açúcares em álcool e a necessidade de consumo suplementar de açúcar para a construção deste novo organismo seria apenas para fornecimento de carbono, hidrogênio e oxigênio necessários à constituição celular. Ainda segundo o mesmo autor, uma redução de perdas, por aperfeiçoamento do sistema de centrífugas, tratamento mais cuidadoso do fermento e inexistência de material decantado no final do ciclo fermentativo, permite a sangria de leveduras para secagem sem detrimento da produção de álcool.

Para Rheinboldt et al. (1987), a fermentação alcoólica não pode ser desvinculada de uma geração paralela de levedura que, além de inevitável, é essencial para a reposição e renovação de células, garantindo sua qualidade e estabilidade. A intensidade desta reposição ou recuperação ocorre conforme as condições do meio, como disponibilidade de nutrientes, micronutrientes, vitaminas, oxigênio, entre outros, e nas usinas tende a atingir um estado de equilíbrio, ou seja, a geração de levedura apenas repõe as perdas do processo. Essas perdas ocorrem na centrifugação do vinho, no fundo da dorna e no tratamento ácido das cubas.

2.2 O processo convencional de secagem da levedura de sangria

Ainda segundo Rheinboldt et al. (1987), o processo convencional de secagem é composto de algumas etapas. Inicia-se com a lavagem por centrifugação do leite sangrado das dornas, com o objetivo de remover materiais estranhos e recuperar parte do teor de álcool que o acompanha. O leite recuperado da lavagem é submetido a um processo de estarvação, que seria uma exaustão de suas reservas pelo aumento da temperatura para 45-50°C, em que as leveduras consomem as substâncias de reserva (carboidratos) acumuladas na célula transformando-as em álcool. Com isso, haveria um aumento do teor de proteína. O leite estarvado é submetido a uma deflegmação em uma coluna de destilação de pratos perfurados. Durante a destilação, o etanol é recuperado no topo da coluna. O leite sofre, simultaneamente, uma desativação térmica, que resulta em morte de células e inativação de enzimas, sendo necessária para utilizar em rações, principalmente, para ruminantes. A permanência do leite por aproximadamente 15 minutos a 105°C no fundo da coluna deflegmadora assegura uma termólise eficiente. A levedura, então, sofre um processo de concentração para retirar água mecanicamente do leite, sendo importante para aumentar a eficiência dos secadores. A levedura pré-concentrada é submetida a um pré-aquecimento em trocadores de calor e, imediatamente, bombeada para os secadores. Os tipos de secadores mais usados são tambor rotativo, spray-dryer e turbo-dryer. O tipo tambor rotativo é usado em unidades de pequeno e médio portes.

2.3 Fatores que influem na composição da levedura de sangria

Segundo Hsu (1961), o meio de cultura é considerado como o principal fator que afeta a composição final das leveduras. Desmonts (1966), citado por Moreira (1984), diz que o substrato é importante para a produção de leveduras; e que, na realidade, o

substrato deve apresentar os nutrientes requeridos pelos microrganismos em formas assimiláveis e em quantidades suficientes para proporcionar boa multiplicação de células.

De acordo com Salgado (1976), o número de lavagens pode determinar alterações significativas na composição química da levedura. Utilizando-se de 4 lavagens, pode-se aumentar o teor de proteína bruta de 33 para 42%, mas isso provocou perdas de matéria seca, proteína e matéria mineral. Portanto, as lavagens concentram proteína pela eliminação de impurezas.

Segundo Krider et al. (1982), a composição química e o valor nutritivo das leveduras e dos subprodutos de destilaria que os contêm são resultantes do tipo de substrato utilizado, da espécie de levedura empregada e das condições e técnicas de produção impostas no processo.

Para Lahr Filho et al. (1996), a composição química da levedura de fermentação alcoólica pode ser alterada por um processo de estarvação. Na estarvação, o leite de levedura é mantido a uma temperatura de 37°C, com agitação constante e em ausência de fonte de energia. Nestas condições, as substâncias de reserva e, fundamentalmente, os carboidratos acumulados durante a fermentação alcoólica são metabolizados, liberando energia para as atividades biológicas da célula e formando-se etanol.

2.4 Leveduras

As leveduras são empregadas, com alta frequência, na obtenção de produtos de consumo diários, entre eles o pão e as bebidas alcoólicas, destacando-se as fermentadas e aquelas posteriormente destiladas. Caracterizam-se por apresentarem alta resistência em condições de ambiente, pH, presença de sais e temperatura de até, aproximadamente, 35°C. Têm alta taxa de reprodução, podendo reproduzir-se sexuadamente, formando esporos, ou por reprodução assexual, envolvendo brotamento, gemulação ou fissão binária (Lodder, 1971).

As características que tornam os microrganismos interessantes, incluindo a levedura como produtores de proteínas, segundo Kilberg (1972), são:

- rápida multiplicação;
- capacidade de desenvolvimento em substrato de custo acessível;
- facilidade de obtenção;
- utilização de nutrientes em suas formas mais simples;
- produção independente de fatores ambientais e climáticos;
- formação de produto de elevado valor nutritivo.

As leveduras secas apresentam uma composição química aproximada de 6% de umidade, 45% de proteína (N x 6,25), 6% de lipídios e 9% de cinzas. Como substância de reserva, as leveduras acumulam trealose, glicogênio e lipídios. Nas leveduras, destacam-se os componentes de parede celular: glicana, manana e quitina (Ângeli & Thomazini, 1980).

Segundo Dziejak (1987), as leveduras estão recebendo maior atenção por parte dos pesquisadores devido aos benefícios nutricionais fornecidos ao homem. Sua utilização pode ser na forma de levedura seca, suplementando a alimentação humana, ou enriquecendo os sabores de lanches, carnes e produtos derivados do leite.

A utilização da biomassa de levedura pode ser desde o aproveitamento integral, ou de apenas alguns componentes e para isso, diferentes técnicas podem ser empregadas. Antigamente, recuperava-se o máximo de leveduras do gênero *Saccharomyces* da produção de bebidas fermentadas, principalmente cervejas, utilizando-as então, em panificação. Em 1968, Fleischmann iniciou a produção industrial da levedura prensada e contribuiu para a melhoria da bioquímica da fermentação e de técnicas de engenharia, auxiliando muito o desenvolvimento da moderna utilização de leveduras (Halász & Lásztity, 1991).

O Brasil, sendo um grande produtor de açúcar e de álcool de cana-de-açúcar, possui um alto potencial de produção de levedura que pode ser recuperada em destilarias e cultivada em melaço ou caldo de cana para enriquecimentos diversos visando rações

específicas de animais e peixes ou mesmo visando enriquecimento e em paralelo efeitos como biorremediação e bioproteção como citados por Baptista (2001).

2.5 Caracterização e uso da levedura na ração animal sem tratamento de enriquecimento

De acordo com Miyada e Lavorenti (1979), o aumento de levedura seca na dieta de suínos em acabamento melhorou a qualidade de carcaça, reduziu espessura de toucinho e aumentou a porcentagem de pernil. Essa melhoria na carcaça é atribuída ao maior consumo diário de proteína e de lisina.

A levedura seca é muito difundida pelo seu alto teor de proteína e por ser rica em vitaminas do complexo B. Apresenta uma diversidade de aminoácidos, sendo uma excelente fonte de lisina, o que faz da levedura um complemento ideal para outras fontes de proteína, como, por exemplo, farelo de soja (Kridler et al., 1982).

Machado et al. (1984), trabalhando com vacas em lactação, mostraram que a proteína do farelo de algodão pode ser substituída pela proteína de levedura até 37% da proteína da dieta, havendo, então, maior eficiência digestiva, melhor recuperação de leite, maior produção de proteína do leite e não se observaram alterações metabólicas em nível de rúmen.

De acordo com Costa (1987), a levedura tem de 34 a 46% de proteína, é rica em vitamina B e altamente digerível. Em testes de substituição de cama de frango por levedura seca em ração para bovinos confinados, a substituição com 45% de levedura produziu maior ganho diário de peso.

Panobianco et al. (1989), trabalhando com leveduras em dietas de poedeiras, verificaram que o uso de levedura acima de 12% melhorou a coloração da gema.

A levedura seca tem sido objeto de muitos testes zootécnicos, na busca de obter a otimização de sua utilização na ração e seus efeitos na dieta do animal (Halász & Lásztity, 1991).

Whitaker et al. (1995), trabalhando com ração para eqüinos, concluíram que a levedura pode ser usada até 30% para potros em crescimento. A levedura é uma alternativa como fonte de proteína, uma vez que o farelo de soja, que é a fonte mais utilizada de proteína em ração, tem sua produção e comercialização influenciadas pela política econômica, o que, muitas vezes, provoca aumento do valor do produto no mercado e, conseqüentemente, aumento do preço da ração.

De acordo com Butolo (1996), a composição em aminoácidos das leveduras é bem balanceada, destacando-se os teores elevados de lisina e metionina. Os carboidratos representam 45-55% do peso da levedura, sendo representados, em média, por 33% de trealose, 27% de glucanos, 21% de mananas e 12% de glicogênio.

2.6 O mercado da levedura seca no Brasil

A importância da biomassa de levedura, sob o ponto de vista industrial, reside no fato dessa matéria-prima ser composta de uma variedade de componentes úteis e, por esse motivo, ser amplamente utilizada no fabrico de inúmeros produtos. Na fabricação de novos produtos a partir da biomassa de levedura, podem ser empregados apenas alguns componentes celulares ou a célula toda, sendo o concentrado protéico e a levedura seca as duas principais formas de aplicação da biomassa. A produção de enzimas, ácidos nucléicos, nucleotídeos, nucleosídeos, lipídios, vitaminas, carboidratos e muitos outros produtos emprega a biomassa de levedura como matéria-prima (Halász & Lásztity, 1991).

De acordo com Furco (1996), os principais compradores de leveduras no mercado interno são os grandes fabricantes de rações comerciais, principalmente os fabricantes de sal mineral, que utilizam as leveduras como palatilizantes e fonte de proteína; geralmente dirigem-se para rações de bovinos e essa, talvez, tenha sido a principal razão do pouco sucesso das leveduras como um microingrediente de rações,

uma vez que as rações destinadas a bovinos têm preço de venda muito baixo e não têm elasticidade para absorver produtos de maior valor como seria o caso das leveduras. A tendência do mercado é continuarem os preços em alta. O mercado interno e externo tenderá a valorizar as leveduras que possam oferecer qualidade consistente ao longo do ano, ou seja, que apresentem variações mínimas de cor, palatabilidade e granulometria.

Segundo Ghiraldini e Rossell (1997), de um total de 25.000 toneladas de levedura produzidas na safra 96/97, 12.000 toneladas ficaram no mercado interno e 13.000 toneladas foram exportadas principalmente para o Sudeste Asiático e Europa. Com relação ao mercado interno, até início da década de 90, 80% da levedura comercializada era para ração de bovinos. A partir de 1995, passou a ser mais direcionada para ração de aves, suínos e aquíicultura, e a tendência é permanecer assim.

2.7 Acúmulo de metais pelas leveduras

Fungos e leveduras são capazes de remover metais pesados de seu meio ambiente externo por meio de mecanismos que podem ser físico-químicos como a adsorção ou dependente da atividade metabólica como o transporte. Algumas interações físico-químicas podem ser indiretamente dependentes do metabolismo via síntese de constituintes particulares da célula ou metabólitos que podem agir como eficientes quelantes ou a criação de um microambiente particular próximo à célula que facilite a deposição ou precipitação. Assim, a biomassa microbiana, viva ou morta, é capaz de acumular metal bem como os produtos produzidos ou derivados de células microbianas (Gadd, 1990).

Além do conteúdo protéico as leveduras podem atuar como portadoras potenciais de substâncias tóxicas entre as quais os metais pesados que as mesmas têm capacidade de acumular (Brady & Duncan, 1994; Holan & Volesky, 1995; Volesky, 1990a).

A célula de levedura, com sua complexa parede celular, representa um sítio adicional de adsorção em relação às células desprovidas de parede. Considera-se a

parede celular uma entidade protetora da membrana plasmática e da célula como um todo (Gadd, 1990).

Segundo Wood & Wang (1983), numerosos parâmetros químicos devem ser considerados para que um íon metálico possa ser adsorvido por uma célula viva. Esses incluem carga do metal, raio iônico, a preferência do metal por ligantes orgânicos e a disponibilidade da concentração do metal.

A capacidade que os microrganismos apresentam de acumular metais pesados geralmente envolve duas fases: uma ligação rápida com a superfície celular, independente do metabolismo, seguida de um acúmulo intracelular dependente do metabolismo e com gasto de energia. No acúmulo independente do metabolismo, os cátions podem se depositar por processo de adsorção ou precipitação inorgânica, ou ficarem adsorvidos a grupos aniônicos fixos presentes na parede celular (Brady & Duncan, 1994; Volesky, 1990b; Volesky e May-Phillips, 1995).

No acúmulo dependente do metabolismo, o íon metálico é conduzido pelas proteínas de transporte através da membrana celular, ficando acumulado no citossol ligado à metalotionina (Brady & Duncan, 1994). A metalotionina está envolvida no armazenamento de metais, destoxificação, desenvolvimento, diferenciação, controle do metabolismo celular, proteção contra radicais livres tóxicos e resposta à radiação ultravioleta (Brady & Duncan, 1994; Volesky, 1990c).

A biosorção é a capacidade que a célula apresenta em seqüestrar passivamente o metal causada por diferentes mecanismos físico-químicos e dependentes de fatores externos ao ambiente, bem como do metal, da forma iônica do mesmo em solução e do tipo de sítio ativo de retenção responsável pelo seqüestramento do metal. Uma característica importante da biosorção é que ela pode ser responsável pela retenção e acumulação metálica mesmo quando a célula não é mais metabolicamente ativa, ou seja, quando morta (Volesky, 1990a).

Para Wood & Wang (1983), há diferentes mecanismos de ação de agentes complexantes nos sistemas biológicos. Os microrganismos podem complexar metais em solução, em polímeros extracelulares na superfície das células ou em compartimentos intracelulares, conforme Figura 1.

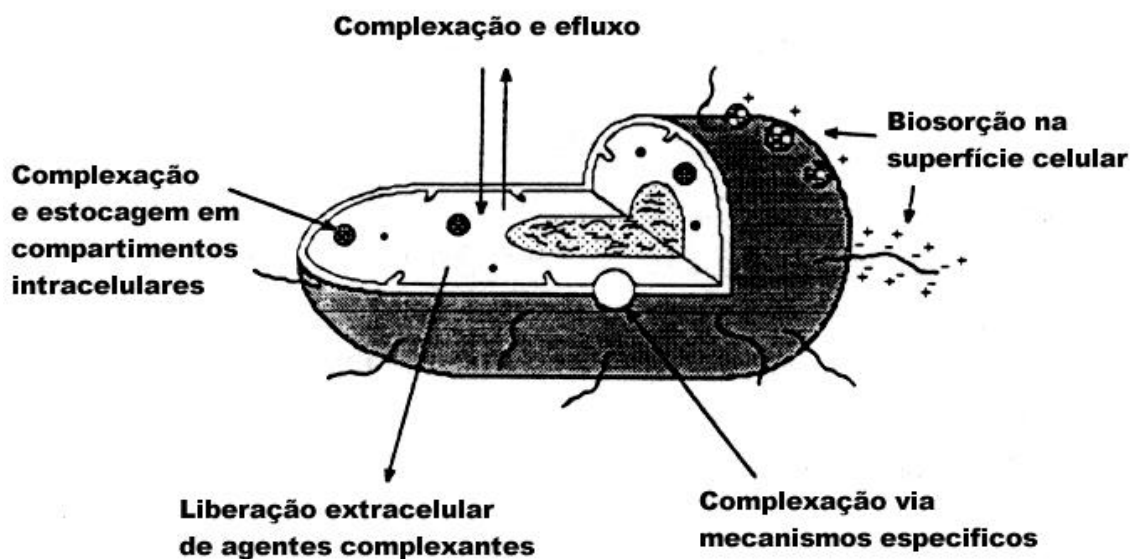


Figura 1- Mecanismos de interação entre metais e células microbianas.

Fonte: Birch & Bachofen (1990).

Qualquer um destes processos resultam em redução de toxicidade. De acordo com o seu tamanho ou carga os complexos formados não podem passar através da membrana celular e, por serem insolúveis, precipitam. Por outro lado, complexos de baixo peso molecular podem ser formados e entram na célula por difusão, podendo, então, um ou outro ser expelido de volta ao meio ou estocado em compartimentos intracelulares (Macaskie et al., 1987; Petterson et al., 1985; Tynecka et al., 1981).

Estes diferentes mecanismos são justificativas encontradas na literatura para explicar as diferenças de toxicidade observadas em certos metais e podem ter um papel significativo também nos fatores ambientais (Babich & Stotzky, 1980).

Um mesmo metal complexado com um organismo, mostra-se, em geral, com diferente nível de toxidez que o apresentado na sua forma livre (Babich & Stotzky, 1983; Sposito, 1983).

Para Gadd (1990) há consideráveis diferenças na produção de compostos complexantes, dependendo da fase de crescimento do organismo; células durante sua fase log produzem diferentes materiais complexantes daqueles formados na fase estacionária.

Os agentes quelantes microbiológicos não precisam, necessariamente, ser liberados dentro do meio mas podem permanecer em compartimentos intracelulares na superfície externa da célula, por exemplo na forma, de polissacarídeos ou polímeros. Eles podem fazer parte da parede celular ou apresentarem-se na forma de cápsulas agindo como eficientes metais biossorventes (Beveridge, 1989; Kaplan et al., 1987; Macaskie et al., 1987).

Segundo Gadd (1990), em alguns casos, a adsorção é seguida de internalização de um ou outro complexo, via processo ativo como é o caso de metais essenciais e alguns íons metais tóxicos ou por processo de difusão passiva o qual acredita-se ser a rota de adsorção para a maioria dos metais tóxicos.

A biosorção de íons de metais pesados por biomassa morta vem sendo empregada como alternativa para as já existentes tecnologias de remoção aplicadas para tratamento de águas residuais. A utilização de biomassa morta contorna o problema de toxicidade dos íons metálicos (Matis & Zouboulis, 1994).

A levedura, crescendo em meio contendo uma elevada quantidade de cátions metálicos, pode acumular esses metais em suas células (Volesky, 1990b). Esse fenômeno pode ser utilizado para a preparação de ingredientes de alimentos pobres em micronutrientes (Halász & Lásztity, 1991).

Peppler (1970) citou os teores de Ferro em linhagens de *S. cerevisiae* em diferentes substratos, variando estes entre 92 a 1010 $\mu\text{g/g}$ de Ferro em leveduras cultivadas em melaço; 71 a 200 $\mu\text{g/g}$ de Ferro em leveduras utilizadas em cervejaria; 157 $\mu\text{g/g}$ de Ferro em leveduras utilizadas em destilarias.

Machado (1997) menciona leveduras de “griffe” e sua composição bromatológica contendo a levedura Yea – Sacc da Altech, Inc., 436 ppm de ferro e a da Diamond V Mills, Inc., 75 ppm. Certamente a primeira, enriquecida em ferro.

Com baixa tecnologia e aproveitamento de capacidade ociosa de nossos produtores de álcool, facilmente poder-se-ia incrementar o teor de ferro, ainda que adsorvido, agregando valor a um produto que nem sempre é comercializado pelas destilarias.

Em células, pode ocorrer especial enriquecimento de íons e os coeficientes atingirem a ordem de 10^5 a 10^7 . A estabilidade dos coeficientes dos metais diminui com a baixa basicidade dos íons divalentes, na ordem: $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Cd} > \text{Mn} > \text{Mg} > \text{Ca} > \text{Sr} > \text{Ba} > \text{Ra}$ (Volesky, 1990).

2.8 Importância do ferro no organismo animal

Entre os microelementos, o ferro é o mais bem conhecido com respeito à função biológica desempenhada. É componente dos grupos heme das proteínas transportadoras de oxigênio, mioglobina e hemoglobina, e também da proteína transportadora de elétrons das mitocôndrias, o citocromo c. Muitas enzimas importantes, como a citocromo oxidase, a catalase e a peroxidase, possuem o heme como grupo prostético. Outras ferroenzimas, como o NADH desidrogenase e a ubiquinase, utilizam o ferro, mas não na forma heme (Lehninger, 1991).

A perda de ferro pelo organismo normalmente ocorre: quando houver perda de sangue; na bile, mas em pequenas quantidades, porque o organismo cuidadosamente reutiliza (recicla) o ferro resultante da destruição de hemoglobina, perdendo apenas uma pequena parte diariamente; quando as células da mucosa gastrintestinal são perdidas ao chegarem à extremidade da vilosidade, sendo o ferro eliminado juntamente. A

concentração do mineral nessas células é proporcional à do organismo. Portanto, quanto mais ferro existir, maior será a perda líquida do mineral. A descamação da mucosa intestinal é a principal forma de perda de ferro (Beitz & Allen, 1984; Bothwell & Finch, 1962; Marcondes et al., 1984).

Sob condições fisiológicas, o ferro é absorvido pelos seguintes sistemas: transporte ativo de ferro na forma reduzida (ferroso/ Fe^{+2}), mediante receptores nas células epiteliais do trato digestivo; transporte passivo de ferro na forma oxidada (férico/ Fe^{+3}) e também reduzida, por meio da mediação de pequenas moléculas (quelatos); por pinocitose, quando ligado ao heme (Frazzone et al., 1990, citado por Chaud, 1993).

A deficiência de ferro é bastante comum durante a fase de amamentação dos animais, isso porque o crescimento dos animais é alto; as reservas são pequenas; o alimento (leite) é pobre em ferro. O fornecimento de ferro via injetável é a prática eficaz mais largamente utilizada para fornecimento do mineral aos filhotes nessa fase onde praticamente só ingerem leite. Nos animais adultos, a deficiência de ferro dificilmente ocorre, porque as necessidades e as excreções são pequenas. No entanto animais em crescimento estão suscetíveis à deficiência pois o grande incremento de massa corpórea torna as necessidades relativamente altas. Em condições normais, a deficiência não é esperada porque a dieta deverá suprir essas necessidades (Beitz & Allen, 1984).

Algumas causas de deficiência de ferro mais comumente esperadas são: deficiência de ferro na dieta; indisponibilidade do ferro da dieta; interações antagônicas durante a absorção e transporte; perda de sangue por acidente; interações metabólicas (Lehninger, 1991).

Alguns sinais clínicos da anemia são: palidez; redução da taxa de crescimento; aparência grosseira; edema na língua (relativamente freqüente); rápida exaustão quando exercitado; dilatação do coração com excesso de líquido pericárdico; dilatação do baço (Whitehair & Miller, 1981).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

3.1 Levedura

Foi utilizada nos experimentos de fermentação, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fermento prensado comercial, produzido pela Mauri do Brasil – Pederneiras (SP).

3.2 Meios de cultivo

Para a reativação, isolamento, armazenamento, crescimento e fermentação das células de leveduras, foi utilizado o meio de cultivo YEPD (Yeast Extrat Peptone Dextrose), uma vez que se mostra adequado para a multiplicação da levedura estudada.

3.2.1 a) Meio YEPD ágar (Barnett et al., 1983) para cultura estoque e isolamento de colônias:

Extrato de levedura _____ 10 g
Peptona _____ 10 g
Glicose _____ 20 g
Ágar _____ 20 g
H₂O destilada _____ 1.000 mL

b) Meio YEPD ágar com fonte de ferro para experimentos de inibição e armazenamento da linhagem em diferentes concentrações:

Extrato de levedura _____ 10 g
Peptona _____ 10 g
Glicose _____ 50 g
Ágar _____ 20 g
H₂O destilada _____ 1.000 mL
Sulfato de Fe⁺² _____ 3,57; 7,14; 14,28; 17,86; 21,43 mmoles Fe²⁺/L

3.2.2 Meio YEPD caldo (Barnett et al., 1983) para reativação e crescimento da linhagem:

Extrato de levedura _____ 10 g
Peptona _____ 10 g
Glicose _____ 50 g
H₂O destilada _____ 1.000 mL

3.2.3 Meio YEPD caldo para fermentação com fonte de ferro:

Extrato de levedura	_____	10 g
Peptona	_____	10 g
Glicose	_____	50 g
H ₂ O destilada	_____	1.000 mL
Sulfato de Fe ⁺²	_____	1,4893 g/L ou 300 mg de Fe ²⁺ /L

Os meios citados e os tubos de diluição, contendo 9 mL de água destilada, foram esterilizados em autoclave a uma atmosfera de pressão, a 121°C, durante 20 minutos.

Identicamente, foi procedida à esterilização em estufa a 180°C, durante 2 horas das placas de Petri e pipetas sorológicas.

3.3 Isolamento e purificação da cultura de leveduras

Foi efetuado o procedimento de isolamento e purificação da linhagem visto tratar-se de cultura comercial

A cultura desidratada da linhagem Y-904 foi reativada em tubo de cultura contendo 5 mL de caldo YEPD esterilizado e incubada a 30°C ± 1°C durante 24 horas.

Procedeu-se à preparação de diluições seriadas a partir das culturas reativadas. A menor diluição decimal (10⁻¹) foi obtida transferindo-se 1 mL da amostra para um tubo de diluição contendo 9 mL de H₂O destilada e esterilizada, e assim sucessivamente, até obter a maior diluição decimal utilizada, ou seja, 10⁻⁶. Em seguida, realizou-se o plaqueamento em meio de cultivo YEPD ágar esterilizado, transferindo-se os inóculos de 0,1 mL das diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ por placa, promovendo-se o espalhamento deles

com espátula de Drigalsky. Também, a partir das amostras puras e das diluições 10^{-1} , foram realizadas estrias de esgotamento, utilizando-se assepticamente uma alça de platina, sendo as placas incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas.

Em seguida, colônias da cultura purificada, foram transferidas para tubos contendo YEPD ágar inclinado e incubados a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas para posteriormente serem armazenados à temperatura ambiente e repicados a cada 30-40 dias.

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

Foram preparados meios YEPD ágar esterilizados com as seguintes concentrações de Fe^{+2} : 0; 3,57; 7,14; 14,28; 17,86 e 21,43 mmoles Fe^{+2}/L .

A partir dos tubos contendo cultura pura em YEPD ágar inclinado, estas foram assepticamente transferidas para crescimento nas placas de Petri devidamente marcadas de acordo com a concentração de Fe^{+2} , para posterior contagem das colônias; as placas foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até que se detectasse o aparecimento de colônias, parâmetro este utilizado para a escolha da concentração de Fe^{+2} para enriquecimento consecutivo por fermentação.

3.5 Enriquecimento da levedura em meio YEPD caldo com fonte de ferro por fermentação

Em 500 mL de meio de cultura YEPD esterilizado, contendo a concentração de ferro determinada no item anterior, foram inoculados 50 g de massa úmida de fermento prensado e deixado fermentando em estufa a 30°C até se esgotar todo o açúcar, verificado pela presença de açúcar residual pelo método do ácido dinitrossalicílico

(DNS) segundo Miller (1959). Terminada a fermentação, a levedura foi separada do meio por centrifugação a 650 g por 15 minutos em centrífuga Damon / IEC Division modelo PR-6.000, a 15°C. A levedura retida no frasco do centrifugador foi lavada três vezes com água destilada e retirou-se uma alíquota de cerca de 3g de massa úmida que foi levada à estufa a 60°C até peso constante. O restante da levedura foi transferido para outro frasco com 500 mL de meio YEPD esterilizado contendo a concentração inicial de Fe^{+2} .

Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes, totalizando cinco fermentações consecutivas.

O meio residual e a levedura seca foram submetidos à digestão nitroperclórica para análise do teor de Fe^{+2} pelo método espectrofotométrico, segundo Loeppert & Inskeep (1996).

3.6 Enriquecimento da levedura morta em meio YEPD caldo com fonte de ferro

Foram inoculados 50 g de massa úmida de fermento prensado em 50 mL de água destilada e colocados em banho-maria por 2,5 horas a 80°C, em que, por meio do método de Pierce (1970) foi constatado que as células estavam com viabilidade celular igual a 0.

Posteriormente, essa levedura foi adicionada a 500 mL de meio YEPD esterilizado, contendo a concentração pré-determinada de Fe^{+2} , agitado por 15 minutos e, em seguida, centrifugado a 650 g por 15 minutos em centrífuga Damon / IEC Division modelo PR-6.000, a 15°C.

A levedura foi centrifugada e lavada três vezes com água destilada, levada à estufa a 60°C até peso constante. A seguir, levada para digestão nitroperclórica para análise do teor de Fe^{+2} pelo método espectrofotométrico, segundo Loeppert & Inskeep (1996).

3.7 Determinações analíticas químico-microbiológicas

As determinações analíticas do experimento foram divididas em microbiológica e química, como descrito a seguir.

3.7.1 Microbiológica

3.7.1.1 Viabilidade celular das leveduras

A porcentagem de células vivas foi determinada por meio de exame a fresco da suspensão de levedura coradas com azul de metileno, de acordo com Pierce (1970).

Foi acompanhada a viabilidade celular das leveduras durante o tratamento térmico, conforme descrito no item 4.6.

3.7.2 Química

As determinações químicas do experimento foram os açúcares redutores totais e o ferro (extrato nitroperclórico e determinação espectrofotométrica de ferro pela ortofenantrolina), como descritos a seguir.

3.7.2.1 Açúcares redutores totais

Os teores de açúcares redutores totais (ART), no meio residual, foram determinados pelo método do Ácido Dinitrossalicílico (DNS), segundo Miller (1959).

3.7.2.2 Ferro

– Obtenção do extrato nitroperclórico em amostras líquidas e sólidas

Após a secagem, 500 mg da amostra sólida e 10 mL do caldo residual foram submetidos à digestão nitroperclórica (HNO_3 ; HClO_4) até total descoloração, quando o material foi considerado mineralizado, segundo a metodologia proposta por Sarruge e Haag (1974).

– Determinação espectrofotométrica de ferro pela ortofenantrolina

Após a digestão nitroperclórica, o material foi diluído a 100 mL com água destilada em balão volumétrico e o Fe^{+2} foi quantificado por análise espectrofotométrica em comprimento de onda a 510 nm, segundo Loeppert & Inskeep (1996).

3.8 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 repetições por tratamento (Gomes, 1990).

Os resultados obtidos foram, inicialmente, submetidos ao Teste de Hartley para verificar se havia homogeneidade de variâncias, devendo os resultados ser transformados através da função raiz quadrada (Cochran, 1957).

A análise estatística prosseguiu com a aplicação da análise de variância com Teste F. Em seguida, foi aplicado o Teste de Tukey.

Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (1990).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento da levedura em meio com diferentes concentrações de Fe⁺²

Para melhor conhecimento da linhagem de *S. cerevisiae* em estudo, uma linhagem pouco pesquisada mesmo estando disponível comercialmente e já utilizada nas destilarias, foi, preliminarmente, testada sua tolerância a concentrações de Fe⁺².

As placas de Petri, contendo meio YEPD ágar e as seguintes concentrações de Fe⁺²: 0; 3,57; 7,14; 14,28; 17,86 e 21,43 mmoles/L, foram inoculadas com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 e levadas para crescimento em estufa à temperatura de 30°C, com posterior verificação do surgimento de colônias.

Após 24 horas, as placas controle (com 0 mmoles de Fe⁺²/L) e as placas com 3,57 mmoles de Fe⁺²/L já mostravam crescimento visível de colônias. Nas placas controle foram contadas as UFC (Unidades Formadoras de Colônias), e as com 3,57 mmoles de Fe⁺²/L foram deixadas para serem contadas no dia seguinte, isto é, 48 horas depois do surgimento das colônias, visto que as mesmas ainda estavam pequenas.

Nas placas com 7,14 mmoles de Fe⁺²/L, o crescimento pôde ser observado a partir de 48 horas após inoculação, contudo o número de colônias foi avaliado após 72 horas.

Após 96 horas, teve início a formação visível de colônias nas placas contendo 14,28 mmoles de Fe⁺²/L, entretanto, o número de colônias foi contado somente após 168 horas.

Já nas placas com 17,86 e 21,43 mmoles de Fe^{+2} /L, não houve colonização em 168 horas e, tampouco, depois de 360 horas ou mais.

O tamanho das colônias de levedura, de acordo com o aumento da concentração de Fe^{+2} nas placas, foi cada vez menor.

O número médio de colônias em UFC/mL é apresentado na Figura 2.

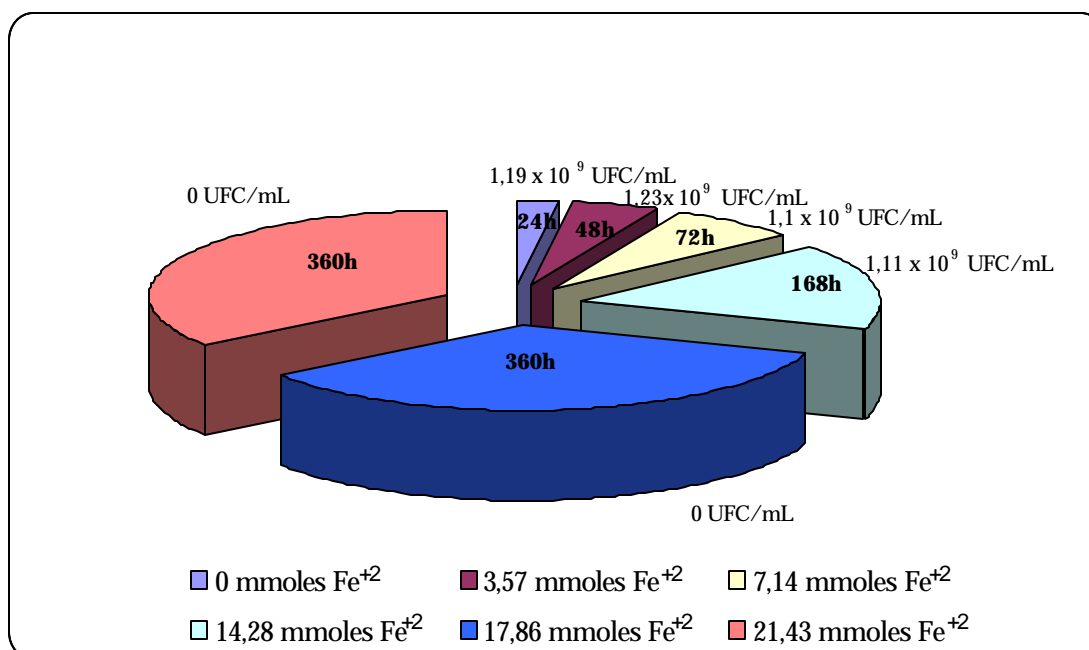


Figura 2 - Inibição da velocidade de crescimento da levedura em função dos teores de Fe^{+2} expressa em UFC/ mL e períodos de tempo para contagem.

A figura mostra que o surgimento das colônias em YEPD foi retardado no meio com maior concentração de Fe^{+2} . Além disso, a dimensão das colônias isoladas em placas enriquecidas com Fe^{+2} , foi menor que aquelas sem Fe^{+2} e tanto menores quanto maior a concentração de Fe^{+2} .

Pode-se observar ainda que o maior crescimento de colônias ocorreu entre as concentrações de 3,57 a 7,14 mmoles de Fe^{+2}/L em 24-72 horas, equivalentes a 200 e 400 ppm Fe^{+2} , respectivamente.

Sendo assim, o crescimento celular foi o parâmetro utilizado para a escolha do melhor nível de concentração de Fe^{+2} suportado pela levedura.

Como representado na Figura 1, o crescimento celular na concentração de 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L foi lento, o que levou à escolha de uma concentração de 300 ppm ou 5,36 mmoles de Fe^{+2}/L , concentração essa intermediária às concentrações de maior crescimento em menor tempo (200-400 ppm).

4.2 Isolamento da levedura crescida em concentrações de 3,57; 7,14 e 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L

Foram preparados tubos com meio YEPD, em ágar inclinado e esterilizado com concentrações de 3,57; 7,14 e 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L , aos quais foram transferidas, assepticamente, com alça de platina, as leveduras que cresceram, respectivamente, nas placas com as concentrações de 3,57; 7,14 e 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L ; os tubos foram incubados a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas.

O crescimento de colônias de leveduras foi observado nas três concentrações.

4.3 Crescimento da levedura isolada da placa com 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L , em ágar com 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L

Para testar o efeito inibitório da concentração de Fe^{+2} dos tubos contendo concentração de 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L (do item 5.2), foram transferidos uma alça para os meios YEPD controle (0 mmol de Fe^{+2}/L) e YEPD com 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L .

Ambos foram cultivados a 30°C por 48 e 96 horas, respectivamente e, a seguir, plaqueados em YEPD ágar com 14,28; 17,86 e 21,43 mmols de Fe^{+2}/L , conforme Figura .

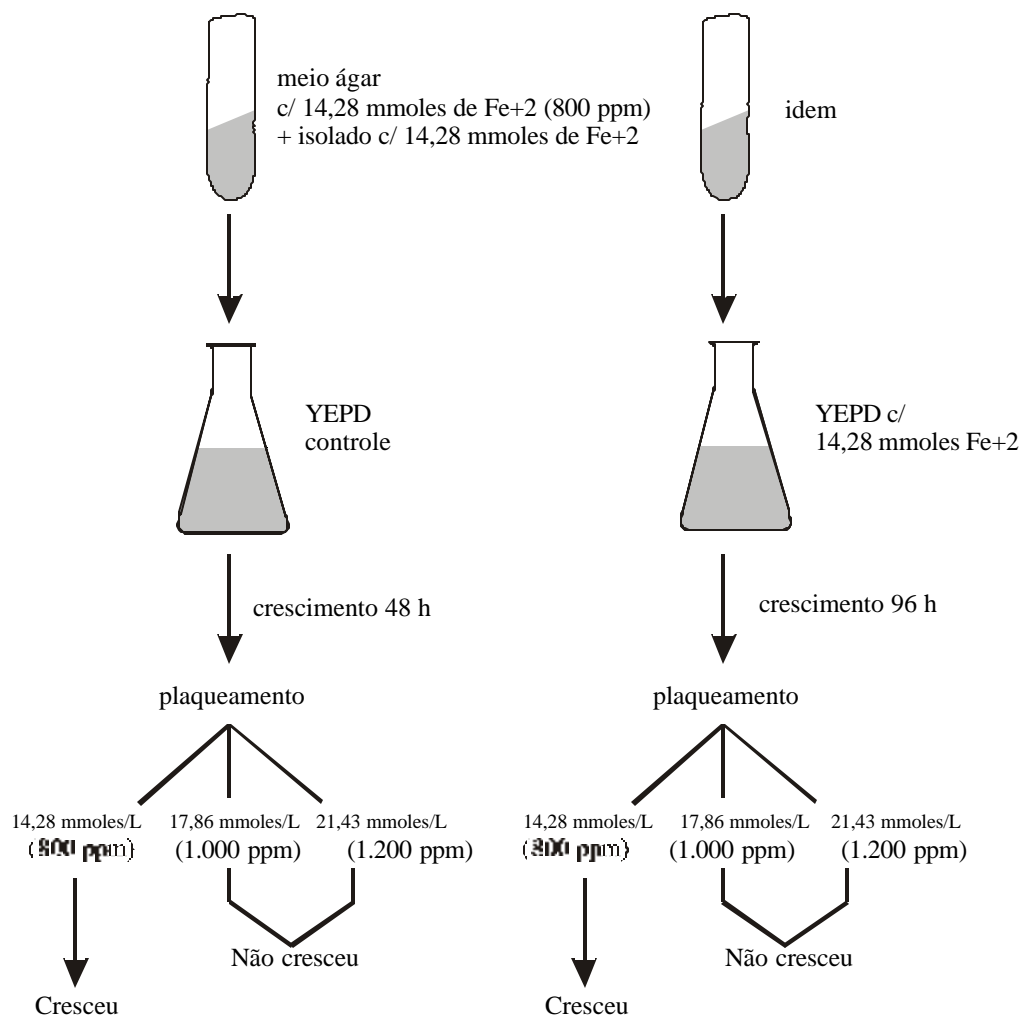


Figura 3 - Efeito inibitório da concentração de Fe^{+2} no crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Observa-se que não há desenvolvimento nas concentrações ensaiadas acima de 14,28 mmoles de Fe^{+2}/L , confirmando a inibição pela concentração.

4.4 Enriquecimento da levedura em meio YEPD caldo para assimilação e fermentação com fonte de ferro

Os ensaios a seguir serviram para testar a capacidade de adsorção de íons Fe^{+2} em cultivos sucessivos na concentração constante de 5,36 mmoles de Fe^{+2}/L e com células que já vinham de processo acumulativo de biosorção.

Os experimentos de enriquecimento com Fe^{+2} foram realizados em 5 fermentações consecutivas em meio descrito no item 4.2.3, aproveitando-se como inóculo todo o fermento utilizado na fermentação anterior menos a alíquota tomada para análise do teor de Fe^{+2} adsorvido. Foi analisado, ainda, o teor de Fe^{+2} residual do meio de fermentação e calculada a adsorção em mg de Fe^{+2} por quilo de matéria seca. Os resultados são mostrados no Quadro 1.

As fermentações foram conduzidas estáticas supondo-se sempre que um processo para fins de enriquecimento ainda deve ser estudado para obtenção de máxima produtividade e aproveitamento de instalações ociosas que possam existir em nossas destilarias de álcool.

Os valores encontrados no Quadro 1 mostram que em cada ciclo, praticamente, o ferro adicionado ao meio de fermentação foi adsorvido pelas células em cultivo e que a duração de cada ciclo, foi suficiente para todo o consumo de açúcar e adsorção de ferro pelas leveduras em fermentação.

Observando-se, entretanto o Quadro 2, verifica-se que o teor de ferro adsorvido pela massa de levedura é variável e que se todo ferro adicionado ao meio foi incorporado ao microrganismo por biosorção em cada ciclo, então a variação em concentração de ferro na massa corresponde ao maior ou menor crescimento celular na condição experimental. Como nos cinco ciclos seguidos todo o ferro e o açúcar foram totalmente

consumidos do meio e a concentração média de ferro foi de $75 \text{ mg de Fe}^{+2} \text{ kg}^{-1}$ de levedura, pode-se concluir que mais ciclos poderiam ter sido repetidos consecutivamente para alcançar maior riqueza ou ainda supor-se que em meio líquido, com maior concentração em ferro, poder-se-ia obter mesmo enriquecimento ou maior, em um tempo e número de ciclos diferentes do obtido no presente ensaio. Pode-se então supor que o enriquecimento, dependendo do processo adotado e sua otimização, pode seguir raciocínio semelhante ao ensaio de inibição pela concentração, encontrando-se uma concentração e um número de ciclos que atinjam a toxidez, um limite então ao enriquecimento e que quiçá possa ainda variar com o gênero e espécie em estudo (Gadd, 1990; Peppler, 1970; Volesky, 1990b).

Fermentação com meios YEPD + 5,36 mmoles Fe ⁺² (300 mg/L)	mmoles Fe ⁺² do meio residual (média de 5 repetições)	Adsorção	
		mmoles Fe ⁺² /L	mg Fe ⁺² /L
Fermentação 1	0,0150	5,3450	299,32
Fermentação 2	0,0041	5,3559	299,93
Fermentação 3	0,0027	5,3573	300,00
Fermentação 4	0,0047	5,3130	297,53
Fermentação 5	0,0047	5,3130	297,53

Quadro 1 - Adsorção de ferro pela levedura *S. cerevisiae* ao longo de 5 fermentações consecutivas.

As fermentações consecutivas foram conduzidas para obter ambiente típico de fermentação.

Verifica-se que, ao longo das 5 fermentações consecutivas, ocorreu menor adsorção apenas na primeira fermentação, quando se inocularam 50 g de massa úmida em 500 mL ou, aproximadamente, 30 g de matéria seca de levedura por litro, ou cerca de 10% de células em volume. Pelos dados de Rosini (1986), poderíamos projetar que um inóculo dessa dimensão poderia gerar cerca de 10% de novas células a cada fermentação, entretanto, a adsorção não segue uma proporção definida, mas pode ter incrementos além do que se poderia esperar.

Do ponto de vista de nutrição animal, sabemos que a forma preferida seria a do ferro orgânico ou aquela que fosse incorporada à célula como produto de absorção em forma de quelatos. Entretanto essa absorção é da ordem de $2,68 \times 10^{-4}$ mmoles/g (Lessuisse et al., 1987).

A absorção e a adsorção podem ser mecanismos de microrganismos que suprem e armazenam elementos úteis ao seu metabolismo. Assim, a absorção pode servir aos quesitos imediatos de necessidade fisiológica e a adsorção, como uma reserva para quando o ambiente favorecer utilização rápida mas sem completude de elementos. A literatura é mais rica no aspecto de adsorção de metais pesados por leveduras, usando sua capacidade adsortiva para descontaminação (Brady & Duncan, 1994; Gadd, 1990; Volesky, 1990 a; Volesky, 1990 b; Volesky e May-Phillips, 1995).

O Quadro 2 e a Figura 4 mostram o acúmulo de Fe^{+2} adsorvido nas cinco fermentações sucessivas. A Figura 5 mostra as diferenças de acúmulo entre os ciclos de fermentação.

Fermentação com meio YEPD + 5,36 mmoles Fe⁺² (300 mg Fe⁺²/L)	mmoles Fe⁺²/kg matéria seca (média de 5 repetições)	mg Fe⁺² / kg de levedura (média de 5 repetições)
Fermentação 1	1,43	80,30
Fermentação 2	1,85	103,43
Fermentação 3	3,68	206,15
Fermentação 4	5,04	282,44
Fermentação 5	6,68	374,33

Quadro 2 - Acúmulo de ferro na matéria seca da levedura *S. cerevisiae* em 5 fermentações consecutivas.

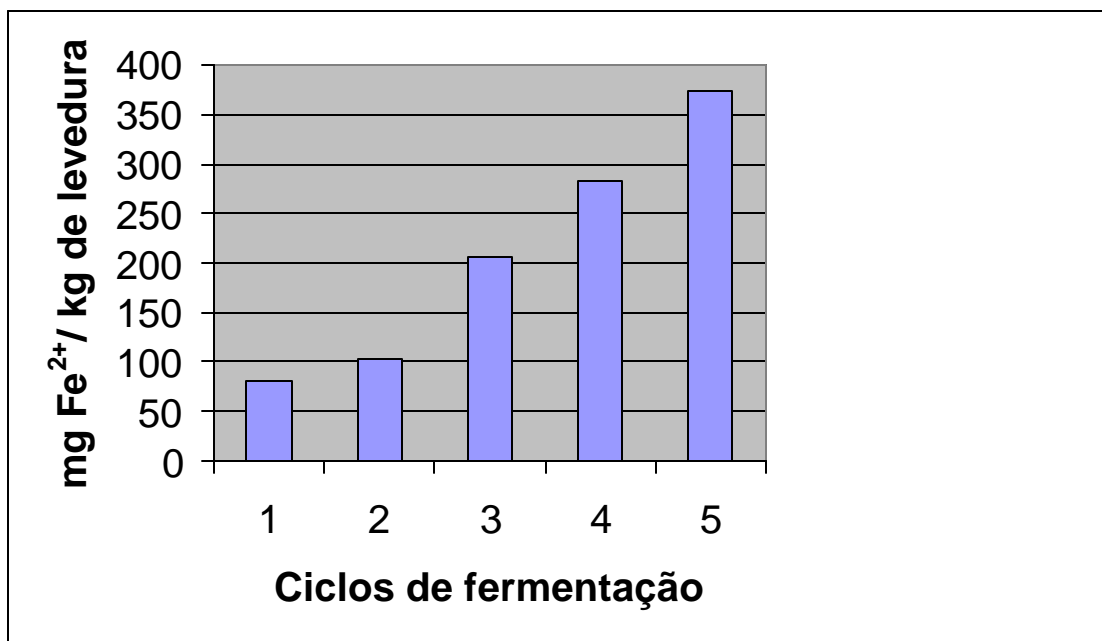


Figura 4 - Acúmulo de Fe²⁺ pela levedura.

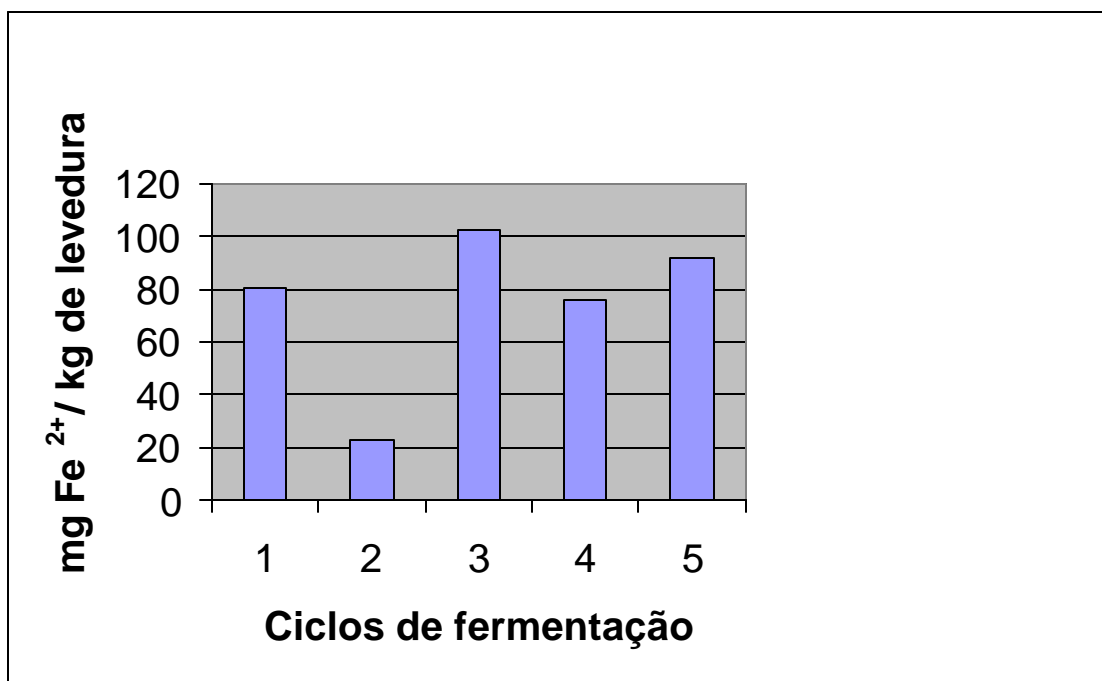


Figura 5 - Diferença de acúmulo de Fe²⁺ por ciclo.

De acordo com o ensaio pré-determinado para a escolha da concentração ideal de Fe^{+2} (item 5.1.) pode-se constatar que a escolha da concentração de 5,36 mmoles de Fe^{+2}/L , não foi ao acaso. Neste estudo verificou-se que nesta concentração as leveduras apresentaram um ótimo de crescimento, ao passo que nas concentrações de 17,86 e 21,43 mmoles de Fe^{+2} não houve colonização e crescimento das mesmas, demonstrando que nestas concentrações o teor de Fe^{+2} é tóxico passando de fator estimulante para inibidor de seu crescimento. Entretanto, como já foi enfatizado, o experimento em meio líquido poderia ter conduzido a outros resultados como menor número de ciclos ou ainda mais ciclos em cascata e gradual elevação do enriquecimento.

Os dados foram submetidos a análise estatística na qual o teste F revela-se significativo a 1% de probabilidade (Quadro 3) e todos os tratamentos diferem entre si, segundo o teste de Tukey (Quadro 4).

CV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	4	18514,609	4628,652	2984,21**
Resíduo	20	31.021	1551	
Total	24	18545,630		

Quadro 3 - Teste F da levedura enriquecida.

Fermentação	Média	Teste de Tukey
1 ^a	80,30	A
2 ^a	103,43	B
3 ^a	206,16	C
4 ^a	282,44	D
5 ^a	374,33	E

Quadro 4 - Teste de Tukey da levedura enriquecida.

Obs.: Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Foi ainda ensaiada a capacidade de adsorção de Fe^{+2} pela levedura morta conforme descrição no item 4.6. e Quadro 5.

Os resultados deste ensaio revelaram que para esta levedura nas condições experimentais, 60 mg Fe^{+2} / kg de matéria seca foram adsorvidos e se tratando de células mortas, todo o ferro restante permaneceu no meio sobrenadante. Esta adsorção é bastante pequena mas não se pode desprezar como um meio rápido de se obter acréscimo de até 60 mg Fe^{+2} / kg de matéria seca.

Amostra	mmoles Fe⁺²/kg de levedura matéria seca	mg de Fe⁺²/kg de levedura matéria seca
1	1,08	60,66
2	0,99	58,37
3	0,99	58,37
4	0,97	57,22
5	1,01	59,51
6	1,01	59,51
7	1,03	60,66
8	0,99	57,22
9	0,99	57,22
10	0,99	58,37
11	1,01	59,51
12	0,99	58,37
13	0,99	58,37

Quadro 5 - Acúmulo de ferro na levedura tratada termicamente.

5 CONCLUSÕES

As seguintes conclusões podem ser tiradas do presente trabalho:

- A maior concentração de Fe^{+2} em que se verificou crescimento de colônias em placas de Petri, foi de 14,28 mmoles/L ou 800 ppm de Fe^{+2} após 168 horas de cultivo;
- O meio contendo Fe^{+2} em concentrações crescentes torna-se inibidor do crescimento das colônias verificado pelo retardamento do aparecimento destas até a total inibição em concentração de 1000 ppm de Fe^{+2} ;
- A levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 possui uma capacidade de acúmulo de Fe^{+2} , em meio contendo 300 ppm de Fe^{+2} ou 5,56 mmoles/L, de até 6,68 mmoles Fe^{+2} por kg de matéria seca em 5 fermentações consecutivas;
- A adsorção de Fe^{+2} por células mortas também ocorre de maneira que pode ser utilizado como um meio rápido de pequeno enriquecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R. **Curso sobre fermentação alcoólica**. Piracicaba: ESALQ, Instituto Zimotécnico, 1960. v.2, p. 254-260.

ÂNGELI, D.F. de; THOMAZINI, E.E.M. Leveduras: uma fonte suplementar de alimentos. **Revista Brasileira de Química**, v.88, n.533, p.113-115, 1980.

BABICH, H.; STOTZKY, G. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms. **CRC Critical Reviews Microbiology**, v.8, n.7, p.99-145,1980.

BABICH.H.; STOTZKY, G. Influence of chemical speciation on the toxicity of heavy metals to the microbiota. In: NRIAGU, J.O.(Ed.) **Aquatic toxicology**. New York: Wiley & Sons, 1983. p.1-46.

BAPTISTA, A. S. *Saccharomyces cerevisiae* em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses. Piracicaba, 2001. 94p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge: University Press, 1983. 811p.

- BEITZ, D. C.; ALLEN, R. S. Digestion and absorption. In: SWENSON, M. J. (Ed.) **Dukes physiology of domestic animals**. 10.ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1984. cap.24, p. 325-332.
- BERTO, D.A. Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (*Saccharomyces spp*) na alimentação de leitões em recria. Piracicaba, 1985. 133p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BEVERIDGE, T. J. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. **Annual Review Microbiology**, v.43, n.3, p.147-171, 1989.
- BIRCH, L.; BACHOFEN, R. Complexing agents from microorganisms. **Experientia**, v.46, n.7, p. 827–834, 1990.
- BOTHWELL, T. H.; FINCH, C. A. **Iron metabolism**. Boston: Little - Brown, 1962. 298p.
- BRADY, D.; DUNCAN, J.R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, n.1, p.149-154, 1994.
- BUTOLO, J.E. Uso de biomassa de levedura em alimentação animal: propriedades, custo relativo a outras formas de nutrientes. In: WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, Campinas, 1996. **Resumos**. Campinas: ITAL, 1996. p.70-89.
- CHAUD, M. V. Quelato peptídeo-ferro: uma alternativa para aumentar a biodisponibilidade de ferro. Ribeirão Preto, 1993. 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

- COCHRAN, W. G. **Experimental design**. 2.ed. New York: Wiley & Sons, 1957. 611p.
- DZIEDAK, J.D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, v.41, n.2, p.104, 1987.
- FURCO, A.M. Produção de biomassa de levedura em destilaria de álcool. In: WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, Campinas, 1996. **Resumos**. Campinas: ITAL, 1996. p.52-58.
- GAAD, G.M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v.46, n.8, p.834-840, 1990.
- GHIRALDINI, J.A.; ROSSELL, C.E.V. Caracterização e qualidade de levedura desidratada para a alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: CBNA, 1997, p.27-50.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 467p.
- HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 312p.
- HOLAN, Z.R.; VOLESKY, B. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. **Biotechnology & Bioengineering**, v.43, n.11, p.1001-1009, 1994.

- HORII, J. Tecnologia da produção de levedura desidratada visando à qualidade do produto final. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: CBNA, 1997. p.7-26.
- HSU, W. C. Protein from sugar in Taiwan. **Sugar y Azucar**, v.56, n.33, p.128-137, 1961.
- KAPLAN, D.; CHRISTIAEN, D.; ARAD, S. M. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. **Applied Environmental Microbiology**. v.53, n.9, p. 2953-2956, 1987.
- KILBERG, R. The microbe as a source of food. **Annual Review of Microbiology**. v.26, n.5, p.428-466, 1972.
- KRIDER, J.L.; CONRAD, J.H., CARROL, W.W. **Swine production**. 8.ed. New York: McGraw-Hill, 1982. 679p.
- LAHR FILHO, D.; GHIRALDINI, J.A.; ROSSELL, C.E.V. Estudos de otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In: WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, Campinas, 1996. **Resumos**. Campinas: ITAL, 1996. p.59-67.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1991. 725p.
- LODDER, J. **The yeast**: a taxonomic study. 2.ed. Amsterdam: North Holland, 1971. 1385p.

- LOEPPERT, R.H.; INSKEEP, W.P. Iron. In: BARTELS, J. M. (Ed.) **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. cap.23, p.658-664.
- MACASKIE, L. E.; DEAN, A. C. R.; CHEETHAM, A. K. et al. Cadmium accumulation by a *Citrobacter* spp.: the chemical nature of the accumulated metal precipitate and its location on the bacterial cells. **Journal General Microbiology**. v.133, n.13, p.538-544, 1987.
- MACHADO, P. F. Uso da levedura desidratada na alimentação de ruminantes. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: CBNA, 1997. p.111-128.
- MACHADO, P.F.; LIMA, U.; D'ARCE, R.D. et al. Valor nutritivo da levedura (*Saccharomyces spp*) para vacas em lactação. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.21, n.3, p.509-519, 1984.
- MARCONDES, M.; SUSTOVICH, D. R.; RAMOS, O. L. **Clínica médica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. cap.14, p.426-454: Hematologia.
- MATIS, K.A.; ZOUBOULIS, A.I. Flotation of cadmium: loaded biomass. **Biotechnology & Bioengineering**, v.44, n.3, p.354-360, 1994.
- MILLER, G.L. Use of denitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MIYADA, V.S.; LAVORENTI, A. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilaria de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de suínos em crescimento e acabamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.8, n.3, p.497-515, 1979.

- MOREIRA, J. R. de Alencar. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilaria de álcool de cana-de-açúcar em ração isocalórica para suínos em crescimento e acabamento. Piracicaba, 1984. 107p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PANOBIANCO, M.A.; ARIKI, J.; JUNQUEIRA, O.M. Utilização de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de álcool de cana-de-açúcar em dietas de poedeiras. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.18, n.1, p.13-20, 1989.
- PEPPLER, H. J. Food yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (eds). **The yeasts**. London: Academic Press, 1970. v.3, cap.8, p.423-462.
- PETTERSON, A.; KUNST, L.; BERGMAN, B.; ROOMANS, G. Accumulation of aluminium by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls and X-ray dispersive microanalysis study. **Journal General Microbiology**, v.131, p.2545-2548, 1945.
- PIERCE, J.S. Analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v.76, n.5, p.442-443, 1970.
- PINOTTI, R.F. Aproveitamento da levedura de fermentação alcoólica para ração. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 3., São Paulo, 1984. **Anais**. São Paulo: STAB, 1984. p.461-465.
- RHEINBOLDT, P.H.H.; LEIMER, K.H.; ROSSELL, C.E.V. Sangria e secagem de levedura de destilaria: processo Copersucar. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 4., Olinda, 1987. **Anais**. São Paulo: STAB, 1987. p.589-593.

- ROSINI, G. Wine – making by cell – recycle – batch fermentation process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.24, n.2, p.140-143, 1986.
- SALGADO, J.M. Alguns fatores que afetam a qualidade do concentrado protéico obtido em destilaria de álcool. Piracicaba, 1976. 50p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análise química em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Depto. de Química, 1974. 55p.
- SAS Institute. **SAS users guide**: statistic. 6ed. Cary: SAS Institute, 1990. 588p.
- SPOSITO, G. The chemical forms of trace metals in soil. In: THORNTON, I. **Applied environmental geochemistry**. London: Academic Press, 1983. cap 3, p.123-170.
- TYNECKA, Z.; GOS, Z.; ZAJIE, J. Energy: dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.147, n.7, p.313-319, 1981.
- VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990a. cap.1.1, p.3-6: Biosorption and biosorbents.
- VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990b. cap.2.3, p.139-171: Biosorption by fungal biomass.
- VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990c. cap.1.2, p.7-43: Removal and recovery of heavy metals biosorption.
- VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H.A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, n.5, p.797-806, 1995.

- WHITAKER, H.M. de A.; SILVA, A.E.O.; MANZANO, A. Utilização da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de álcool de cana-de-açúcar em ração para equinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.24, n.6, p.1.008-1.015, 1995.
- WHITEHAIR, C. K.; MILLER, E. R. Nutritional deficiencies. In: LEMAN, A. D.; GLOCK, R. D.; MENGELING, W.L. et al. **Diseases of swine**. 5ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. cap.61, p.656-670.
- WOOD, J.M.; WANG, H.K. Microbial resistance to heavy metals. **Environmental Science Technology**, v.17, n.12, p.582-590, 1983.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Número de colônias de leveduras em diferentes concentrações de sulfato de ferro.

Horas de crescimento para contagem	[] Sulfato de ferro (mg/L)	Número de colônias de levedura
24	0	119; 112; 101; 130; 113; 130; 101; 100; 104; 129; 125; 119; 119; 121; 130; 127;124; 128; 130; 126
48	200	126; 110; 101; 132; 144; 143; 159; 120; 143; 120; 109; 118; 116; 113; 119; 123; 121; 118; 115; 121
72	400	113; 118; 101; 119; 115; 104; 101; 113; 123; 106; 108; 114; 103; 102; 101; 110; 117; 108; 112; 119
168	800	101; 109; 104; 108; 115; 106; 106; 103; 104; 122; 101; 108; 115; 115; 121; 119; 107; 121; 120; 119
360 ou mais	1.000	Não houve crescimento
360 ou mais	1.200	Não houve crescimento

APÊNDICE 2 - Resultados do teor de ferro dos meios residuais com digestão

nitro-perclórica (onde T = leitura de transmitância; d = diluição).

$$y = (12,3196 - 6,1741 \times \log T) \times d$$

Meios	Média T	mgFe⁺²/L
M ₁	85,80	0,7642
M ₁	83,80	0,8907
M ₁	84,87	0,8226
M ₁	84,50	0,8461
M ₁	83,87	0,8862
M ₂	94,77	0,2310
M ₂	94,23	0,2616
M ₂	95,00	0,2180
M ₂	95,13	0,2106
M ₂	94,97	0,2197
M ₃	95,80	0,1730
M ₃	96,13	0,1545
M ₃	96,20	0,1506
M ₃	96,20	0,1506
M ₃	96,50	0,1339
M ₄	93,27	0,3165
M ₄	94,53	0,2446
M ₄	94,50	0,2463
M ₄	94,50	0,2463
M ₄	94,30	0,2576
M ₅	94,30	0,2576
M ₅	94,20	0,2633
M ₅	93,60	0,2976
M ₅	94,50	0,2463
M ₅	94,56	0,2429

APÊNDICE 3 - Teores de ferro na levedura em sucessivas fermentações com digestão nitro-perclórica.

Rodadas de Fermentação	Média T	mgFe⁺²/Kg levedura
F ₁	91,76	80,8100
	91,83	79,9921
	91,57	83,0331
	91,93	78,8247
	91,93	78,8247
F ₂	89,20	113,5656
	90,00	101,5817
	90,03	101,2243
	90,20	99,2009
	90,00	101,5817
F ₃	81,00	214,5857
	81,67	205,7505
	82,00	201,4255
	82,03	201,0332
	81,50	207,9854
F ₄	76,00	282,9239
	76,00	282,9239
	76,10	281,5135
	76,00	282,9239
	76,07	281,9364
F ₅	70,50	363,4942
	70,20	368,0679
	70,07	370,0560
	69,13	384,5417
	69,07	385,4730

$$y = (12,3196 - 6,1741 \times \log T) \times d$$

APÊNDICE 4 - Resultados do teor de ferro na levedura “mortas” com digestão nitro-perclórica.

Levedura tratada termicamente	Média T	mgFe⁺²/Kg levedura
L _{M1}	93,50	60,6622
L _{M2}	93,70	58,3705
L _{M3}	93,70	58,3705
L _{M4}	93,80	57,2264
L _{M5}	93,60	59,5157
L _{M6}	93,60	59,5157
L _{M7}	93,50	60,6622
L _{M8}	93,80	57,2264
L _{M9}	93,80	57,2264
L _{M10}	93,70	58,3705
L _{M11}	93,60	59,5157
L _{M12}	93,70	58,3705
L _{M13}	93,70	58,3705

$$y = (12,3196 - 6,1741 \times \log T) \times d$$

onde,

T = leitura de transmitância;

d = diluição.

APÊNDICE 5 - Resultados da quantidade de açúcares redutores no meio residual pelo método do DNS (T= leitura de transmitância; d = diluição).

Meios	Média T	Log T	[] Açúcares Redutores (g/l)
M ₁	94,1	1,9736	0,4193
	93,0	1,9685	0,5028
	93,0	1,9685	0,5028
	94,0	1,9731	0,4268
M ₂	96,2	1,9832	0,2625
	96,0	1,9823	0,2773
	95,8	1,9814	0,2921
	95,8	1,9814	0,2921
M ₃	96,0	1,9823	0,2773
	96,0	1,9823	0,2773
	95,7	1,9809	0,2995
	96,0	1,9823	0,2773
M ₄	97,0	1,9868	0,2036
	98,0	1,9812	0,1307
	98,0	1,9812	0,1307
	98,0	1,9812	0,1307
M ₅	96,0	1,9823	0,2773
	97,0	1,9868	0,2036
	97,0	1,9868	0,2036
	96,5	1,9845	0,2403

$$y = (8,1772 - 4,0902 \times \log T) \times d$$