The background of the entire page is a grayscale micrograph showing numerous yeast cells. The cells are roughly oval-shaped and appear to be budding, with some showing distinct necks where new cells are forming. The lighting is soft, highlighting the texture of the cell walls and the internal structures.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Messias Miranda Junior

**“ESTUDOS FISIOLÓGICOS COM LEVEDURAS INDUSTRIAIS
PRODUTORAS DE ETANOL: EFEITO DA NATUREZA DA FONTE
DE NITROGÊNIO”**

Araraquara

2012

Messias Miranda Junior

**“ESTUDOS FISIOLÓGICOS COM LEVEDURAS INDUSTRIAIS
PRODUTORAS DE ETANOL: EFEITO DA NATUREZA DA
FONTE DE NITROGÊNIO”**

Trabalho apresentado ao Instituto de Química, UNESP, Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ernandes

**Araraquara
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Miranda Junior, Messias
M672e Estudos fisiológicos com leveduras industriais produtoras
de etanol : efeito da natureza da fonte de nitrogênio / Messias
Miranda Junior. – Araraquara : [s.n], 2012
121 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: José Roberto Ernandes

1. Biotecnologia. 2. Fermentação. 3. *Saccharomyces
cerevisiae*. I. Título.

Dados Curriculares

Messias Miranda Junior

1. Dados pessoais

Nascimento: 17 de Janeiro de 1983

Nacionalidade: brasileiro

Naturalidade: Arandú - SP

Estado civil: solteiro

Filiação: Messias Miranda
Clarice Mendes Miranda

Profissão: Biomédico

Endereço pessoal: Rua Francisco Feresin, nº 55

CEP: 18710-000 - Arandú - SP

Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
Rua Prof. Francisco Degno s/ nº
CEP: 14800-900 - Araraquara - SP

2. Formação acadêmica

Doutorado em Biotecnologia, concluído em Fevereiro de 2012, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara - SP.

Mestrado em Biotecnologia, concluído em Janeiro de 2008, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara - SP.

Bacharel em Biomedicina, concluído em 2005, Centro Universitário de Araraquara - UNIARA, Araraquara - SP.

3. Atividades de pesquisa desenvolvidas no Doutorado

3.1 Publicações

MIRANDA Jr, M., BATISTOTE, M., ERNANDES, J. R. Evaluation of Brazilian Ethanol Production Yeasts for Maltose Fermentation in Media Containing Structurally Complex Nitrogen Sources. **Journal of the Institute of Brewing (aceito para publicação)**, 2011.

MIRANDA Jr, M., BATISTOTE, M., CILLI, E. M., ERNANDES, J. R. Sucrose Fermentation by Brazilian Ethanol Production Yeasts in Media Containing Structurally Complex Nitrogen Sources. **Journal of the Institute of Brewing**. v.115, p.191 - 197, 2009.

3.2 Participação em congressos

XL Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2011.

XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2010.

XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009.

Encontro da Sociedade Brasileira de Química - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009.

XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2008.

XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2008.

3.3 Trabalhos apresentados em congressos

MIRANDA Jr, M., ERNANDES, J. R. VERY HIGH GRAVITY SUCROSE FERMENTATION BY FUEL-ETHANOL PRODUCING YEASTS STRAINS USING HIGH CELL DENSITY: EFFECT OF CELL RECYCLING.

Evento: 1st Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference (BBEST), 2011

BETITE, V.C.; MIRANDA Jr., M.; ERNANDES, J.R. VERY HIGH GRAVITY SUCROSE FERMENTATION BY FUEL-ETHANOL PRODUCING INDUSTRIAL STRAINS: EFFECT OF NITROGEN SUPPLEMENTATION.

Evento: 1st Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference (BBEST), 2011

MIRANDA Jr, M., ERNANDES, J. R. ETHANOL PRODUCTION IN VERY HIGH GRAVITY FERMENTATION BY ETHANOL PRODUCTION YEASTS STRAINS.

Evento: XL Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and molecular Biology (SBBq), 2011.

MIRANDA Jr, M., ERNANDES, J. R. MALTOSSE AND GLUCOSE FERMENTATION BY ETHANOL PRODUCTION YEASTS STRAINS IN MEDIA CONTAINING COMPLEX NITROGEN SOURCES, 2010.

Evento: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and molecular Biology (SBBq), 2010.

MIRANDA Jr, M., ERNANDES, J. R. RELATIONSHIP BETWEEN TREHALOSE PRODUCTION AND FERMENTATIVE CAPACITY IN ETHANOL PRODUCTION YEASTS STRAINS IN MEDIA CONTAINING COMPLEX NITROGEN SOURCES.

Evento: XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and molecular Biology (SBBq), 2009.

MIRANDA Jr, M., ERNANDES, J. R. SUCROSE FERMENTATION BY INDUSTRIAL ETHANOL PRODUCTION IN MEDIA CONTAINING STRUCTURALLY COMPLEX NITROGEN SOURCES.

Evento: 17 Encontro da Sociedade Brasileira de Química - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti; Inst.promotora/financiadora: Instituto de Química de Araraquara-

UNESP, 2009

MIRANDA Jr, M., BATISTOTE, M., ERNANDES, J. R. GLUCOSE AND FRUCTOSE UTILIZATION BY WINE YEASTS IN MEDIA CONTAINING STRUCTURALLY COMPLEX NITROGEN SOURCES.

Evento: 12th International Congress on Yeasts; Inst.promotora/financiadora: Head of the Organizing Committee of the 12th International Congress on Yeasts, 2008.

MIRANDA Jr, M., BATISTOTE, M., CRUSCA JUNIOR, E., CILLI, E. M., ERNANDES, J. R. NITROGEN PROFILING DURING FERMENTATIONS BY INDUSTRIAL WINE YEASTS IN SYNTHETIC MUST SUPPLEMENTED WITH NITROGEN SOURCES.

Evento: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and molecular Biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2008.

A Deus

“Desde o início de nossa caminhada, Tu estavas conosco.

Dias e noites se passaram.

Vitórias foram conquistadas.

Derrotas foram superadas.

Amizades foram criadas.

Conhecimentos foram adquiridos.

... e agora que alcançamos o nosso objetivo, viemos.

Te louvar, Te agradecer e Te oferecer

Humildemente a vida, o amor, a felicidade e enfim, a vitória.”

Desse momento

“Obrigado Senhor!”

*Aos meus pais **Messias Miranda** e **Clarice Mendes Miranda**
e a minha tia **Marta Mendes**, que desde o início me
incentivaram,
me guiaram, me aconselharam e me serviram
de toda amizade e companheirismo pelo trajeto
percorrido,
principalmente nos momentos mais difíceis.....,*

Meu sincero obrigado

*A todos os familiares e amigos que me incentivaram e
apoiaram....*

Agradecimentos

O final de uma Tese é um momento em que a realização pessoal e o crescimento profissional fazem com que qualquer sentimento de dificuldade e desespero durante a realização do trabalho se transforme em alegria e alívio em virtude do amadurecimento, aprendizagem profissional e acadêmico. E para que esses sentimentos sejam possíveis, dedico este trabalho a pessoas que fizeram parte dele direta ou indiretamente, possibilitando sua conclusão.

Os meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. José Roberto Ernandes, que possibilitou a realização desse trabalho, pela oportunidade, confiança, orientação, pelas discussões e sugestões, por me apoiar nas minhas decisões e pela amizade.

A Prof^a Dra. Maria Célia Bertolini por me auxiliar e apoiar.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia, principalmente do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica pelas conversas, companheirismo, convivência e que sempre possibilitaram uma boa conversa e discussão.

Ao pessoal do laboratório que sempre me apoiou e possibilitou ótimas conversas.

Aos meus amigos Rodrigo Duarte e Renan Belmonte que além de possibilitarem grande amizade, também me aturaram como vizinho. Valeu pessoal, sempre estaremos juntos nesse caminho a trilhar.

À minha amiga Margarete Batistote, que sempre me apoiou nesse trabalho, pelas conversas, discussões, companheirismo, amizade e pelos ensinamentos.

Aos amigos Érick e Heloisy pela amizade, companheirismo e discussões.

Aos amigos Tarcísio, Fernando, Waldenir, Zilda e Fatima por sempre estarem presentes nos momentos em que precisei, pelas conversas, opiniões e amizade.

Às funcionárias da seção de pós-graduação e ao pessoal da biblioteca por sempre estarem presentes, pelo auxílio, atenção e colaboração.

A todos os meus amigos, muito obrigado por fazerem parte da minha vida, pelo desabafo, pelos momentos de alegria e momento de tristeza, meu sincero muito obrigado.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Enfim, palavras são poucas para agradecer aos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.....**Muito obrigado.**

Resumo

A principal meta deste trabalho foi a de realizar estudos com leveduras industriais brasileiras utilizadas em usinas, na tentativa de viabilizar o emprego da Tecnologia de Fermentação de Mostos com Altos Teores de Açúcares Fermentescíveis, na produção de etanol combustível. Inicialmente, foram realizados experimentos para obtenção de informações relativas as linhagens, na fermentação de sacarose, maltose e glicose, em meios contendo uma base nitrogenada e suplementado com fontes de nitrogênio com diferentes complexidades estruturais. Os estudos mostraram que as linhagens industriais apresentam diferentes perfis de crescimento nos meios suplementados com diferentes fontes de nitrogênio, que variaram de um simples sal de amônio, a um hidrolisado ácido de proteínas (casaminoácidos) e hidrolisado enzimático de proteínas (peptona). Entretanto, a maior capacidade de acúmulo de biomassa pode não ter um reflexo direto na capacidade de utilização de açúcares e a consequente produção de etanol pelas leveduras industriais. Além da natureza estrutural da fonte de nitrogênio e do tipo de açúcar, a presença do oxigênio, em maior quantidade nos cultivos agitados, interferiu sobremaneira no desempenho fermentativo das leveduras industriais, e até no acúmulo de trealose. No geral, foi a suplementação com peptona que propiciou maior produção de biomassa, preservação da viabilidade celular e consumo mais eficiente da fonte de carbono, em cultivos agitados e não agitados. Os estudos com alta densidade celular tiveram como objetivo definir condições experimentais para a condução da Fermentação de Mosto com Altos Teores de Açúcares Fermentescíveis, e que pudessem propiciar ao final do processo a completa utilização da sacarose, associada á preservação da viabilidade celular do micro-organismo, para que pudesse ser utilizado em ciclos fermentativos sucessivos. Estudos mostraram que a completa utilização de açúcar e preservação da viabilidade celular, em meios suplementados com extrato de levedura e peptona, só ocorre nos meios contendo sacarose 22 e 25% (p/v). Em meios mais concentrados (30% (p/v), a completa utilização da sacarose só foi observada em mosto industrial a base de caldo de cana, suplementado com 2% (p/v) de peptona. Os resultados descritos nesta tese indicam que as linhagens industriais de leveduras apresentam demandas diferenciadas com relação a fontes de nitrogênio com graus de complexidade estrutural variados, e que é possível a fermentação de mostos com altos teores de açúcares, desde que encontradas as condições adequadas de condução do processo fermentativo.

Abstract

In this work studies with Brazilian yeast for ethanol production were conducted in order to verify the possibility of utilization of brazilian yeasts for ethanol production in an industrial process known as Very High Gravity Sucrose Fermentation Technology, to produce wine with high ethanol contends. This technology has the advantage to reduce production costs by increasing fermentation yields. Initially, studies were conducted with sucrose, maltose and glucose fermetation in medium containing YNB, supplemented with a nitrogen source varying from a single ammonium salt (ammonium sulfete) to free amino acids (casamino acids) and peptides (peptone). Data suggest that yeast strains vary in their response to nitrogen source complex structure, kind of sugar and to oxygen availability. In general, under peptone supplementation all strains, in shaking and static conditions, showed higher biomass accumulation, efficient sugar utilization and yeast viability was preserved. Sugar utilization by industrial strains not always was directly correlated with higher biomass accumulation. Trehalose accumulation was also influenced by the structural complexity of nitrogen sources, the kind of sugar and the presence of oxygen. Studies with high cell density were conducted to define experimental parameters for Very High Gravity Sucrose Fermentation, in order to induce at the end of process full sugar exhaustion together cell viability preservation. Complete sucrose utilization was detected only in media with 22 and 25% (w/v) sucrose. In the presence of higher sucrose contends (30% (w/v)), total sucrose exhaustion was obtained in a sugar cane based medium, supplemented with 2% (w/v) peptone. The results described in this thesis suggest that industrial yeasts show differing nitrogen demand, and the utilization of Very High Gravity Sucrose Fermentation technology could be carried only after finding the appropriated nutritional and fermentation conditions

Figuras

1. *Células de Saccharomyces cerevisiae em reprodução por brotamento.* 28
2. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (RED) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 22% (p/v) de Sacarose.* 53
3. *Células de Saccharomyces cerevisiae RED após cultivo em meio YNB contendo Sacarose 22 % (p/v), no início da fermentação, suplementado com 1 % (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 54
4. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (BG) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 22% (p/v) de Sacarose.* 55
5. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (CAT) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 22% (p/v) de Sacarose.* 56
6. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (SA) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 22% (p/v) de Sacarose.* 57
7. *Células de Saccharomyces cerevisiae SA após cultivo em meio YNB contendo Sacarose 22 % (p/v), no início da fermentação, suplementado com 1 % (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 58
8. *Produção de trealose por S. cerevisiae RED Star, BG, CAT e SA durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 22% (p/v) de Sacarose.* 59
9. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (RED) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 22% (p/v) de Sacarose.* 61
10. *Células de Saccharomyces cerevisiae RED após cultivo em meio YNB contendo Sacarose 22 % (p/v), no início da fermentação, suplementado com 1 % (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 62
11. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (BG) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 22% (p/v) de Sacarose.* 63

12. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (CAT) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 22% (p/v) de Sacarose.* 64
13. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (SA) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, e 22% (p/v) de Sacarose.* 65
14. *Células de Saccharomyces cerevisiae SA após cultivo em meio YNB contendo Sacarose 22 % (p/v), no início da fermentação, suplementado com 1 % (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 66
15. *Produção de trealose por S. cerevisiae RED, BG, CAT e SA durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 22% (p/v) de Sacarose.* 67
16. *Produção de trealose por S. cerevisiae RED, BG, CAT e SA durante 4 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, 2% (p/v) de Sacarose e 10% (v/v) de etanol para análise do estresse osmótico.* 69
- 17 *Produção de trealose por S. cerevisiae RED Star, BG, CAT e SA durante 4 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, e 2% (p/v) de Sacarose para análise do estresse osmótico em meio sem etanol.* 70
18. *Produção de biomassa e consumo de açúcar por S. cerevisiae RED, BG, CAT e SA durante crescimento agitado e não agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.* 71
19. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (RED - adaptada em maltose) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.* 74
20. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (SA - adaptada em maltose) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.* 75
21. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (PE - adaptada em maltose) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.* 76
22. *Produção de trealose por S. cerevisiae (após adaptação em maltose) RED* 77

Star, SA e PE durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.

23. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (RED - adaptada em maltose) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.* 79
24. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (SA - adaptada em maltose) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.* 80
25. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (PE - adaptada em maltose) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.* 81
26. *Produção de trealose por S. cerevisiae (após adaptação em maltose) RED Star, SA e PE durante crescimento agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio e 10% (p/v) de Maltose.* 82
27. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae RED 1º Ciclo e RED 2º Ciclo durante 10 h de crescimento agitado em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 22% (p/v) de Sacarose.* 87
28. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae SA 1º Ciclo e SA 2º Ciclo durante 10 h de crescimento agitado em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 22% (p/v) de Sacarose.* 88
29. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae RED 1º Ciclo e RED 2º Ciclo durante 10 h de crescimento em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 22% (p/v) de Sacarose.* 89
30. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae SA 1º Ciclo e SA 2º Ciclo durante 10 h de crescimento em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 22% (p/v) de Sacarose.* 90
31. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae RED 1º Ciclo, RED 2º Ciclo e RED 3º Ciclo durante 10 h de crescimento agitado em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 25% (p/v) de Sacarose.* 92
32. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por* 93

S. cerevisiae SA 1º Ciclo, SA 2º Ciclo e SA 3º Ciclo durante 10 h de crescimento agitado em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 25% (p/v) de Sacarose.

33. Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* RED 1º Ciclo, RED 2º Ciclo e RED 3º Ciclo durante 10 h de crescimento em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 25% (p/v) de Sacarose. 94

34. Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* SA 1º Ciclo, SA 2º Ciclo e SA 3º Ciclo durante 10 h de crescimento em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 25% (p/v) de Sacarose. 95

35. Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* RED 1º Ciclo, RED 2º Ciclo e RED 3º Ciclo durante 13 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose. 98

Tabelas

1. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de trealose por S. cerevisiae (RED, BG, CAT e SA), durante 20 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 10% (p/v) de Sacarose para utilização como inóculo.* 68
2. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de trealose por S. cerevisiae (RED, BG, CAT e SA) durante 4 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, 2% (p/v) de Sacarose e 10% (v/v) de etanol para análise do estresse etanólico.* 69
3. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de trealose por S. cerevisiae (RED, BG, CAT e SA) durante 4 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, e 2% (p/v) de Sacarose para análise do estresse etanólico em meio sem etanol.* 69
4. *Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por S. cerevisiae (RED, SA e PE) durante 40 e 65 horas de cultivo em 25 mL (agitado) e 35 mL (não agitado) meio contendo Glicose 20% (p/v) e 1% (p/v) de peptona casaminoácidos ou sulfato de amônio.* 84
5. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por S. cerevisiae (RED e SA) durante 20 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 10% (p/v) de Sacarose para utilização como inóculo.* 85
6. *Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar por S. cerevisiae (RED e SA) após 10 h de crescimento agitado cultivada em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose.* 96
7. *Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por S. cerevisiae SA e VIN 13 durante 13 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose.* 99
8. *Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por S. cerevisiae RED, SA e VIN 13 durante 18 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose.* 100
9. *Produção de biomassa (A) e viabilidade celular (B) de S. cerevisiae RED, SA e VIN 13 durante 13 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose.* 100

10. *Produção de biomassa, e viabilidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol por S. cerevisiae RED, SA e VIN 13 durante 21 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose.* 101
11. *Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por S. cerevisiae RED, SA e PE durante 15 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em mosto contendo 30% (p/v) de Sacarose sem suplementação, suplementado com 1 ou 2% (p/v) de peptona.* 104

Abreviaturas

atm - atmosfera.

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico.

g - gramas.

h - horas.

M - molar.

mg - miligramas.

min - minutos.

mL - mililitros.

nm - nanômetros.

rpm - rotações por minuto.

YPD - meio contendo extrato de levedo, peptona e glicose.

YNB – base nitrogenada.

μL - microlitros.

Sumário

Resumo	12
Abstract	14
1. Introdução	26
1.1. O etanol no Brasil	26
1.2. Processos fermentativos utilizados na produção de etanol	30
1.2.1. Fermentação descontínua	31
1.2.2. Fermentação descontínua alimentada	31
1.2.3. Fermentação contínua	31
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
1.3.1. Utilização de nutrientes por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
1.3.1.1. Fontes de carbono	34
1.3.1.2. Fontes de nitrogênio	35
1.3.2. Carboidrato de reserva	37
2. Objetivos	40
3. Material e Métodos	42
3.1. Micro-organismos utilizados	42
3.2. Meios de cultivo	42
3.2.1. Meios para manutenção da cultura, de rejuvenescimento e preparo do inóculo	42
3.2.2. Meios utilizados nos estudos do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no metabolismo de leveduras	43
3.2.2.1. Crescimento em sacarose	43
3.2.2.2. Crescimento em maltose ou glicose	43
3.2.3. Meios utilizados nos experimentos com alta densidade celular	44
3.2.3.1. Preparo do inóculo	44
3.2.3.2. Meios de cultura	44
3.2.3.3. Mosto industrial	44
3.3. Determinação dos parâmetros fermentativos	45

3.3.1. Determinação da produção de biomassa	45
3.3.2. Determinação da viabilidade celular	46
3.3.3. Determinação do pH	46
3.3.4. Medida do consumo da fonte de carbono	46
3.3.4.1. Determinação da concentração de sacarose	46
3.3.4.2. Determinação da concentração de maltose ou glicose	47
3.3.5. Produção de trealase semi-purificada, extração e quantificação da trealose	47
3.3.5.1. Manutenção do fungo	47
3.3.5.2. Extração e purificação parcial da trealase	47
3.3.5.3. Extração e quantificação da trealose	48
3.3.6. Determinação da concentração de etanol	48
3.3.7. Imagens do cultivo	48
4. Resultados	50
4.1. Estudos realizados com Sacarose	50
4.1.1. Estudos realizados com agitação	51
4.1.2. Estudos realizados sem agitação	59
4.1.3. Perfil dos níveis de produção de trealose após cultivo em meio com e sem etanol	67
4.2. Estudos Realizados com Maltose 10% (p/v)	70
4.2.1. Estudos Realizados com Maltose 10% (p/v) após Adaptação Celular	72
4.2.1.1. Estudos Realizados com Agitação	73
4.2.1.2. Estudos Realizados sem Agitação	77
4.3. Estudos realizados com glicose 20% (p/v)	82
4.4. Estudos com diferentes concentrações de sacarose - experimentos com alta densidade celular	85
4.4.1. Estudos realizados utilizando sacarose 22% (p/v)	85
4.4.2. Estudos realizados utilizando sacarose 25% (p/v)	90
4.4.3. Estudos realizados utilizando meio contendo sacarose 30% (p/v)	96
4.4.4. Estudos realizados utilizando mosto industrial contendo sacarose 30% (p/v)	101

5. Conclusões	106
5.1. Estudos realizados com sacarose em meios suplementados com fontes de nitrogênio com diferentes naturezas estruturais	106
5.2. Estudos realizados com maltose e glicose em meios suplementados com fontes de nitrogênio com diferentes naturezas estruturais	108
5.4. Estudos realizados com alta densidade celular	109
6. Considerações Finais	113
7.1 Sacarose 22%	113
7.2. Maltose 10%	114
7.3. Glicose 20%	114
7.4. Estudos realizados com alta densidade celular	115
7. Referências	117

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. O etanol no Brasil

A história do maior programa de substituição de petróleo por energia de biomassa implantado no mundo, em escala nacional, começou em 1975, quando o governo brasileiro decidiu estimular a produção de etanol combustível no país, para tanto, recomendava que se atentasse a dois fatores: a abertura de mercado e a valorização do preço do produto. Pressionado pela extraordinária elevação do preço do petróleo no Oriente Médio, que, até então, garantia o abastecimento interno, o governo lançou o Programa Nacional do Álcool, cujo objetivo era produzir, até o final dos anos de 1970, cerca de três bilhões de litros de etanol, para fins industriais, comerciais e para a adição à gasolina, com concentração inicial de 10 - 15 % (v/v) (AMORIM, 2005).

No contexto histórico, principalmente nas décadas de 1970 e no início dos anos de 1980, em decorrência das crises do petróleo e energética, o período foi marcado pelo surgimento do etanol como uma fonte de combustível renovável atrativa (BASSO et al., 2008), também sendo uma alternativa na substituição de combustíveis de origem fóssil (IKEGAMA et al., 2000; XUE et al., 2008). Outros fatores foram a escassez e o seu alto custo e juros internacionais. Por isso, em meados dos anos 80, o Proálcool foi considerado prioritário, traçando-se, então, uma meta de produção mais ambiciosa, cujo objetivo seria produzir 10,7 bilhões de litros de etanol, a ser alcançada em 1985. Foi também, incentivada a utilização em escala comercial de veículos movidos exclusivamente a etanol hidratado, produzidos ou convertidos para tal finalidade (AMORIM, 2005; BASSO et al., 2008).

Entre 1982 e 1986, o Proálcool viveu sua fase áurea, com grandes estímulos para atender às duas linhas de demanda existentes: álcool hidratado para o carro movido exclusivamente a este combustível, e anidro, para ser misturado à gasolina. Dessa forma, o Proálcool se tornou o maior programa energético do mundo com a utilização de um combustível líquido alternativo e renovável, não poluente, implantado em larga escala que possibilitou economia de mais de 141 bilhões de dólares em dívidas para o país desde sua implantação. O programa começou a mostrar novas vantagens, como a criação de desenvolvimento regional, dando

sustentabilidade econômica ao interior do país, sendo um dos poucos programas que possibilitou que a riqueza gerada, desde o cultivo da matéria prima até o produto final, permanecesse dentro do próprio município, gerando emprego e renda. Além do aspecto econômico e social, verificou-se a importância do ganho ambiental, decorrente do uso do etanol combustível, na esteira da diminuição da poluição das grandes cidades, portanto, a finalidade do Proálcool acabou sendo estratégica, resolvendo o problema energético e favorecendo a economia nacional e o desenvolvimento social (AMORIM, 2005).

Hoje o álcool é reconhecido mundialmente pelas suas vantagens ambientais, sociais e econômicas e os países do primeiro mundo estão interessados nessa tecnologia (GOLDEMBERG, 2007). Apesar do desenvolvimento do setor sucroalcooleiro, o processo de produção de etanol carece de aperfeiçoamentos, entre os quais destacam-se a excessiva produção de vinhaça, o principal resíduo do setor sucroalcooleiro, decorrente de processos de fermentação de baixo teor alcoólico, além do uso intensivo de antibióticos, devido ao nível de contaminantes microbiológicos e de sólidos insolúveis no mosto de fermentação.

O processo de produção de etanol combustível praticado pelas Usinas brasileiras apresenta teor alcoólico abaixo do desejado. O tratamento do fermento praticado nas usinas previamente ao reciclo, se inicia na centrifugação do vinho para recuperação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (figura 1). Nesta etapa ocorre, sem dúvida, uma importante retirada de compostos metabólicos inibidores químicos e microbiológicos, porém com eficiência limitada porque depende do estado de agregação das células. Quando floculadas, a eficiência de eliminação de inibidores é menor e conseqüentemente grande parte se recicla ao processo. O creme de levedura concentrado é diluído com água e acidificado com ácido sulfúrico sob agitação por um período em torno de duas horas em pH que varia entre 2,3 e 3,2 (AMORIM, 2005). A justificativa para esse procedimento é a desfloculação do fermento e morte das bactérias contaminantes oriundas do meio de cultura utilizado que não foi esterilizado, e que acabam por competir com as leveduras pelos nutrientes do meio (GRAVES et al., 2007). A desfloculação de fato ocorre por se tratar de um fenômeno de parede, entretanto as bactérias contaminantes da fermentação são resistentes à pHs muito baixos. Assim, muitos dos agentes microbianos são reciclados para a fermentação e essa prática, portanto, tende a

acumular as causas do problema a cada ciclo do processo (SANTOS; YOKOYA,1991).



Figura 1: Células de *Saccharomyces cerevisiae* em reprodução por brotamento. Fonte: *Saccharomyces cerevisiae*. Disponível em (www.bibliotecadeciencias.sp.gov.br/wordpress/?p=789), acesso em 16 de dezembro de 2011).

Um importante campo de pesquisa em fermentação alcoólica é a busca por novas linhagens de leveduras com alta tolerância a temperatura e etanol, e capazes de produzir vinhos fermentados de alta concentração alcoólica bem como identificar os fatores relacionados à condição atual de processo que impedem a condução do processo de fermentação no limite da álcool tolerância das leveduras industriais. A conjugação desses fatores numa linhagem de levedura seria bastante atrativa na medida que produziria redução no consumo de água de resfriamento, redução no volume de vinhaça além de redução de consumo de energia na destilaria como um todo.

Fermentações com teor alcoólico elevado podem ser conseguidas através da utilização de mostos mais concentrados em açúcares totais. Este processo é conhecido como Tecnologia de Fermentação de Mosto com Altos Teores de Açúcares Fermentescíveis (Very High Gravity Fermentation Technology), e refere-se a um processo que envolve a preparação de mosto de fermentação contendo açúcares acima de 30% (p/v) (CASEY et al., 1984) e o objetivo principal é produzir níveis de etanol acima de 15% (v/v) (LI, 2009). A introdução da fermentação com

altos teores de açúcares, em escala industrial, ainda apresenta problemas que devem ser contornados, e os de mais difíceis soluções são os relativos à tolerância limitada das leveduras industriais ao etanol, principalmente em temperaturas ao redor de 35° C, e os induzidos pela pressão osmótica (D'AMORE; STEWART, 1986; JONES; INGLEDEW, 1994). Estudos conduzidos em escala de laboratório mostraram ser possível a produção de até 21% (v/v) de etanol na fermentação de mosto de macerado de trigo com 38% (p/v) de sólidos dissolvidos (THOMAS; INGLEDEW, 1992). Entretanto estes altos teores de etanol só foram obtidos em temperaturas em torno de 20° C, e após um longo tempo de fermentação e considerável perda de viabilidade celular (JONES; INGLEDEW, 1994; THOMAS et al., 1994). Existe um fenômeno de sinergia sobre a viabilidade celular induzido pelo alto teor de etanol e aumento da temperatura de fermentação. Assim, em temperaturas mais altas observam-se fermentações com teores máximos de etanol em torno de 12 e 13% (v/v), com um tempo de fermentação de 30 horas (ALFENORE et al., 2002, ALDIGUIER et al., 2004).

Existem poucos estudos com linhagens industriais utilizadas em processos fermentativos industriais brasileiros. Recentemente, dois artigos relataram experimentos com linhagens brasileiras em fermentação em meios com glicose como fonte de carbono na concentração de 28-35% (p/v), complementado com xarope de milho e uréia e alguns íons metálicos (PEREIRA et al. 2010), no qual foi possível a obtenção de vinhos com até 19% (v/v) de etanol (PEREIRA et. al., 2011a). Outro estudo, no mesmo laboratório, descreveu experimentos com até 15 reciclo de células, na fermentação de mostos concentrados, com a produção de 17% (v/v) de etanol (PEREIRA et. al., 2011b). Apesar de se trabalhar com mostos concentrados e da obtenção de teores elevados de etanol, as condições de estudos são muito diferentes daquelas utilizadas no processo industrial de produção de etanol combustível no Brasil, com o tempo de fermentação variando de 30 até 60 horas, entre ciclos, e a viabilidade celular variando constantemente, e em alguns ciclos atingido o valor de 27% de células viáveis.

Apesar destes fatores desfavoráveis à obtenção de altos teores de etanol e com o interesse renovado de se aumentar a produção de etanol combustível, recentemente, novos estudos de fermentação de mostos com altos teores de açúcares foram descritos. Alper e outros (2006), utilizaram uma abordagem

chamada de Global Transcription Machinery Engineering (gTME), na tentativa de alteração de aspectos que apresentam características multigênicas, como é o caso da tolerância de leveduras à pressão osmótica e ao etanol, para melhorar a eficiência do processo de produção de etanol combustível. Estes estudos indicam a atualidade da temática de melhoria dos processos de obtenção de etanol combustível em mostos concentrados e o objetivo é a obtenção de altos teores alcoólicos. O novo impulso induzido na indústria do álcool combustível recoloca a busca de inovações para resolver a questão do aumento da eficiência do processo como forma de reduzir a quantidade de vinhaça e a utilização de antibióticos. Por esses e outros motivos, a tendência atual das indústrias sucroalcooleiras é de se transformar em complexos energéticos que, além do etanol e do açúcar, possam fabricar ração animal, fertilizantes e ainda gerar energia elétrica a partir do bagaço de cana, e com isso reduzir ainda mais os resíduos industriais e aumentar os lucros da empresas (AMORIM, 2005).

1.2. Processos fermentativos utilizados na produção de etanol

Quando se pensa em executar um processo fermentativo, normalmente se imagina preparar um meio de cultura que seja adequado à nutrição e desenvolvimento do micro-organismo, bem como ao acúmulo do produto desejado; colocar o meio de cultura em um biorreator; adicionar o micro-organismo responsável pelo processo biológico e aguardar que o processo ocorra. Depois de determinado tempo de fermentação retira-se o caldo fermentado e recuperam-se os produtos desejados (SCHMIDELL, 2001).

As fermentações podem ser realizadas de várias maneiras, dependendo do produto que se deseja obter, e da condição necessária para o cultivo do micro-organismo, e são mais comumente realizadas pelas usinas produtoras de etanol no Brasil pelos processos descontínuos, descontínuo alimentado e contínuo, cada um possuindo características peculiares.

O mais importante nesse processo é que o açúcar contido no mosto se transforme em etanol e seja totalmente consumido após a fermentação. Depois dessa etapa, o mosto fermentado, então denominado “vinho” é conduzido à destilação, onde, através de várias colunas será alternadamente aquecido e

condensado, separando-se todos os produtos e proporcionando a obtenção de vários tipos de etanol: etanol cru, etílico hidratado, etílico anidro, etanol fino, neutro e outros (AMORIM, 2005).

1.2.1. Fermentação descontínua

Também conhecida como fermentação em batelada, seu modo de operação pode ser descrito assim: uma solução nutriente é adicionada no fermentador juntamente com o micro-organismo e incubada, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições desejadas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos, antiespumante e ácido ou base para controle de pH. Nesse tipo de fermentação o volume permanece constante. Terminada a fermentação, descarrega-se a dorna e o meio fermentado segue para os tratamentos finais (SCHMIDELL, 2001).

1.2.2. Fermentação descontínua alimentada

Vários processos fermentativos têm sido desenvolvidos em função de diferentes aplicações. Um desses, que tem importância tanto em escala industrial como em nível de pesquisa, é o processo descontínuo alimentado, ou batelada alimentada. Basicamente, esse processo é caracterizado como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo, e ao atingir o volume desejado, permanecem até o final da fermentação. Em alguns casos, os nutrientes são adicionados gradualmente (SCHMIDELL, 2001).

1.2.3. Fermentação contínua

Esse tipo de processo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura e uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado. Pode conter apenas um ou também múltiplos estágios (SCHMIDELL, 2001). O processo de fermentação contínua normalmente tem início em um processo descontínuo, ou

seja, carrega-se inicialmente o reator com meio de cultura, procede-se à inoculação do micro-organismo responsável pela conversão, e após um período de tempo inicia-se a alimentação de meio de cultura e retirada do caldo, dando-se início ao processo contínuo (SCHMIDELL, 2001). Vale lembrar que nas fermentações industriais responsáveis pela produção de etanol combustível em larga escala, o micro-organismo mais utilizado é o fungo leveduriforme *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

O reino dos fungos é um dos mais numerosos, são organismos unicelulares, de vida livre e algumas espécies são importantes devido a sua grande biodiversidade no planeta. Por isso há um enorme potencial a ser explorado nesses micro-organismos que possuem uma das mais fascinantes e importantes propriedades, que é a habilidade de converter substratos em produtos de interesse biotecnológico (OSTERGAARD et al., 2000). E neste universo estão inseridas as leveduras as quais representa aproximadamente 700 espécies descritas, sendo que somente algumas têm sido bem caracterizadas, fazendo com que este grupo de micro-organismos seja qualitativamente e economicamente importante nos processos industriais.

Os fungos leveduriformes, do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, são organismos eucariotos unicelulares extremamente versáteis no seu metabolismo, que se reproduzem por esporos e brotamento (GOFFEAU et al., 1996). As linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces* são tradicionalmente utilizadas na indústria de etanol combustível, panificação e na produção de bebidas alcoólicas (BADOTTI, 2008), e seu metabolismo produz etanol, uma substância química com enorme potencial de ser utilizado como biocombustível, para substituir os combustíveis fósseis, em virtude de seu aspecto não renovável (ALFENORE et al., 2002; PHISALAPHONG et al., 2006). Estima-se que mais de dois bilhões de toneladas de leveduras são produzidas anualmente, somente para a indústria de panificação, fazendo deste micro-organismo um dos mais importantes produtos biotecnológicos. Outras aplicações de leveduras incluem a produção de enzimas, nucleotídeos, vitaminas, glicoproteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, lipídeos e outros aditivos alimentares (BADOTTI et al., 2008).

Com o advento das novas técnicas de engenharia genética as leveduras foram transformadas e utilizadas como produtoras de proteínas heterólogas (incluindo vacinas e outros compostos terapêuticos). Recentemente, a combinação entre o grande entendimento relativo a sua fisiologia e o fato de o genoma das leveduras terem sido sequenciado e identificadas suas funções gênicas, com a utilização das técnicas de engenharia metabólica, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* está sendo utilizada como veículo celular para melhorar a eficiência de conversão de substratos em produtos de interesse biotecnológico (BADOTTI et al., 2008; OSTERGAARD et al., 2000).

As leveduras, além da sua importância industrial, são utilizadas como modelo de células eucarióticas. Esta escolha se deve em grande parte à quantidade de conhecimento já acumulado relativo à sua fisiologia, bioquímica e genética. Além disso, apresentam várias características interessantes: são organismos unicelulares, facilmente manipuláveis, não patogênicos, capazes de crescer em várias fontes de carbono e de fornecer grande quantidade de células em um tempo relativamente curto. Por serem células eucarióticas as leveduras são as mais adequadas aos estudos de processos biológicos peculiares aos organismos eucarióticos.

O trabalho experimental descrito neste trabalho foi realizado com linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na indústria de produção de etanol combustível pelas usinas, e uma linhagem produtora de vinho utilizada em alguns experimentos para se comparar o comportamento fermentativo destas diferentes linhagens, nas mesmas condições de cultivo. Apesar de as linhagens serem utilizadas em diferentes processos industriais, os estudos foram realizados com o objetivo de se identificar às diferenças metabólicas no processo fermentativo, quanto à produção de biomassa, consumo de nutrientes, viabilidade celular e outros parâmetros fermentativos analisados, pressuposto que apresentam características genéticas diferentes, portanto, possibilitando a obtenção de dados que auxiliem no melhor entendimento do seu metabolismo e fisiologia, como forma de aprimorar o processo fermentativo.

1.3.1. Utilização de nutrientes por *Saccharomyces cerevisiae*

Em todos os processos industriais em que se utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* os meios devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono, além de sais e vitaminas (HORAK, 1997). Por esse motivo, os principais nutrientes utilizados por células de *Saccharomyces cerevisiae*, quanto à quantidade, são carbono e nitrogênio. Isto implica que os fluxos de carbono e nitrogênio tanto quanto suas interações constituem parâmetros importantes na regulação do crescimento celular. A coordenação dos fluxos de carbono e nitrogênio pode ser regulada na assimilação ou no metabolismo, dependendo das condições de crescimento e da natureza da fonte de carbono e nitrogênio (TER SCHURE et al., 1995; HORÁK, 1997, SCHNEPER et al., 2004).

Para selecionar os nutrientes necessários a serem utilizados, as leveduras desenvolveram mecanismos celulares nos quais são desencadeados por eventos de regulação conhecidos como repressão catabólica induzida pelo carbono (“Carbon catabolite repression”) ou pelo nitrogênio (“Nitrogen catabolite repression”), e estes impõem à levedura uma seqüência ordenada de utilização de fontes de carbono e de nitrogênio. Além destas vias de regulação, existem outras de sinalização e de sensoriamento de nutrientes em leveduras, além ainda, de ocorrer a integração de várias vias de regulação envolvendo aquelas descritas para o carbono e outras para o nitrogênio, criando um quadro complexo de regulação e sinalização (GANCEDO; FLORES, 2004; SCHNEPER et al., 2004).

1.3.1.1. Fontes de carbono

Os principais compostos utilizados como fonte de carbono são os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) ou dissacarídeos (maltose e sacarose). Quando a levedura é cultivada em um meio contendo uma mistura de glicose e outros açúcares como sacarose, maltose ou galactose, o metabolismo é diauxico, isto é, glicose é preferencialmente utilizada, enquanto que os outros açúcares somente serão metabolizados após a exaustão da glicose. Este comportamento diauxico ocorre devido ao fenômeno de repressão catabólica, ou repressão exercida pela glicose (DYNESEN et al., 1998; GANCEDO, 1998). Além da

glicose, outros açúcares fermentescíveis como a frutose e manose também desencadeiam o processo de repressão catabólica. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a repressão pela glicose regula a expressão dos genes envolvidos com a produção de enzimas necessárias para o metabolismo da sacarose, maltose e galactose, e também das enzimas da gliconeogênese e da cadeia respiratória (DYNESEN et al., 1998). Em leveduras, a regulação das enzimas submetidas ao controle da repressão catabólica é complexa e além do controle da expressão gênica, envolve também o fenômeno de inativação catabólica e o nível da atividade enzimática (HOLZER, 1976; GANCEDO, 1998).

Apesar de serem objetos de exaustiva investigação, os mecanismos através dos quais ocorre a repressão catabólica e outros processos de sinalização e regulação celular não estão totalmente elucidados. Os estudos mostram que as vias de regulação são complexas, envolvem um conjunto considerável de genes e de elementos protéicos que atuam como elementos ativadores e repressores. Além da complexidade das vias que atuam na sinalização, sensoriamento e regulação do metabolismo do carbono, estão sendo descritos novos estudos que indicam para a possível integração de vários sistemas de sinalização e regulação, inclusive envolvendo a participação de elementos das vias do carbono na regulação da utilização de fontes nitrogenadas (SCHNEPER et al., 2004; PETER et al., 2006).

1.3.1.2. Fontes de nitrogênio

A maioria dos trabalhos realizados sobre o metabolismo de nitrogênio em micro-organismos utiliza um meio mínimo com composição conhecida, e um único composto nitrogenado (LARGE, 1986). Outros estudos utilizam meios complexos, complementados com diferentes tipos de extratos. O consumo de compostos nitrogenados mais complexos, como proteínas, por *Saccharomyces cerevisiae* só ocorrem se forem hidrolizadas para posterior utilização na forma de aminoácidos simples, dipeptídeos ou tripeptídeos.

O nitrogênio assimilável é identificado como um nutriente essencial para completar o processo fermentativo de forma eficiente (VILANOVA et al., 2007), pois o nitrogênio é um elemento essencial encontrado em quase todas as macromoléculas dos organismos vivos. As principais fontes de nitrogênio

assimiláveis por leveduras são aminoácidos, íon amônio e pequenos peptídeos (VILANOVA et al., 2007). Tal habilidade requer permeases para o transporte desses compostos e enzimas para a geração de amônio pelo seu metabolismo (IRAQUI et al., 1999; MAGASANIK; KAISER, 2002). Mais de 20 sistemas de transporte específicos medeiam o transporte ativo de aminoácidos pela membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*, e várias permeases foram caracterizadas geneticamente (JAUNIAUX; GRENSON, 1990). Cada transportador é específico para um ou alguns L-aminoácidos e sua síntese está geralmente relacionada com a constituição da membrana. Além dos sistemas específicos, *Saccharomyces cerevisiae* possui um sistema de transporte geral de aminoácido, o transportador Gap (“general amino acid permease”), codificado pelo gene *GAP1*. Essa permease apresenta elevada especificidade para o transporte de substratos, incluindo a maioria do L- e D- isômeros de aminoácidos básicos, neutros e ácidos (JAUNIAUX; GRENSON, 1990; HORÁK, 1997).

Após o transporte, as fontes de nitrogênio são rapidamente acumuladas pelas leveduras na fase inicial da fermentação, onde são necessários aminoácidos para a síntese de proteínas e produção de biomassa, enquanto que o excesso é armazenado em vacúolos celulares, e utilizados quando necessários na síntese de biomoléculas microbianas. A insuficiência de compostos nitrogenados no meio de cultura pode provocar baixa produção de biomassa, afetar o processo fermentativo e a conclusão do mesmo (BELTRAN et al., 2005; VILANOVA et al., 2007). Entretanto, nem todas as fontes de nitrogênio propiciam crescimento igualmente eficiente: a glutamina juntamente com o glutamato, o amônio e asparagina são considerados fontes primárias de nitrogênio, e por isso utilizados preferencialmente nas reações de biossíntese (IRAQUI et al. 1999). Quando estas fontes primárias estão limitadas ou próximas da exaustão, o organismo pode expressar seletivamente genes cujos produtos permitem utilizar outras fontes de nitrogênio secundárias, incluindo outros aminoácidos, peptídeos (HORÁK, 1997). A utilização de aminoácidos como fonte de nitrogênio envolve inicialmente seu transporte para interior da célula, onde pode ser utilizado diretamente na síntese de proteínas ou doando seu derivado α -cetoácido após a desaminação enzimática para outros processos metabólicos (MAGASANIK, 1992). O glutamato, glutamina e amônio desempenham funções essenciais no metabolismo central de nitrogênio (TER SCHURE et al., 2000).

Os sistemas de transporte de peptídeos intactos estão presentes em bactérias, fungos, plantas, tecidos de mamíferos e leveduras. Esse transporte é um processo bioquímico específico em que peptídeos pequenos (com menos de 6 aminoácidos) passam através da membrana plasmática por transporte ativo (STEINER et al., 1994). Esse transporte de pequenos peptídeos contendo de 2 a 5 resíduos de aminoácidos também são utilizados por *Saccharomyces cerevisiae*, e estes são transportados via dois sistemas de transportes: sistema transportador PTR (Peptide Transport), onde são transportados dipeptídeos e tripeptídeos e sistema transportador OPT (OligoPeptide Transport), onde são transportados oligopeptídeos contendo de 4 a 5 aminoácidos (WILES et al., 2006).

1.3.2. Carboidrato de reserva

Durante a fermentação as leveduras são submetidas a várias condições de estresse, como o induzido por altas concentrações de açúcar (estresse osmótico) ou induzidos por altas concentrações de etanol. Juntamente com estes, outras formas de estresse como o nutricional e térmico podem afetar negativamente o desempenho das leveduras. Uma forma de compensar estas condições desfavoráveis e a capacidade das leveduras em produzir carboidratos de reserva como a trealose e o glicogênio, que desempenham função protetora e de reserva energética (CSONKA, 1989).

A trealose é um dissacarídeo não redutor composto por duas moléculas de glicose unidas por ligações do tipo α -1,1, e está presente em vertebrados, leveduras, outros fungos e plantas (GANCEDO; FLORES, 2004). No caso de leveduras, é muito comum em ambos o estágio vegetativo e reprodutivo. Na estrutura vegetativa é encontrada juntamente com o glicogênio (HOHMANN; MAGER, 1997). Isto também é atribuído para as estruturas reprodutivas, mas neste caso a trealose está presente em maiores quantidades do que o outro carboidrato de reserva (FRANÇOIS; PARROU, 2001).

Na reprodução celular em fermentações contendo fontes de carbono como a glicose e a frutose, após a utilização do açúcar fermentescível, o glicogênio acumulado apresenta-se em concentrações máximas no período diauxico. Em contraste, a trealose só começa a se acumular no período diauxico e quando as

células entram na fase estacionária em períodos de carências nutricionais. Durante a fase estacionária a trealose é degradada lentamente e seu desaparecimento é acompanhado pela perda de viabilidade celular. No geral, a síntese e acúmulo de glicogênio e trealose estão associados à limitação nutricional (HOHMANN; MAGER, 1997). A síntese de trealose, é particularmente, muito intensa durante o processo de diferenciação celular e períodos de jejum em *Saccharomyces cerevisiae*. Sua função esta diretamente relacionada aos processos de proteção das estruturas celulares contra agentes desestabilizadores devido ao estresse e agentes desnaturantes. Em muitos casos, é observado altos níveis de trealose em períodos em que há necessidade de manutenção das funções proteicas e das funções desempenhadas pela membrana celular (SAMPEDRO; URIBE, 2004).

Também tem sido explorado em diversas aplicações biotecnológicas como: aumento da tolerância ao etanol em leveduras utilizadas em processos de fermentação alcoólica, crioproteção, mantendo viáveis culturas de células de *Daricus carota* (cenoura) e *Nicotina tabacun* (tabaco) após congelamento, conservação de enzimas de restrição, lipossomos liofilizados.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o de realizar estudos com leveduras industriais brasileiras na tentativa de viabilizar o emprego da Tecnologia de Fermentação de Mostos com Altos Teores de Açúcares Fermentescíveis, na produção de etanol combustível.

Como objetivos específicos o trabalho experimental foi desenvolvido com dois tipos de abordagens, com baixa e alta densidade celular:

1. Estudos com baixa densidade celular para obtenção de informações relativas as propriedades fisiológicas das linhagens industriais produtoras de etanol em estudos realizados com e sem agitação.
2. Os estudos com alta densidade celular para a fermentação de mosto com altos teores de açúcares fermentescíveis em estudos realizados com e sem agitação.
3. Fermentação com alta densidade celular utilizando mosto industrial a base de caldo de cana contendo alto teor de sacarose, com e sem suplementação nutricional.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

3.1. Micro-organismos utilizados

No presente estudo foram utilizadas linhagens industriais de levedura *Saccharomyces cerevisiae* BG (Usina da Barra Grande), CAT (Usina de Catanduva), SA (Usina de Santa Adélia) e PE (Usina da Pedra) isoladas em diferentes Usinas de produção de etanol combustível. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Etanol Red[®] também foi utilizada, gentilmente doada pela empresa Fermentis/Lasaffre. Foi utilizada a linhagem VIN 13 em alguns experimentos, utilizada na produção de vinho. Também foi utilizado o fungo *Humicola grisea* para produzir a enzima trealase.

3.2. Meios de cultivo

3.2.1. Meios para manutenção da cultura, de rejuvenescimento e preparo do inóculo

As culturas estoques foram mantidas em meio YPD contendo 1,0% (p/v) de extrato de levedo, 2,0% (p/v) de peptona, 2,0% (p/v) de glicose e 2,0% (p/v) de agar. Após o preparo da solução, o meio foi dissolvido por aquecimento, distribuído em tubos de ensaio e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120° C e 1 atm. Após a esterilização, os tubos foram mantidos inclinados até a solidificação.

As células leveduriformes foram rejuvenescidas em meio YPD, inicialmente sendo incubadas por 48 horas a 30° C e posteriormente armazenadas a 4° C, sendo utilizadas por um período máximo de 10 dias.

O inóculo foi preparado a partir de leveduras coletadas da superfície da cultura rejuvenescida com alça de platina flambada e transferidas para tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada, a fim de se obter uma concentração final de 0,025 mg de células/mL.

Alguns experimentos foram realizados utilizando-se células adaptadas em meio YPMal contendo 1,0% (p/v) de extrato de levedo, 2,0% (p/v) de peptona, 2,0% (p/v) de maltose e 2,0% (p/v) de agar. As células foram adaptadas realizando-se três sucessivos cultivos em meio YPMal, cada um por um período de 48 horas a 30°C. Após a adaptação, as células foram utilizadas nos experimentos.

3.2.2. Meios utilizados nos estudos do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no metabolismo de leveduras

O meio de cultura utilizado no estudo do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no metabolismo das leveduras foi preparado em duas partes, onde em uma parte continha YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônio, e uma fonte de nitrogênio e na outra parte continha a fonte de carbono. As fontes de nitrogênio utilizadas foram: preparações comerciais de hidrolisados enzimáticos de proteínas (Peptona), hidrolisados ácidos de proteínas (Casaminoácidos) e sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$.

O crescimento foi realizado em Erlenmeyer de 125 mL com o volume de meio de 35 mL (sem agitação) e 25 mL (com agitação - 200 rpm), sendo incubados a 30°C \pm 1.

3.2.2.1. Crescimento em sacarose

Para a obtenção do meio de cultura completo, foram adicionadas assepticamente quantidades adequadas do meio contendo YNB e uma fonte de nitrogênio e do meio contendo a fonte de carbono de modo a apresentar 0,17% (p/v) de YNB, 1,0% (p/v) da fonte de nitrogênio e 22% (p/v) da fonte de carbono.

Como fonte de carbono foi utilizada a sacarose por ser a fonte de carbono presente no caldo de cana utilizada na produção de etanol no Brasil pelas usinas.

3.2.2.2. Crescimento em maltose ou glicose

Para a obtenção do meio de cultura completo, foram adicionadas assepticamente quantidades adequadas do meio contendo YNB e uma fonte de

nitrogênio e do meio contendo a fonte de carbono de modo a apresentar 0,17% (p/v) de YNB, 1,0% (p/v) da fonte de nitrogênio e a fonte de carbono (maltose 10% (p/v) ou glicose 20% (p/v)).

3.2.3. Meios utilizados nos experimentos com alta densidade celular

3.2.3.1. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado conforme o item 3.2.1 seguido do crescimento celular em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio com 1,0% (p/v) de extrato de levedo, 1,0% (p/v) de peptona e 10% (p/v) de sacarose por um período de 20 horas com o objetivo de se obter alta densidade celular com consumo total da fonte de carbono e com a manutenção da viabilidade celular próxima de 100%.

3.2.3.2. Meios de cultura

Para a realização dos experimentos com alta densidade celular, após o preparo do inóculo, as células foram cultivadas em Erlenmeyer de 125 mL, com meio contendo 1,0% (p/v) de extrato de levedo, 1,0% (p/v) de peptona e várias concentrações de sacarose (22, 25 e 30% (p/v)). Os experimentos foram realizados utilizando-se duas formas de cultivo, podendo ser em batelada (22 e 25% (p/v) de sacarose) ou descontínua alimentada (batelada alimentada contendo 30% (p/v) de sacarose). Nos experimentos em batelada alimentada, os volumes de meio e os tempos de inoculação variaram, estando cada um descrito em seus resultados.

É importante salientar que após o preparo do inóculo e entre cada ciclo fermentativo as células foram coletadas, centrifugadas e lavadas em água estéril gelada para retirar qualquer resíduo da etapa anterior, não interferindo no objetivo do experimento

3.2.3.3. Mosto industrial

O mosto industrial tendo como base o caldo de cana foi cedido pela Usina Santa Fé, com 20° Brix. Para a confirmação da concentração de açúcar no mosto, o

mesmo foi submetido à hidrósile, conforme ítem 3.3.4.1 e procedeu-se com a identificação da concentração. Foi utilizada uma solução padrão de sacarose para identificar a concentração de açúcar no mosto.

Após a determinação da concentração de sacarose, identificou-se que o mosto continha 21,86% (p/v) de sacarose. Para obter o mosto para os experimentos procedeu-se adicionando-se sacarose de modo a obter uma concentração de 30% (p/v).

Para a realização dos experimentos, após o preparo do inóculo, as células foram cultivadas em Erlenmeyer de 125 mL, com mosto contendo sacarose 30% (p/v), acrescido ou não de peptona, pois foram realizados experimentos em mosto sem peptona ou suplementados com 1% ou 2% (p/v) de peptona. Nos experimentos com fermentação descontínua alimentada, os volumes de meio e os tempos de inoculação estão descritos em seus resultados.

3.3. Determinação dos parâmetros fermentativos

3.3.1. Determinação da produção de biomassa

As análises do crescimento celular foram realizadas periodicamente através de medidas turbidimétricas a 570nm, de uma suspensão de células com diluição conhecida, relacionando-a com a massa celular, através da seguinte equação:

$$[\text{células}] \text{ (mg/mL)} = \Delta A_{570} \times \text{diluição} \times f.$$

onde f , fator de conversão de absorvância em massa seca, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é 0,6711. O fator f foi determinado a partir da medida de absorvância de suspensões com diferentes concentrações de células comparada com a massa seca obtida, colocadas em estufa a 100°C, por duas horas, de 1,0mL de cada suspensão filtrada em membrana Millipore.

3.3.2. Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi periodicamente acompanhada através do método de coloração com azul de metileno (LEE et al., 1981).

Na determinação da viabilidade celular, 100µL de amostra foram transferidos para 900 µL da solução padrão de azul de metileno (0,025g de azul de metileno; 0,9g NaCl; 0,042g KCl; 0,048g CaCl₂.6H₂O; 0,02g NaHCO₃ para 100mL de solução aquosa) e agitados. Após 10 minutos, tempo necessário para que as células absorvam o corante, procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentaram-se incolores, enquanto as não viáveis coloridas.

3.3.3. Determinação do pH

A determinação do pH procedeu-se utilizando tiras com indicadores coloridos, cuja alteração indica determinados pHs.

3.3.4. Medida do consumo da fonte de carbono

O consumo de açúcar foi determinado através de medidas colorimétricas, utilizando-se o método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico - 1g; tartarato de sódio e potássio - 30g; NaOH 1M – 40 mL, e o volume completado a 100mL) (MILLER, 1959), que baseia-se no poder redutor de açúcares, originando um composto colorido, 3-amino 5-nitro salicílico, que absorve em 546nm.

Vale salientar que na determinação da concentração de açúcar foram utilizadas soluções padrões.

3.3.4.1. Determinação da concentração de sacarose

Para a dosagem da sacarose, as amostras foram adequadamente diluídas e juntamente com 200 µL de amostra diluída foram adicionados 150 µL de água e 100 µL de HCl 6 M. No tubo contendo o branco, foi utilizada água no lugar da amostra. As soluções foram incubadas a 60° C por 7 minutos para ocorrer a hidrólise da

sacarose. Após esse período, foram adicionados 0,5 mL de NaOH 2,4 M para neutralizar a reação e 1,0 mL do reagente DNS, sendo incubada posteriormente a 100° C por 5 minutos. Em seguida foram transferidos para um banho de gelo para resfriamento. As leituras de absorbância foram realizadas a 546 nm.

3.3.4.2. Determinação da concentração de maltose ou glicose

Para a dosagem da maltose ou da glicose, as amostras obtidas foram adequadamente diluídas e 0,5mL da amostra diluída, juntamente com 1,0 mL do reagente DNS e 2,0mL de H₂O foram adicionados em respectivos tubos de ensaio. O tubo contendo o branco foi preparado adicionando-se 0,5 mL de água no lugar da amostra. Os tubos foram transferidos para banho de água a 100°C por 5 minutos. Em seguida foram transferidos para um banho de gelo para resfriamento. As leituras de absorbância foram realizadas a 546 nm.

3.3.5. Produção de trealase semi-purificada, extração e quantificação da trealose

3.3.5.1. Manutenção do fungo

O fungo termófilo *Humicola grisea*, variedade thermoidea foi inoculado em meio sólido de farinha de aveia contendo 4 % (p/v) de aveia e 1,8 % (p/v) Agar. Incubado a temperatura de 40° C por 10 dias. Após o período de incubação as culturas foram incubadas a 4° C por 5 dias, pois este tratamento aumenta a atividade específica da trealase (NEVES et al., 1994)

3.3.5.2. Extração e purificação parcial da trealase

A trealase foi extraída, semipurificada e utilizada na dosagem de trealose segundo o método descrito por Neves et al. (1994).

3.3.5.3. Extração e quantificação da trealose

Para a determinação da trealose, 1,0 mL da amostra foram coletados e lavados por 3 vezes com solução salina (0,85 %). Para a extração da trealose as células foram suspensas em 1,0 mL de Na₂CO₃ 0,25 M e incubada por 20 minutos em banho fervente (PARROU; FRANÇOIS, 1997). A seguir, as amostras foram centrifugadas e a uma alíquota de 25 µL do sobrenadante foram adicionados 12,5 µL de tampão acetato de sódio 0,3 M, contendo CaCl₂ 0,015 M em pH 5,5 e 12,5 µL de ácido acético 1 M. Iniciou-se a reação enzimática adicionando-se 50 µL da enzima trealase (NEVES et al., 1994). A mistura da reação foi incubada por 12 horas a 50° C, e foi interrompida em banho fervente por 10 minutos. A glicose proveniente da hidrólise da trealose foi dosada por um kit comercial (Labtest, Brasil) contendo o sistema enzimático Glicose oxidase/Peroxidase. A quantidade de trealose foi expressa em nmoles de trealose/mg de células.

3.3.6. Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa, no cromatógrafo CG, modelo 37-022, acoplado a um integrador - processador CG - 300, utilizando-se coluna cromatográfica CG nº PAD/2499, operada isotermicamente á 90°C. A temperatura do detector de ionização de chama e do vaporizador foi de 135°C. Utilizou-se o nitrogênio como gás de arraste, com vazão de 30ml/min. A vazão do hidrogênio foi de 30 mL/min e do ar sintético de 300mL/min.

3.3.7. Imagens do cultivo

As imagens do cultivo das linhagens RED e SA foram obtidas utilizando uma câmara fotográfica digital e microscópio óptico com aumento de quatrocentas vezes.

Resultados

4. RESULTADOS

Considerando que a maioria dos meios industriais contém açúcares e compostos nitrogenados com composição estruturalmente complexa (MORENO-ARRIBAS et al., 2002), inicialmente foi realizado um estudo para avaliar a perfil fermentativo das linhagens frente a essa complexidade estrutural do meio de cultura. Portanto, como fonte de nitrogênio, foram utilizadas preparações comerciais de hidrolisados enzimáticos de proteínas (peptona), hidrolisados ácidos de proteínas (casaminoácidos) e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). Estas fontes de nitrogênio foram escolhidas por serem comumente utilizadas como constituintes no meio de cultura sintético e por apresentarem diferentes graus de complexidade estrutural devendo interferir diretamente no fluxo metabólico das leveduras quanto a assimilação e utilização como fonte de nitrogênio e na mútua interação que deve ocorrer com a fonte de carbono (MIRANDA Jr et al., 2008; MIRANDA Jr et al., 2009).

Além das fontes de carbono e nitrogênio, os meios utilizados neste trabalho continham vitaminas, sais minerais e elementos traços obtidos da base nitrogenada YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônio. As fermentações foram conduzidas em duas condições diferentes: com e sem agitação.

Nesta etapa inicial do trabalho estudou-se a utilização de sacarose por linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na indústria de produção de etanol. Como fonte de carbono, utilizou-se sacarose 22% (p/v), e essa concentração está próxima da praticada pelas usinas brasileiras e teve como objetivo avaliar as propriedades fisiológicas das leveduras industriais em meios suplementados com diferentes fontes de nitrogênio. Outras fontes de carbono utilizadas foram a maltose e a glicose, que são os açúcares mais abundantes no processo de produção de etanol a partir do amido de milho.

4.1. Estudos realizados com Sacarose

Os resultados apresentados sobre a fermentação de sacarose por leveduras industriais RED, BG, CAT e SA, em meios contendo fontes estruturalmente complexas de nitrogênio e o efeito da agitação no processo fermentativo estão organizados em dois itens, que são: estudos realizados com agitação e sem agitação.

4.1.1. Estudos realizados com agitação

Nos estudos da utilização de sacarose por leveduras industriais RED, BG, CAT e SA, os meios continham fontes estruturalmente complexas de nitrogênio na forma de hidrolisado enzimático de proteínas (peptona), hidrolisado ácido de proteínas (casaminoácidos) ou sulfato de amônio. As figuras 2, 4, 5 e 6 (experimento com agitação) apresentam o acúmulo de biomassa, viabilidade celular, pH e açúcar residual.

Para as análises realizadas com agitação, no geral, observa-se que houve maior produção de biomassa no meio suplementado com peptona. Na suplementação com casaminoácidos e sulfato de amônio houve menor produção de biomassa, maior perda da viabilidade celular com conseqüente aumento do açúcar residual. Os resultados obtidos nos cultivos das linhagens BG (figura 4) e SA (figura 6) mostraram que há maior produção de biomassa na suplementação com peptona, porém, os açúcares residuais provenientes dos processos fermentativos assemelham-se ao final da fermentação nas três fontes de nitrogênio utilizadas, e refletem a capacidade fermentativa semelhante entre as linhagens. No cultivo da linhagem CAT (figura 5) houve maior produção de biomassa no meio contendo peptona, com a manutenção da viabilidade celular e conseqüente consumo da fonte de carbono.

Os perfis de variação dos níveis de trealose também indicam que há maior concentração desse carboidrato de reserva na suplementação com peptona (figura 8A), talvez como um possível indutor positivo de desempenho fermentativo. A produção de trealose é sempre mais elevada no caso da linhagem RED, nas três fontes de nitrogênio, talvez como indicativo de uma possível resposta celular à fermentação de sacarose, uma vez que esta linhagem foi desenvolvida para a produção de etanol a partir de amido, que tem a maltose e glicose como principais açúcares fermentáveis.

A partir desses resultados, foram obtidas imagens com aumento de quatrocentas vezes para se observar a morfologia celular antes e após a fermentação. As imagens da linhagem RED (figura 3), mostram que, comparando-se com o início da fermentação (figura 3a), as células mantiveram as características morfológicas nos cultivos suplementados com peptona e sulfato de amônio, ou seja, meios em que foi observada melhor eficiência na fermentação. Já na suplementação

com casaminoácidos observou-se que houve alterações como ocorrência de floculação e alongação de algumas células, sugerindo que a alteração morfológica pode ser um possível indicativo de sensibilidade da linhagem ao estresse fermentativo. Para a linhagem SA (figura 7), quando comparada com a linhagem RED, observa-se que as células não sofreram mudanças morfológicas significativas, o que também pode ser um indicativo de menor sensibilidade ao estresse fermentativo, uma vez que o consumo da fonte de carbono é semelhante na suplementação com as três fontes de nitrogênio também havendo consumo eficiente da fonte de carbono.

A variação do pH durante o crescimento das linhagens foi constantemente monitorada. Os meios com peptona e casaminoácidos apresentaram uma queda de pH para valores de 4,0 a 3,0, partindo-se de um pH inicial de 5,0. O meio contendo sulfato de amônio teve seu pH monitorado e reajustado com NaOH 1M para valores próximos de 5,0 em todas as coletas realizadas, pois análises realizadas sem o ajuste, mostraram que, nessa fonte nitrogenada, a queda de pH é mais acentuada, atingindo valores próximos de 2,0 (MIRANDA Jr et al., 2008; CRUZ et al., 2003), portanto, podendo ter influência negativa no desempenho fermentativo das linhagens.

A viabilidade celular também foi diferente entre as linhagens, sendo que o meio com peptona é o que manteve maior nível de células viáveis, e a linhagem CAT foi a que apresentou maior queda nos meios suplementados com casaminoácidos e sulfato de amônio.

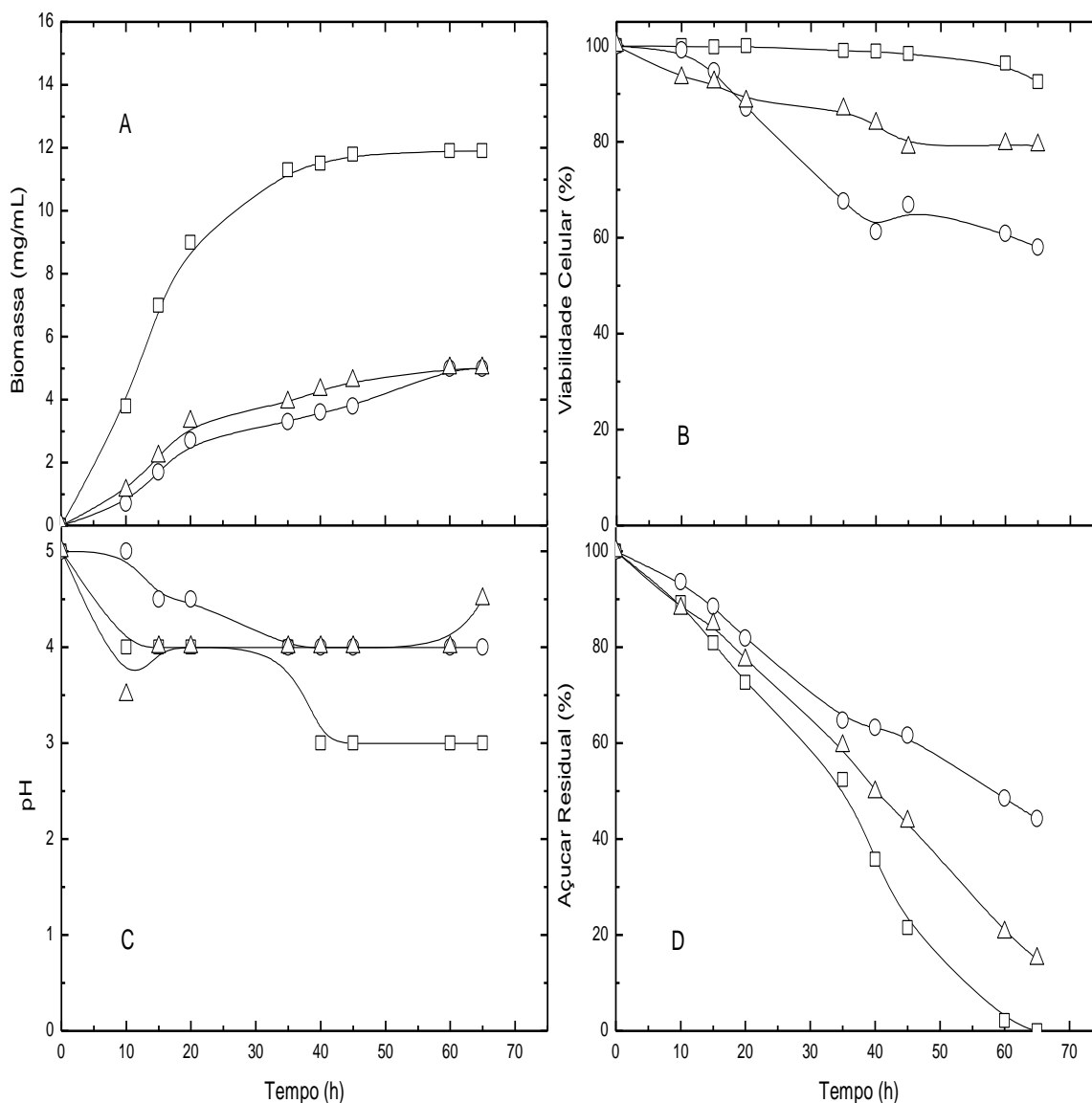


Figura 2: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (RED) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

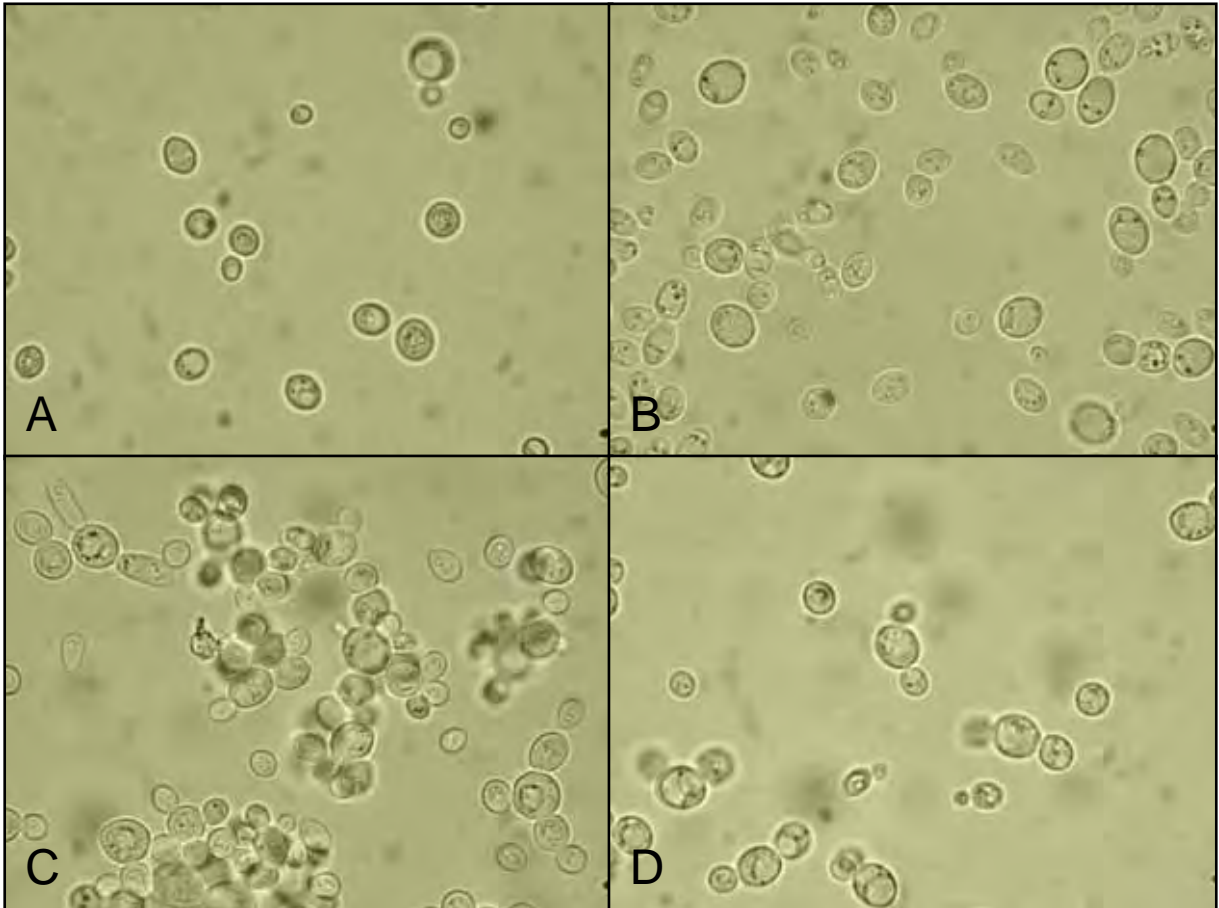


Figura 3: Células de *Saccharomyces cerevisiae* **RED** após cultivo em meio YNB contendo **Sacarose 22 %** (p/v), no início da fermentação (A), suplementado com 1 % (p/v) de peptona (B), casaminoácidos (C) ou sulfato de amônio (D). Condições de cultivo: 30° C, **200 rpm** e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

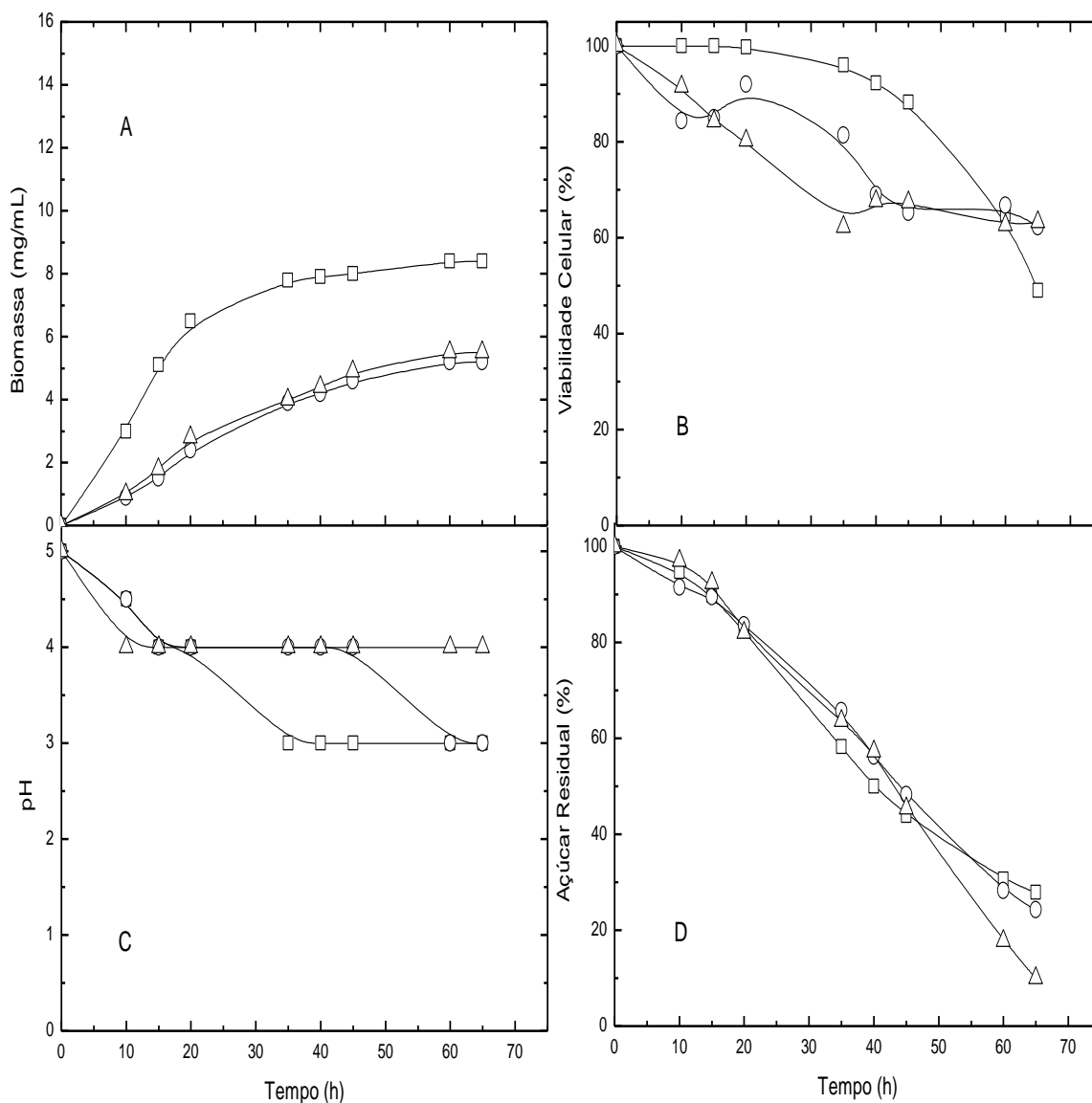


Figura 4: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (BG) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

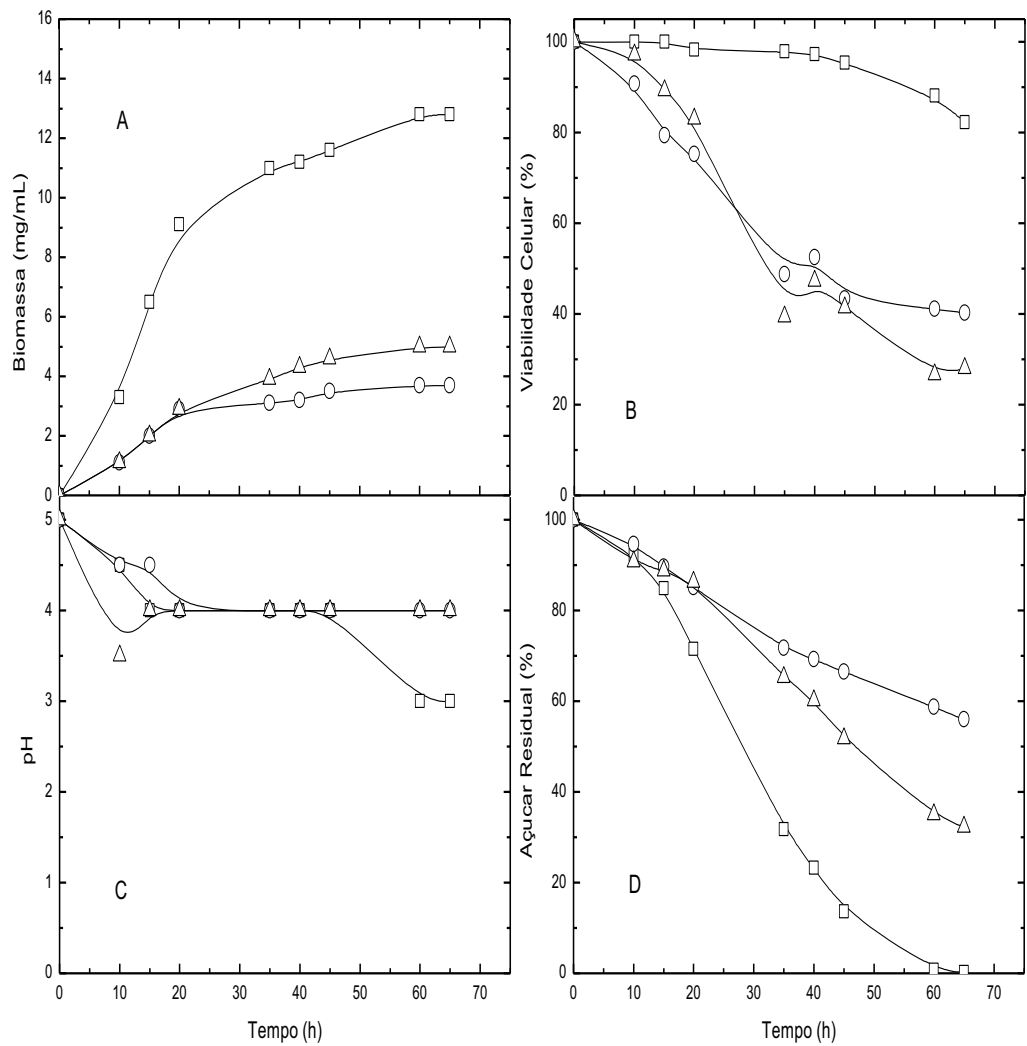


Figura 5: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (CAT) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

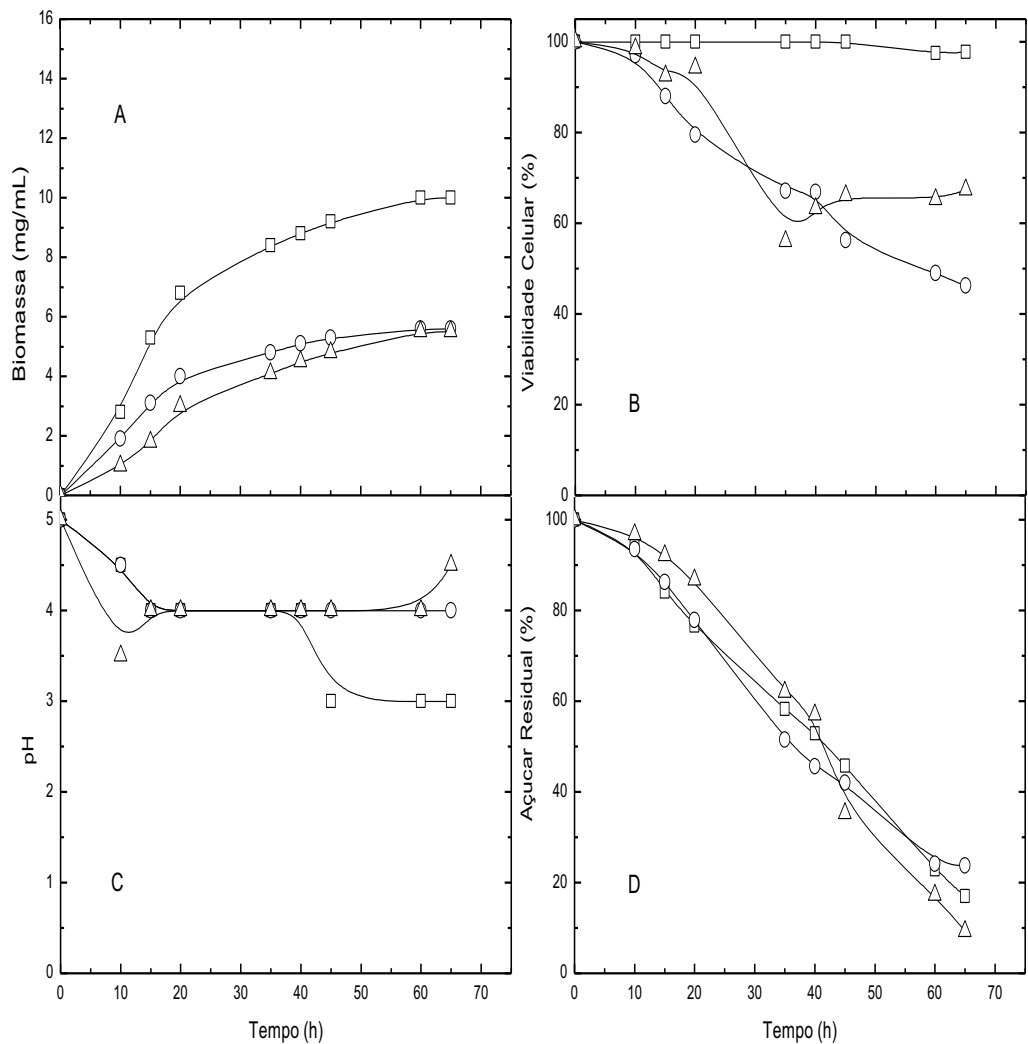


Figura 6: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (SA) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

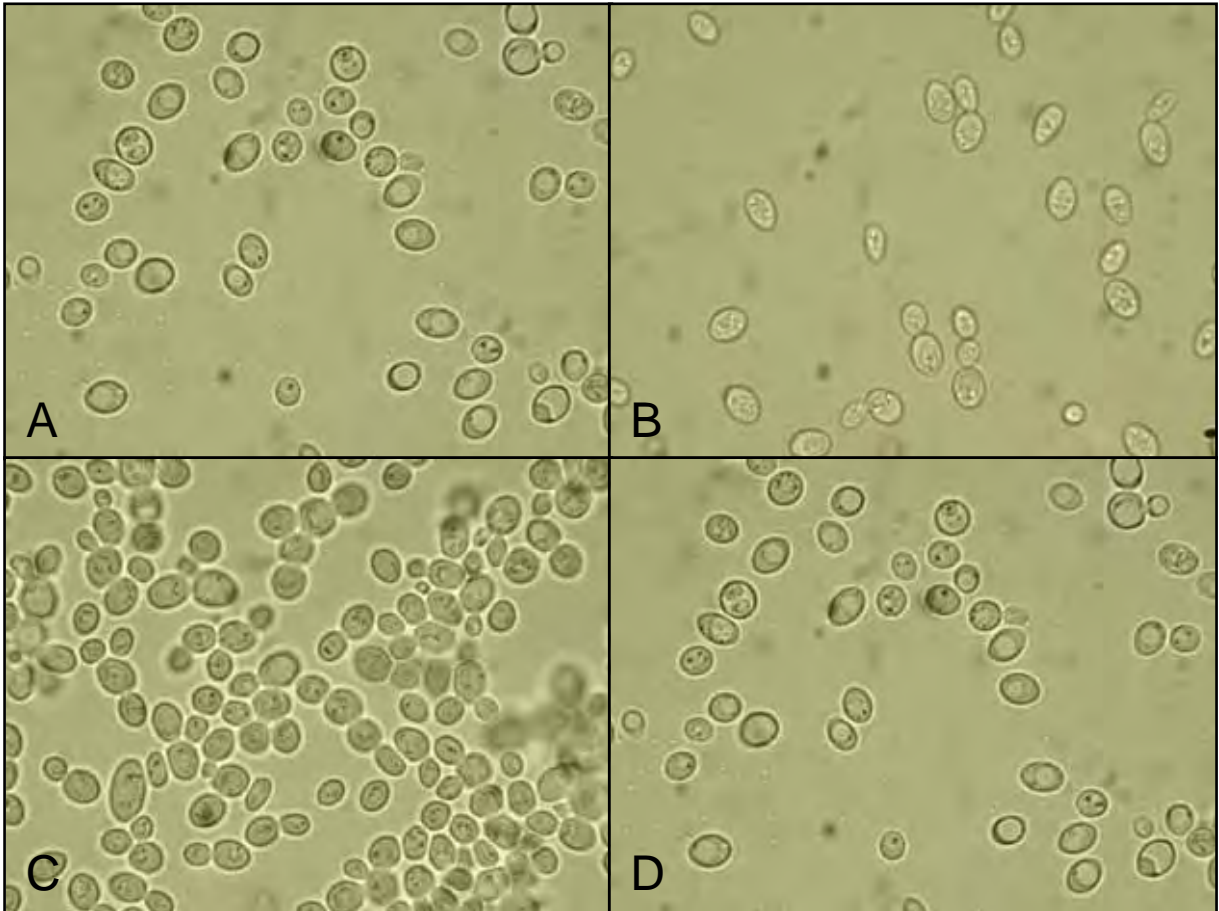


Figura 7: Células de *Saccharomyces cerevisiae* SA após cultivo em meio YNB contendo **Sacarose 22 % (p/v)**, no início da fermentação (A), suplementado com 1 % (p/v) de peptona (B), casaminoácidos (C) ou sulfato de amônio (D). Condições de cultivo: 30° C, **200 rpm** e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

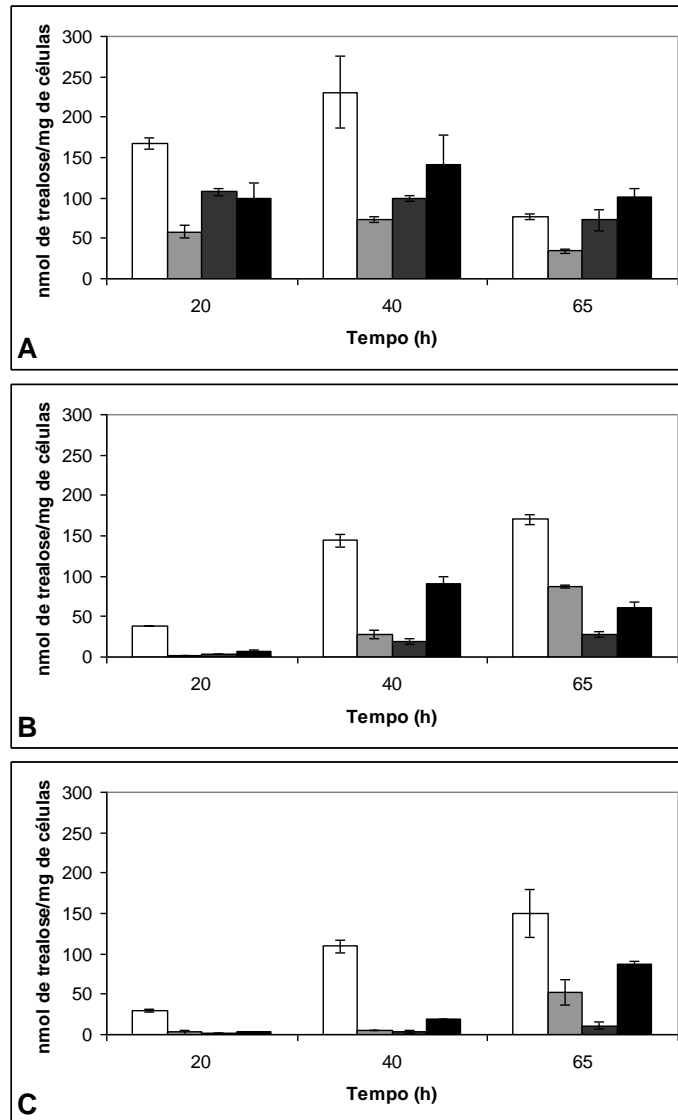


Figura 8: Produção de trealose por *S. cerevisiae* RED Star (□), BG (■), CAT (■) e SA (■) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (A), casaminoácidos (B) ou sulfato de amônio (C) e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

4.1.2. Estudos realizados sem agitação

Os estudos realizados com sacarose, suplementados com fontes de nitrogênio estruturalmente complexas para as linhagens RED, BG, CAT e SA estão nas figuras 9, 11, 12 e 13 e mostram o acúmulo de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar.

Para os estudos realizados sem agitação, também se observou que foi no meio suplementado com peptona que as linhagens apresentaram maior produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e eficiente consumo de açúcar. Sob

agitação a produção de biomassa é sempre maior que o cultivo sem agitação, Com relação ao consumo de açúcar se observa que, no geral, a fermentação é mais eficiente nos meios contendo peptona e sulfato de amônio, e a linhagem SA (figura 13) foi a que apresentou menor dependência à fonte de nitrogênio, tanto com relação ao consumo de açúcar como viabilidade celular.

Quanto a análise das características morfológicas da linhagem SA, também são semelhantes na suplementação com as três fontes de nitrogênio, com consumo eficiente da fonte de carbono. Já no caso da linhagem RED (figura 10), na suplementação com peptona e sulfato de amônio as células mantiveram-se semelhantes às células no início da fermentação (figura 10a), também havendo característica floculante e alongação celular na suplementação com casaminoácidos, portanto, assemelhando-se com os cultivos agitados, onde houve consumo mais eficiente da fonte de carbono na suplementação com peptona e sulfato de amônio.

Os níveis de trealose (figura 15), nos cultivos sem agitação, também foram diferentes entre as linhagens e variaram com as fontes de nitrogênio. A maior produção do dissacarídeo foi nos cultivos não agitados e na suplementação com peptona (figura 15). A análise dos dados de forma comparativa sugere que o maior acúmulo de trealose, nos cultivos não agitados, pode ser uma indicação da melhor adaptação das linhagens ao processo fermentativo, uma vez que houve a preservação da viabilidade celular mais efetiva nos cultivos não agitados quando comparado com os cultivos agitados.

A linhagem SA, também nos cultivos não agitados, mostrou menor dependência com relação à natureza da fonte de nitrogênio.

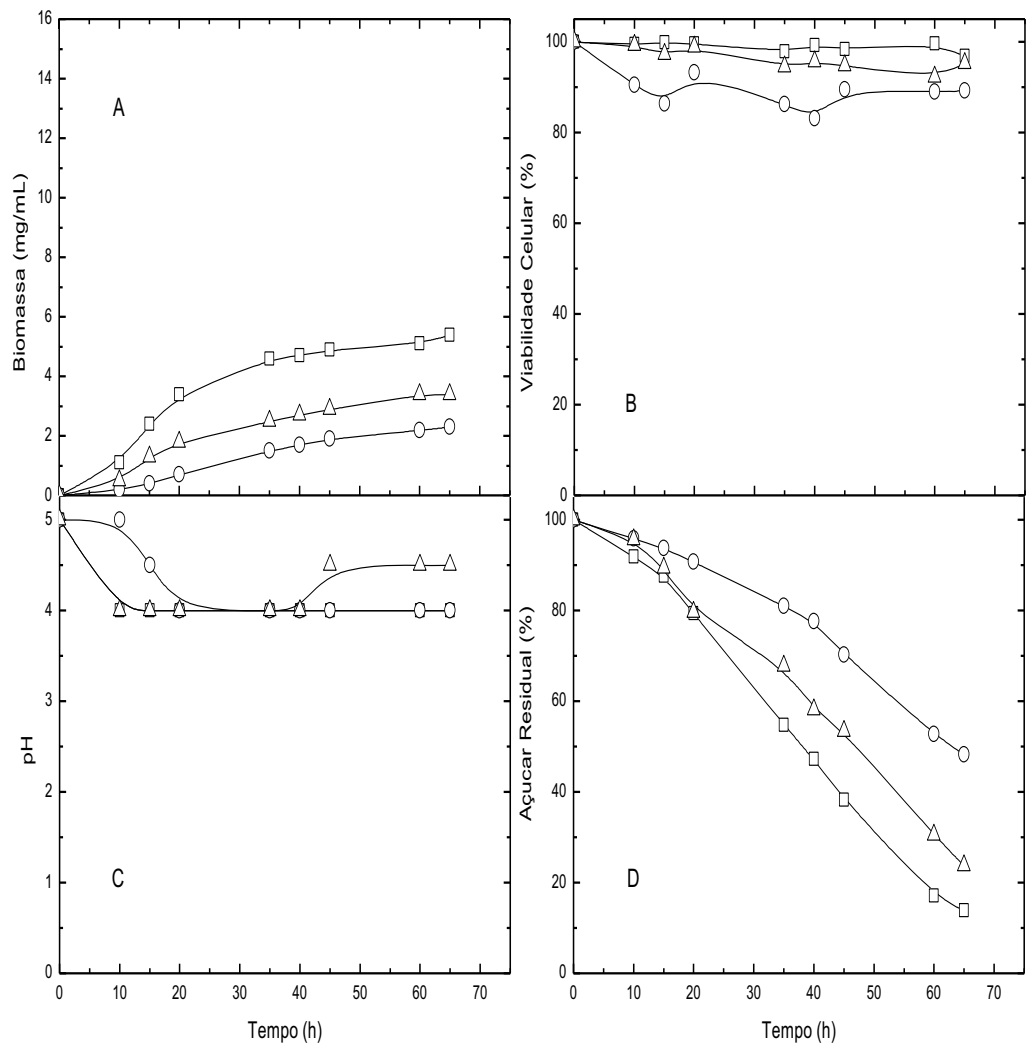


Figura 9: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (RED) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

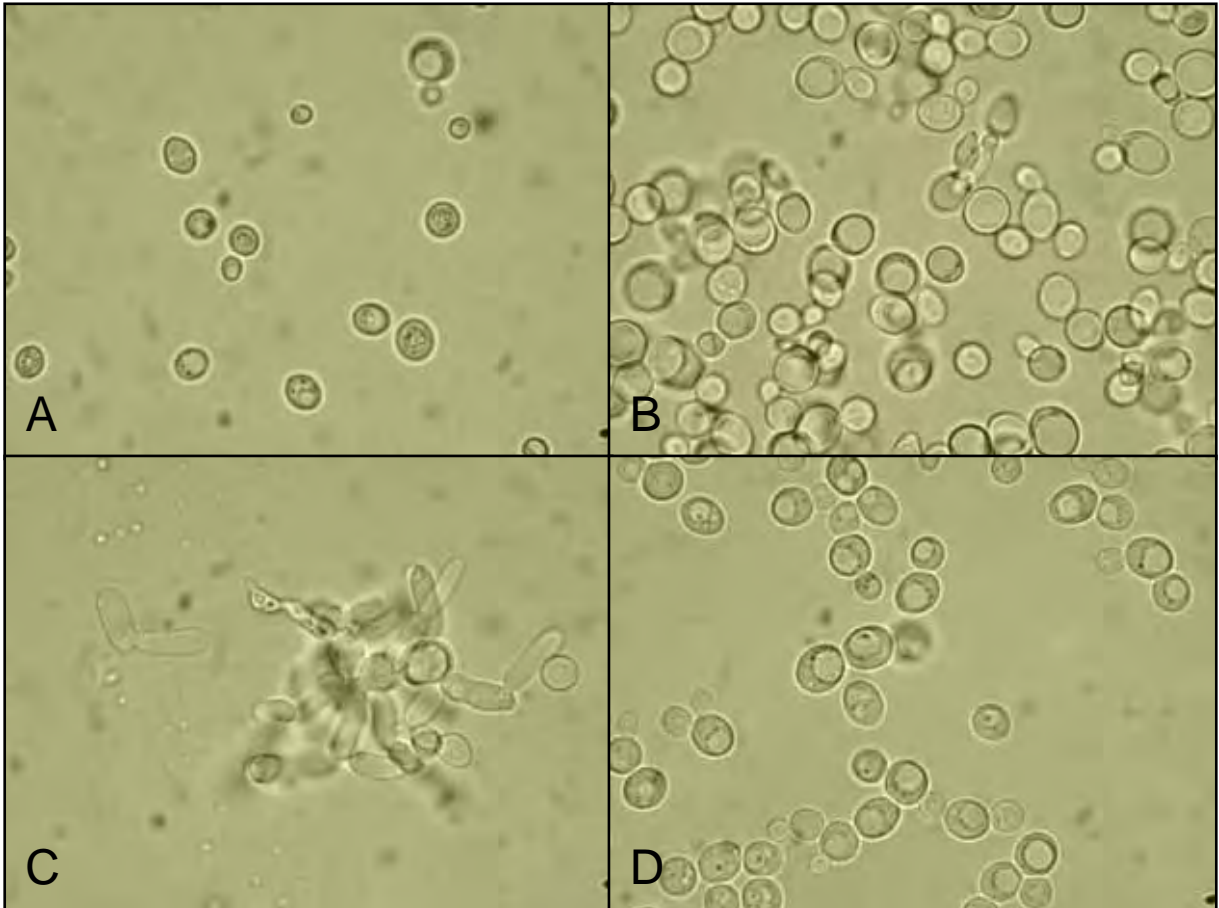


Figura 10: Células de *Saccharomyces cerevisiae* **RED** após cultivo em meio YNB contendo **Sacarose 22 %** (p/v), no início da fermentação (A), suplementado com 1 % (p/v) de peptona (B), casaminoácidos (C) ou sulfato de amônio (D). Condições de cultivo: 30° C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

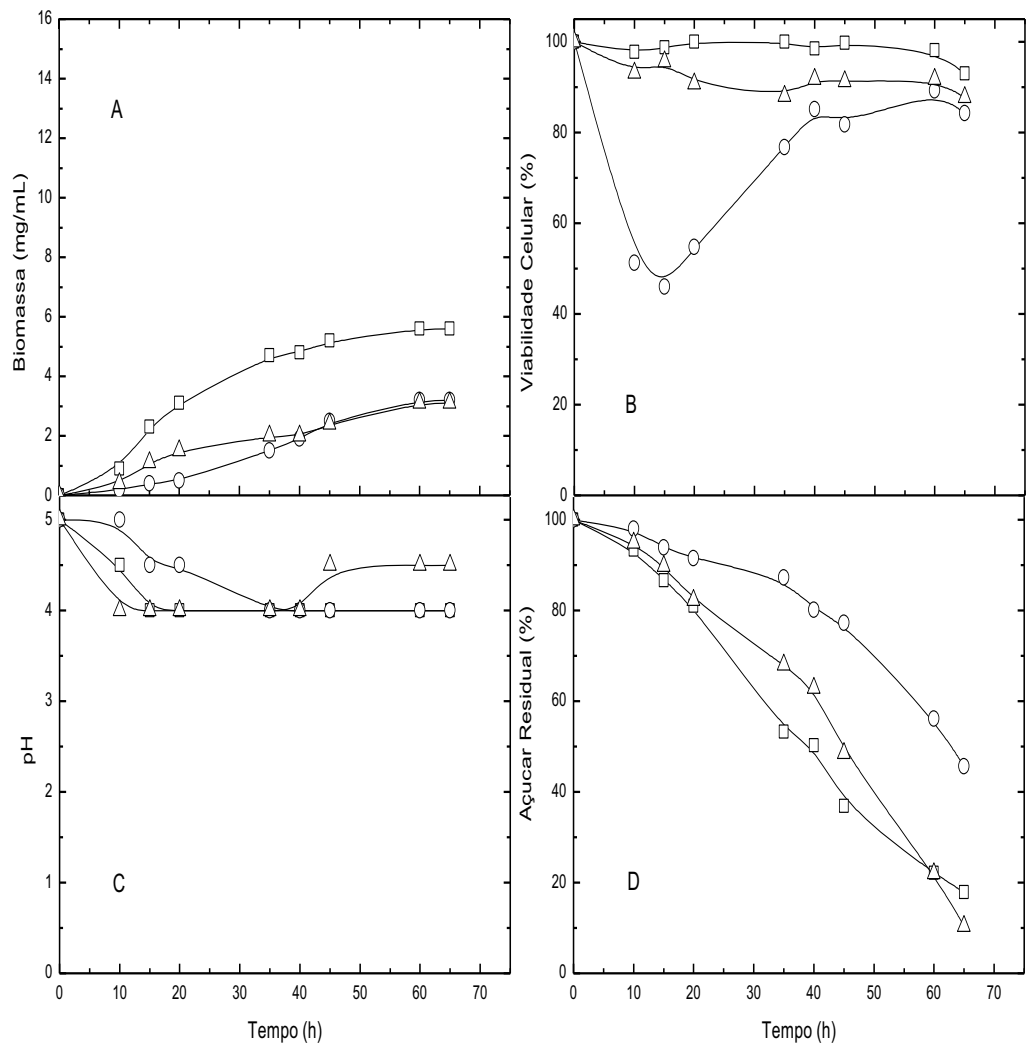


Figura 11: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (BG) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

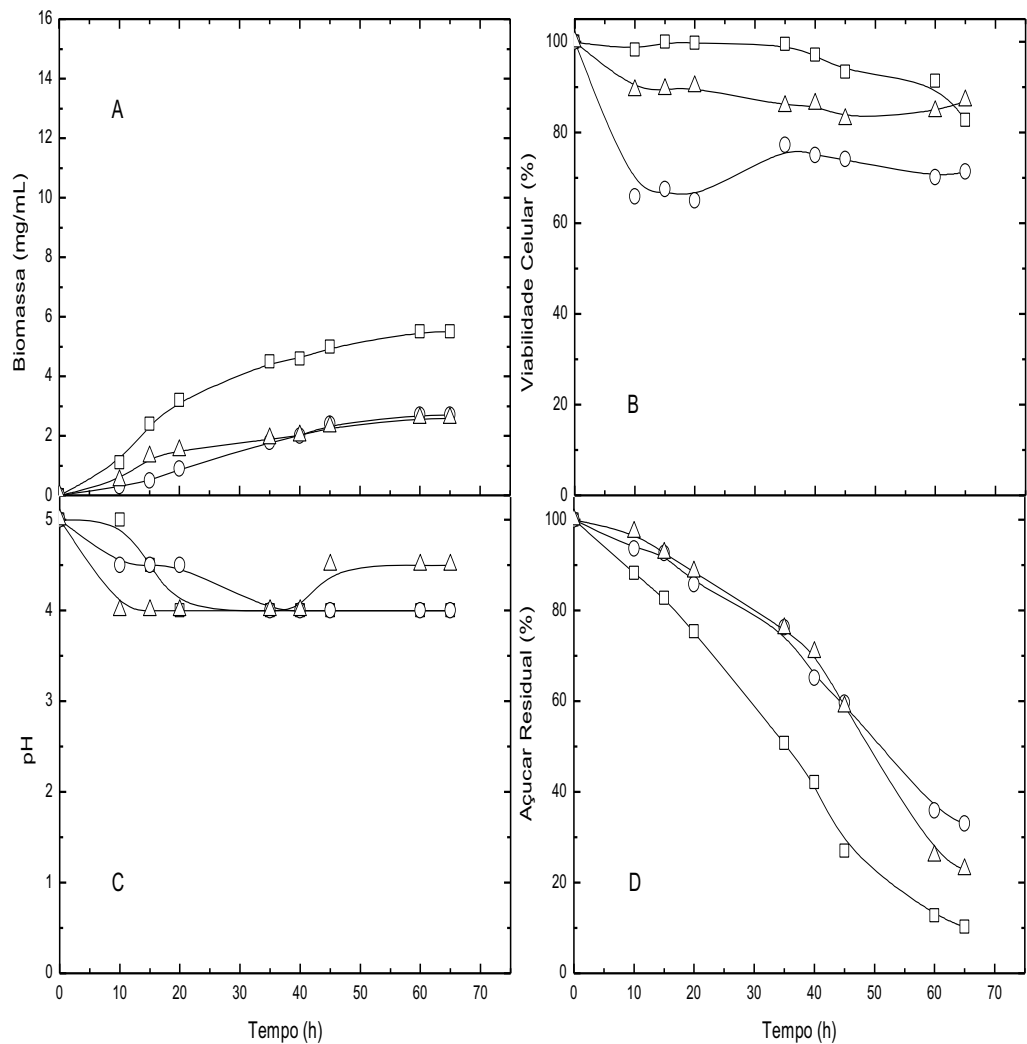


Figura 12: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (CAT) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

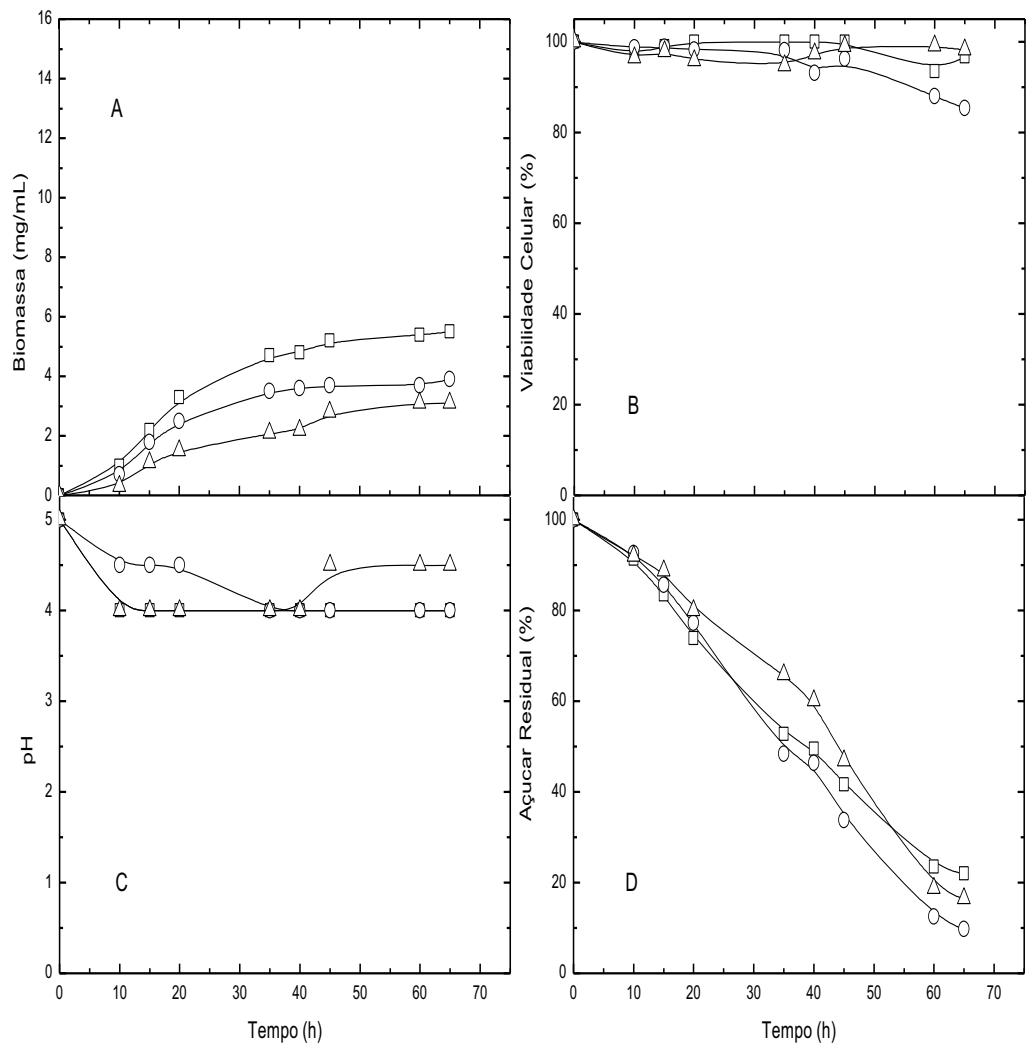


Figura 13: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (SA) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△), e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

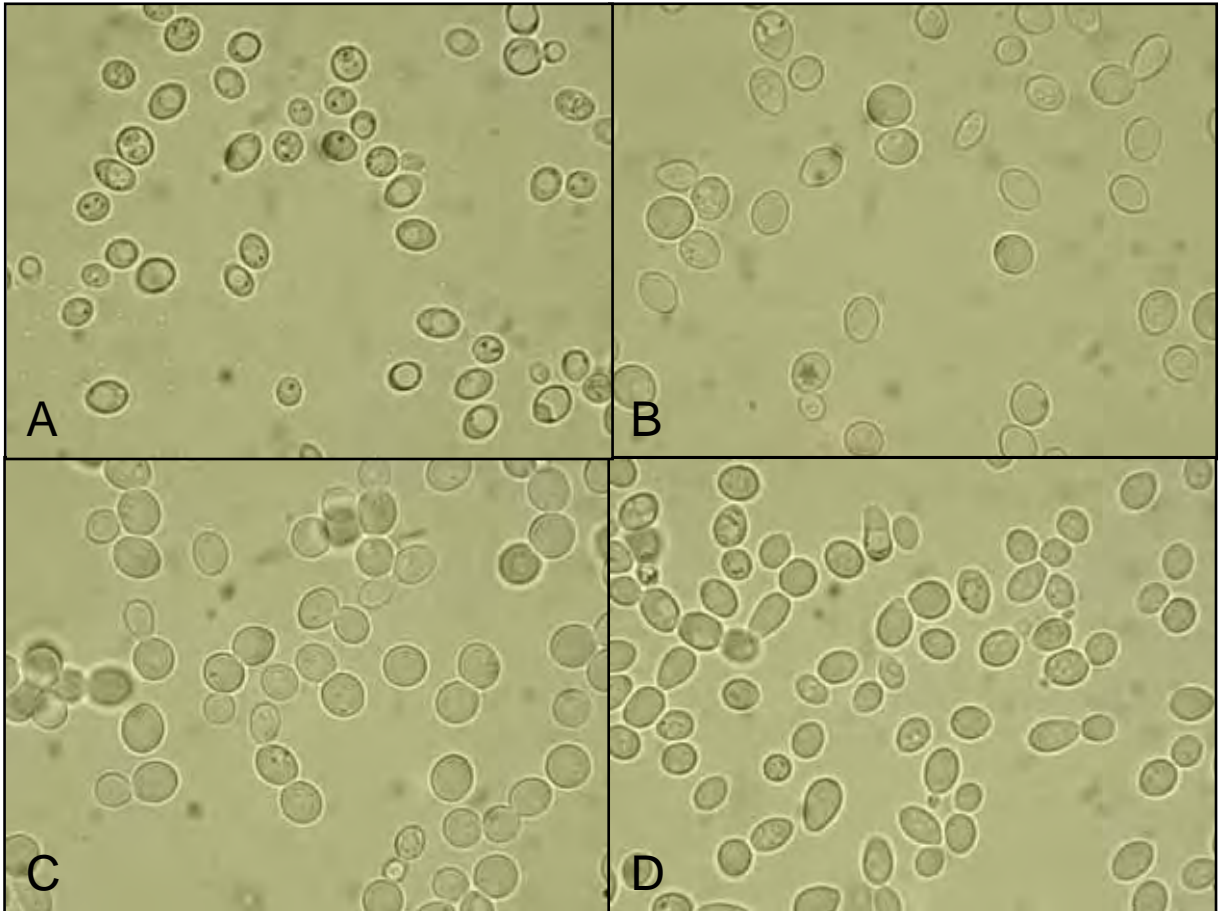


Figura 14: Células de *Saccharomyces cerevisiae* SA após cultivo em meio YNB contendo **Sacarose 22 % (p/v)**, no início da fermentação (A), suplementado com 1 % (p/v) de peptona (B), casaminoácidos (C) ou sulfato de amônio (D). Condições de cultivo: 30° C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

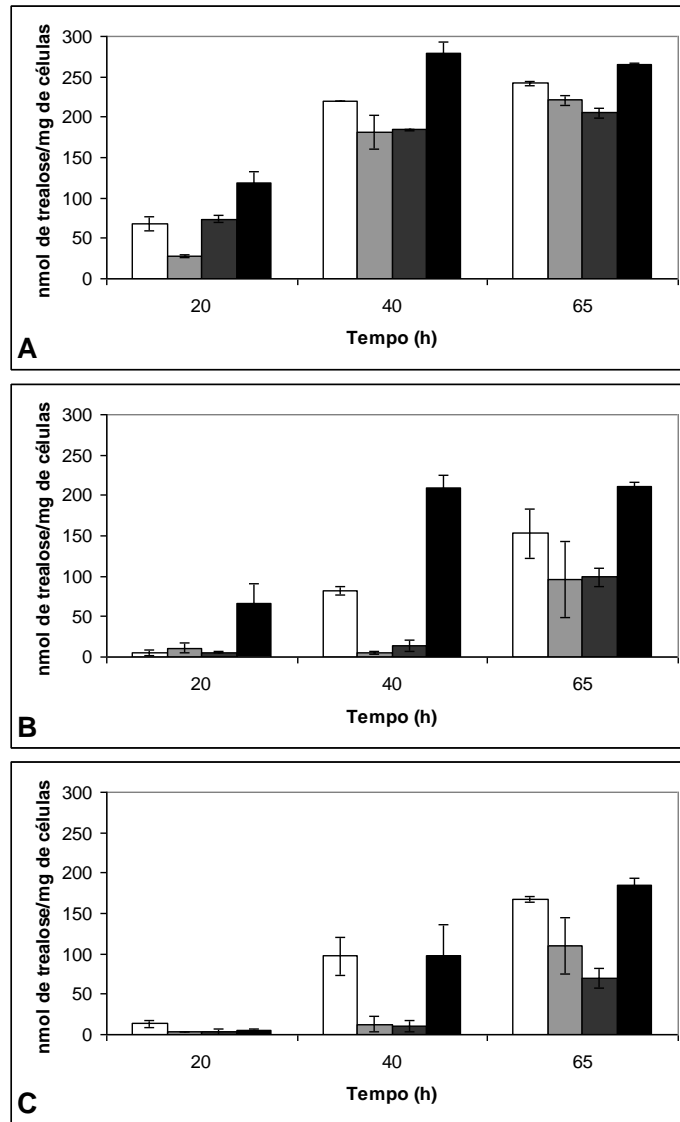


Figura 15: Produção de trealose por *S. cerevisiae* RED Star (□), BG (▣), CAT (▤) e SA (■) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (A), casaminoácidos (B) ou sulfato de amônio (C) e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

4.1.3. Perfil dos níveis de produção de trealose após cultivo em meio com e sem etanol

Com o objetivo de se avaliar a resposta das linhagens industriais brasileiras frente ao estresse induzido por etanol, foi feito o cultivo das linhagens RED, BG, CAT e SA em meio rico contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, 2% (p/v) de Sacarose, com ou sem 10 % (v/v) de etanol. Para isto, inicialmente as linhagens foram crescidas em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 10% (p/v) de Sacarose (tabela 1) para fornecer

células suficientes para o ensaio, e em condições nas quais as células tivessem alta viabilidade celular.

Tabela 1: Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de trealose por *S. cerevisiae* (**RED, BG, CAT e SA**), durante **20 h** de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e **10% (p/v) de Sacarose** para utilização como inóculo. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

Linhagem	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (%)	Trealose (nmol de trealose/mg de células)
RED	13,00	100,00	4	0	128,90
BG	11,70	96,90	4	0	142,96
CAT	10,30	89,60	4	0	94,63
SA	12,30	99,80	4	0	169,18

Após o crescimento das células, as mesmas foram inoculadas em meio com etanol (tabela 2 e figura 16) e sem etanol (tabela 3 e figura 17). Os resultados obtidos mostraram que quando os cultivos foram realizados em meio contendo etanol, os níveis de trealose produzidos foram maiores quando comparados com os níveis de trealose produzidos no meio sem etanol, indicando que quando as leveduras são cultivadas e a fonte de carbono é eficientemente consumida havendo elevada produção de etanol (representado pela presença de etanol adicionado ao meio de cultura), os níveis de trealose são maiores, atuando nos mecanismos de proteção celular frente ao estresse osmótico.

Os resultados obtidos são de grande importância do ponto de vista industrial e biotecnológico, uma vez que indicam que as linhagens industriais de leveduras têm preferência pela utilização de diferentes fontes de nitrogênio com diferentes graus de complexidade estrutural. Um ponto importante a ser observado é a capacidade que certas linhagens têm em resistir melhor a determinadas condições estressantes, como pH, temperatura, estresse nutricional e estresse osmótico entre outros, sugerindo que estudos minuciosos referentes a sua fisiologia podem culminar em maior produção de produtos biotecnológicos decorrentes de processos fermentativos mais eficientes.

Tabela 2: Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de trealose por *S. cerevisiae* (RED, BG, CAT e SA) durante 4 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, 2% (p/v) de Sacarose e 10% (v/v) de etanol para análise do estresse etanólico. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

Linhagem	Tempo (h)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (%)
RED	0	12,40	99,10	5,0	100,00
	4	14,20	96,40	4,5	0,00
BG	0	11,40	97,40	5,0	100,00
	4	13,70	96,50	4,5	0,00
CAT	0	9,80	84,20	5,0	100,00
	4	11,70	87,40	4,5	0,00
SA	0	11,20	100,00	5,0	100,00
	4	13,30	99,00	4,5	0,00

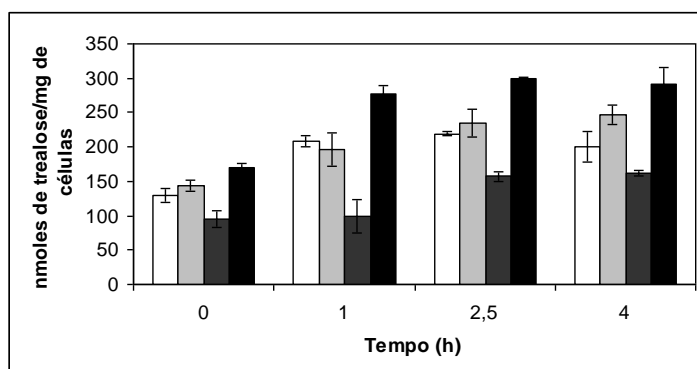


Figura 16: Produção de trealose por *S. cerevisiae* (RED (□), BG (▒), CAT (■) e SA (■)) durante 4 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, 2% (p/v) de Sacarose e 10% (v/v) de etanol para análise do estresse osmótico. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

Tabela 3: Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de trealose por *S. cerevisiae* (RED, BG, CAT e SA) durante 4 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, e 2% (p/v) de Sacarose para análise do estresse etanólico em meio sem etanol. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

Linhagem	Tempo (h)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (%)
RED	0	13,00	100,00	5,0	100,00
	4	14,90	99,50	4,5	0,00
BG	0	11,70	96,90	5,0	100,00
	4	13,10	98,00	4,5	0,00
CAT	0	10,30	89,60	5,0	100,00
	4	11,70	95,10	4,5	0,00
SA	0	12,30	99,80	5,0	100,00
	4	13,70	99,70	4,5	0,00

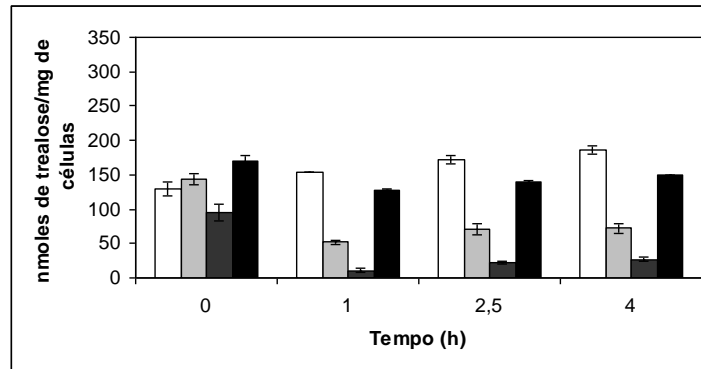


Figura 17: Produção de trealose por *S. cerevisiae* (RED (□), BG (▨), CAT (■) e SA (■) durante 4 h de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo, e 2% (p/v) de Sacarose para análise do estresse osmótico em meio sem etanol. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

4.2. Estudos Realizados com Maltose 10% (p/v)

A partir dos resultados obtidos com sacarose, optou-se por trabalhar com maltose e glicose por serem os açúcares mais abundantes, após a hidrólise do amido de milho, para a produção de etanol combustível (DEVANTIER et al. 2004). Os experimentos iniciais (Figura 18) com as linhagens RED, BG, CAT e SA mostraram que somente as linhagens RED e SA apresentaram crescimento expressivo em meio contendo maltose. As linhagens BG e CAT não cresceram em maltose, mesmo após várias tentativas de adaptação em meio contendo maltose como fonte de carbono. Assim, os experimentos com maltose foram realizados com as linhagens industriais RED, SA e a linhagem PE (incluída posteriormente).

Nesta etapa do trabalho estudou-se a fermentação da maltose nas concentrações 10% (p/v) e glicose 20% (p/v). O estudo da utilização da maltose foi realizado para avaliar a possibilidade do emprego das leveduras industriais brasileiras na produção de etanol a partir do milho, processo no qual a etapa de hidrólise enzimática do amido libera uma quantidade considerável de maltose.

Tempo (h)

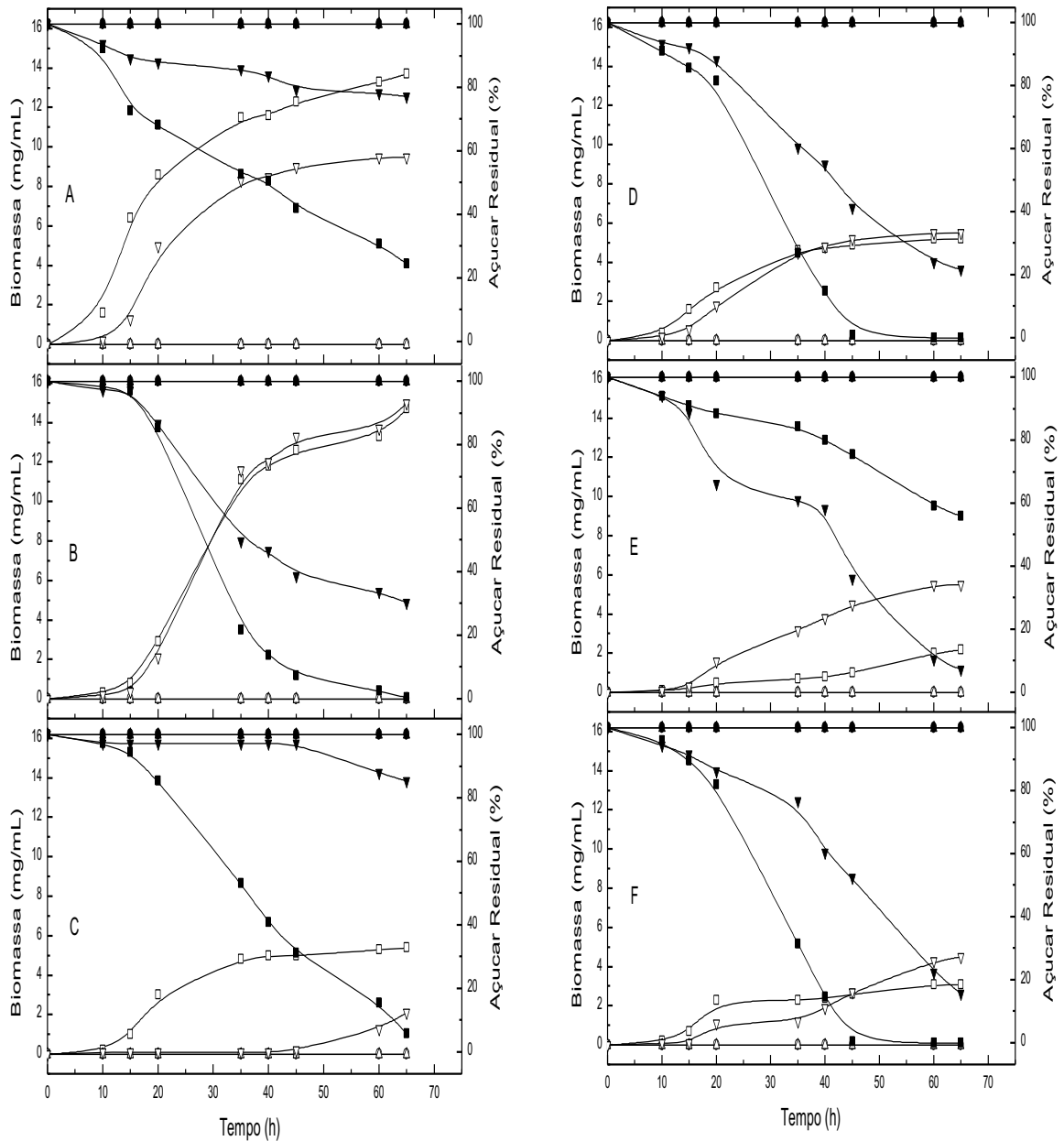


Figura 18: Produção de biomassa e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* (RED (□, ■), BG (○, ●), CAT (△, ▲) e SA (▽, ▼)) durante crescimento agitado (A, B e C) e não agitado (D, E e F) em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (A e D), casaminoácidos (B e E) ou sulfato de amônio (C e F) e 10% (p/v) de Maltose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

A análise da figura 18 mostra que as linhagens BG e CAT não crescem em meio contendo maltose como fonte de carbono.

Considerando que a utilização de maltose acontece em leveduras após indução de genes responsáveis pelo transporte e hidrólise da maltose, os experimentos com maltose foram realizados com células adaptadas, conforme descrito no item 3.2.1.

4.2.1. Estudos Realizados com Maltose 10% (p/v) após Adaptação Celular

Todas as espécies do gênero *Saccharomyces* podem utilizar uma grande variedade de açúcares como fontes de carbono, porém, cada linhagem se difere quanto a habilidade na utilização da fonte de carbono. Em geral, a utilização de um açúcar particular é controlada pela repressão por glicose por um sistema complexo de regulação que afeta a expressão de genes que incluem esses envolvendo a utilização de açúcar (ERNANDES et al., 1993). O metabolismo da maltose também é regulado pela glicose, através do controle da expressão dos complexos gênicos de *MAL1* ao *MAL6*. O complexo mais estudado é o *MAL6*, constituído pelos genes que codificam, respectivamente, as proteínas maltose permease, maltase e uma proteína reguladora, que ativa a expressão dos genes *MAL61*, *MAL62*, e o próprio *MAL63* (GANCEDO, 1998).

Quanto a utilização de maltose, estudos bioquímicos com células de *Saccharomyces cerevisiae* indicam a presença de pelo menos duas formas de transportadores de maltose, os de baixa afinidade e os de alta afinidade, e mostram que quando as células são submetidas a cultivos em meio contendo essa fonte de carbono, é possível ocorrer o mecanismo de adaptação a utilização de maltose, ou seja, ocorre a expressão de genes relacionados a sua utilização (ERNANDES et al., 1993).

Sabendo-se que há adaptação das células quanto à utilização de maltose, cultivos foram realizados em meio contendo maltose 10% (p/v), suplementados com peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio após adaptação das linhagens RED, SA e uma outra linhagem, a PE, sendo as duas últimas utilizadas nas usinas produtoras de etanol no Brasil.

4.2.1.1. Estudos Realizados com Agitação

Para os cultivos em meio contendo maltose 10 % (p/v) para a linhagem RED (figura 19) em experimentos agitados houve elevada produção de biomassa nos meios suplementados com peptona e casaminoácidos, com consumo da fonte de carbono mais rápido na suplementação com peptona. Também foi possível observar que na suplementação com sulfato de amônio houve menor produção de biomassa porém com a manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono. Também é possível observar que a variação na viabilidade inicia-se com a exaustão da fonte de carbono. Para a linhagem SA (figura 20), houve maior produção de biomassa na suplementação com casaminoácidos, com a manutenção da viabilidade celular e consumo mais rápido da fonte de carbono. Houve menor produção de biomassa na suplementação com peptona e sulfato de amônio, com a manutenção da viabilidade celular, porém, observa-se que a produção de biomassa foi mais rápida na suplementação com peptona com consequente consumo da fonte de carbono. Como na suplementação com sulfato de amônio a produção de biomassa foi mais lenta, a fonte de carbono também acabou sendo consumida mais lentamente, contudo, em 65 horas de fermentação, os perfis de consumo de açúcar são próximos na suplementação com peptona e sulfato de amônio. No cultivo da linhagem PE (figura 21) houve maior produção de biomassa na suplementação com peptona e casaminoácidos, com a manutenção da viabilidade celular e consumo da fonte de carbono. Na suplementação com sulfato de amônio houve menor produção de biomassa com consumo mais lento da fonte de carbono, porém observando-se eficiência após 65 horas de cultivo.

Quanto a produção de trealose (figura 22), é possível observar que a linhagem RED produziu menor conteúdo de trealose na suplementação com as três fontes de nitrogênio, possivelmente em decorrência das condições de cultivo em que ela é geralmente utilizada na produção de etanol a partir do milho. Já as linhagens SA e PE mostraram sentir mais o efeito do cultivo em meio contendo maltose, condição em que geralmente não são utilizadas. A linhagem SA produziu mais trealose na suplementação com peptona e casaminoácidos, onde foi observado melhor eficiência quanto ao consumo da fonte de carbono. Já a linhagem PE produziu maiores níveis de trealose na suplementação com peptona e casaminoácidos, onde foi observado consumo mais rápido da fonte de carbono.

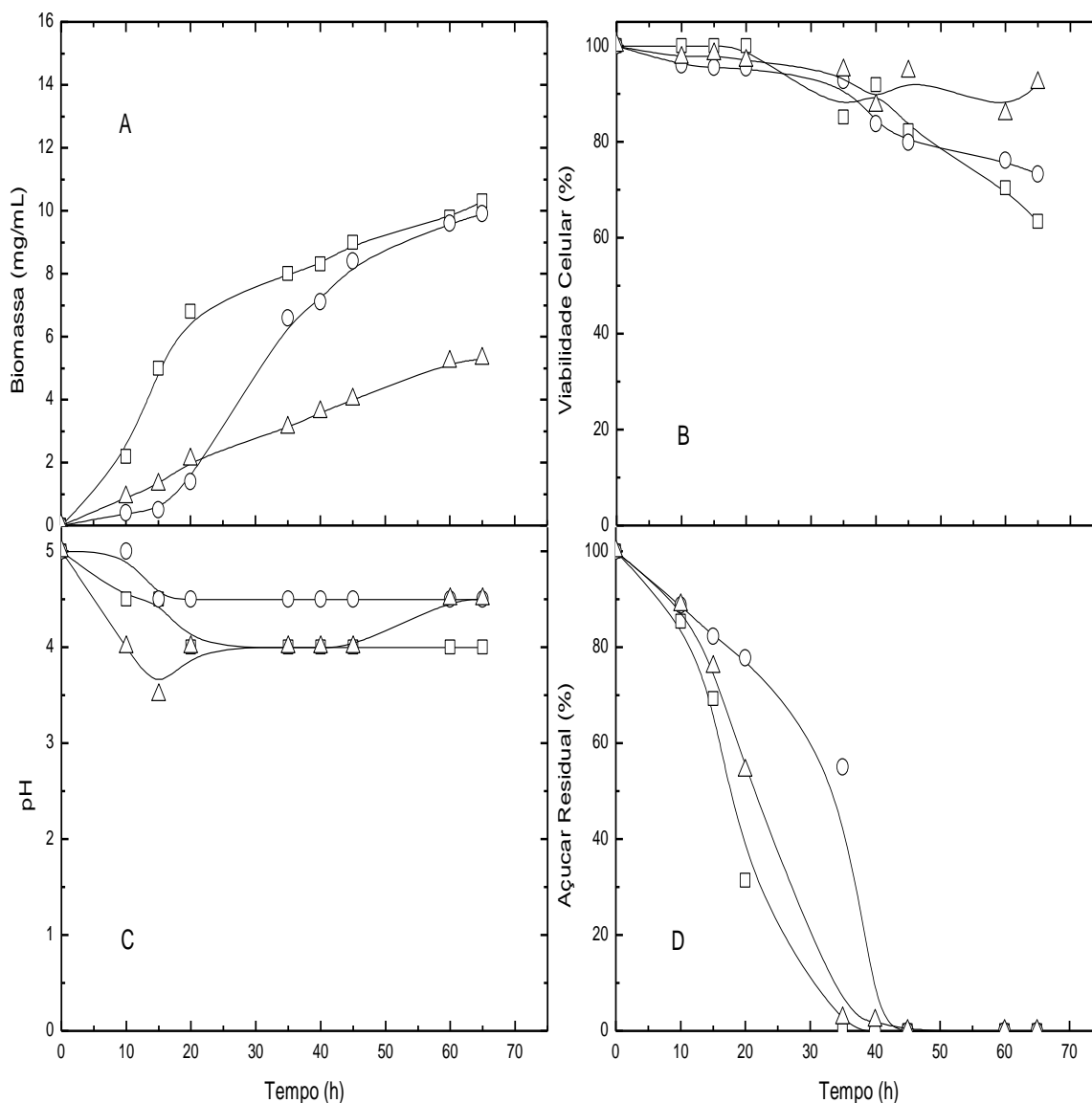


Figura 19: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (RED - adaptada em maltose) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△) e 10% (p/v) de Maltose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

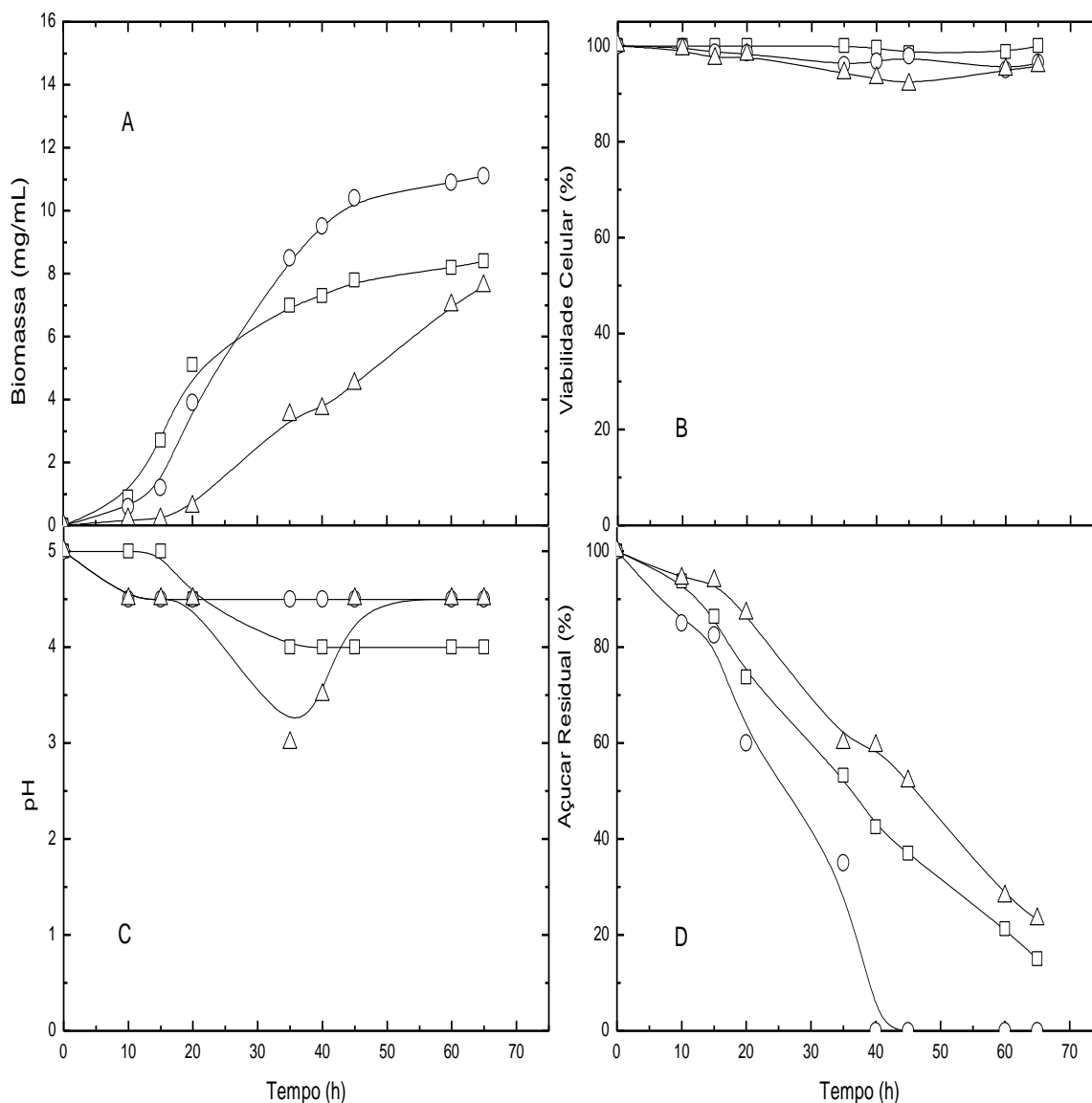


Figura 20: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (**SA - adaptada em maltose**) durante crescimento agitado em 25 mL de meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△) e **10% (p/v) de Maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

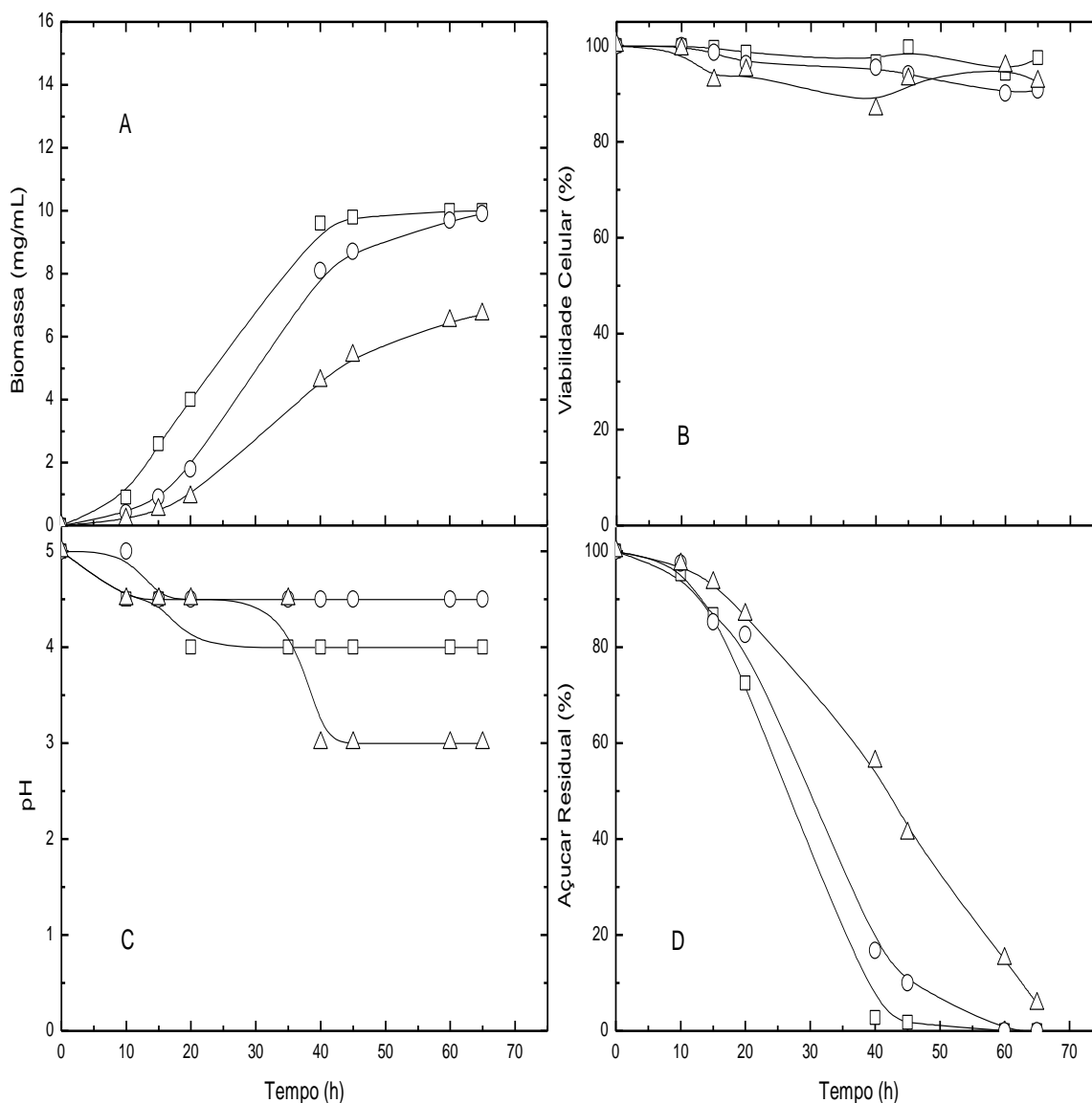


Figura 21: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (PE - adaptada em maltose) durante crescimento agitado em 25 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△) e 10% (p/v) de Maltose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

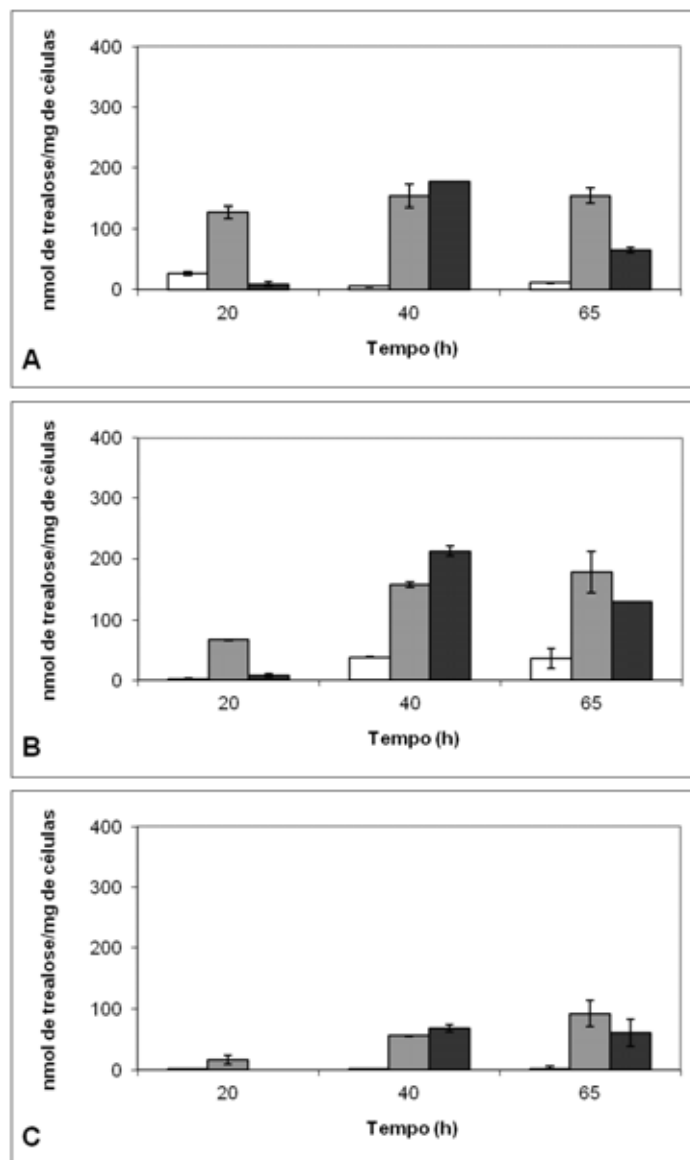


Figura 22: Produção de trealose por *S. cerevisiae* (após adaptação em maltose) **RED Star** (□), **SA** (▒) e **PE** (■) durante crescimento agitado em 25 mL de meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (A), casaminoácidos (B) ou sulfato de amônio (C) e **10% (p/v) de Maltose**. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

4.2.1.2. Estudos Realizados sem Agitação

Para os cultivos em meio contendo maltose 10 % (p/v) para a linhagem RED (figura 23) em experimentos realizados sem agitação houve maior produção de biomassa na suplementação com peptona, com a manutenção da viabilidade celular e consumo mais rápido da fonte de carbono. Na suplementação com sulfato de amônio, a produção de biomassa foi menor e mais lenta, mas havendo a manutenção da viabilidade celular e consumo da fonte de carbono. Os problemas foram observados na suplementação com casaminoácidos, onde houve pequena

produção de biomassa com perda na viabilidade celular e consequente fermentação ineficiente, com açúcar residual em torno de 50 % (p/v). No caso da linhagem SA (figura 24), houve maior produção de biomassa na suplementação com peptona e casaminoácidos, com a manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono. Na suplementação com sulfato de amônio a produção de biomassa foi menor e mais lenta, interferindo no consumo da fonte de carbono, que acabou sendo mais lenta quando comparada com a suplementação com peptona e casaminoácidos. Para os experimentos realizados com a linhagem PE (figura 25) houve maior produção de biomassa na suplementação com peptona, com a manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono. Na suplementação com sulfato de amônio a produção de biomassa foi menor, mas mantendo-se a viabilidade e consumindo a fonte de carbono eficientemente, porém mais lentamente. Foi na suplementação com casaminoácidos que a linhagem sentiu um pouco mais o efeito da fonte de nitrogênio, sendo observado que houve elevação na produção de biomassa a partir de 45 horas de cultivo, consequentemente interferindo no consumo da fonte de carbono que acabou em torno de 15 % (p/v) de açúcar residual.

Os níveis de trealose (figura 26) também mostram que a linhagem RED produziu menores níveis de trealose. As linhagens SA e PE produziram maiores níveis de trealose, sendo que a linhagem SA produziu maiores concentrações do carboidrato de reserva na suplementação com peptona e casaminoácidos, fontes de nitrogênio que propiciaram melhor eficiência nos processos fermentativos. Já a linhagem PE produziu mais trealose na suplementação com peptona, fonte nitrogenada que propiciou melhores fermentações, enquanto que na suplementação com casaminoácidos e sulfato de amônio a produção foi menor.

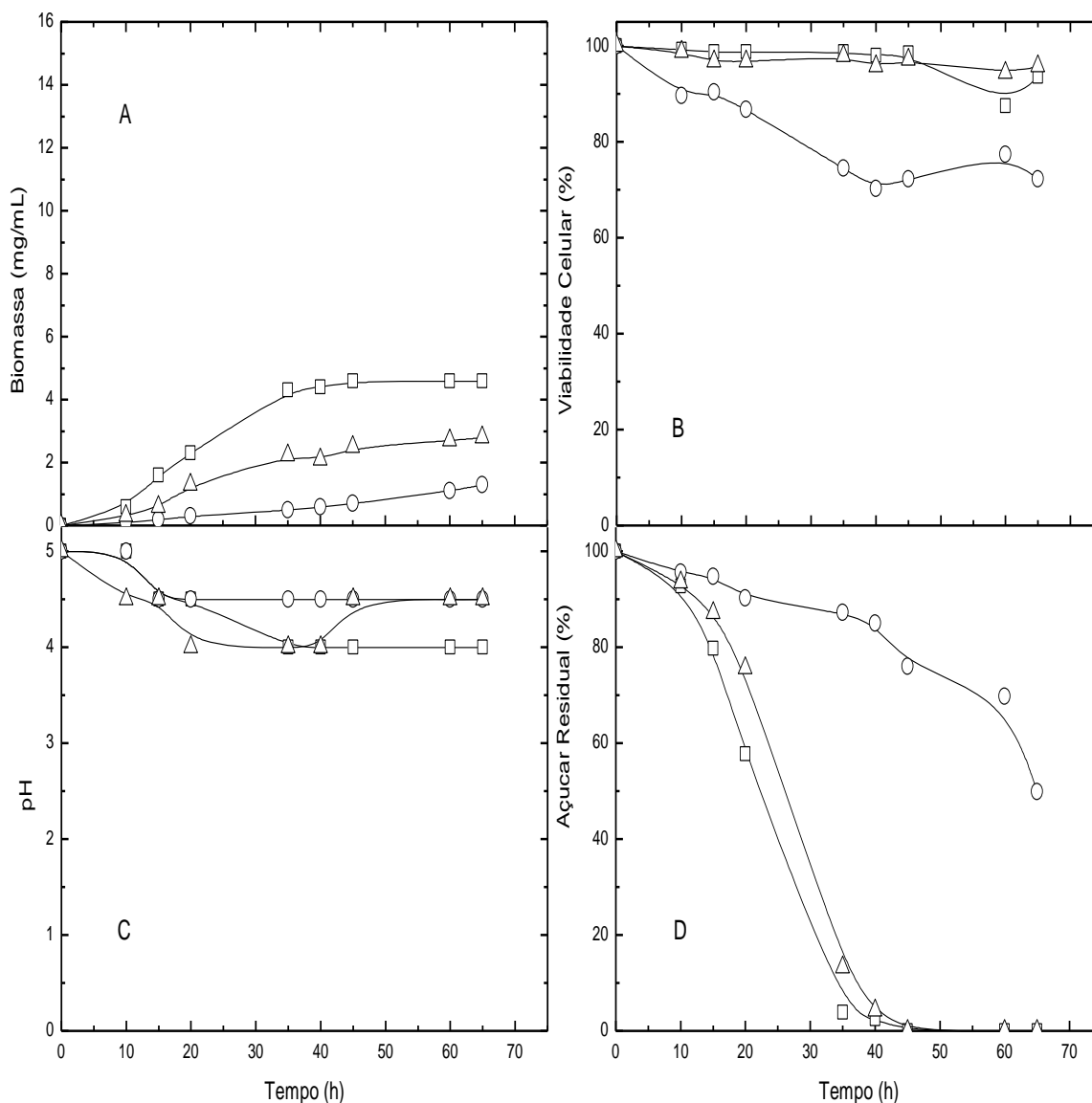


Figura 23: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (RED - adaptada em maltose) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△) e 10% (p/v) de Maltose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

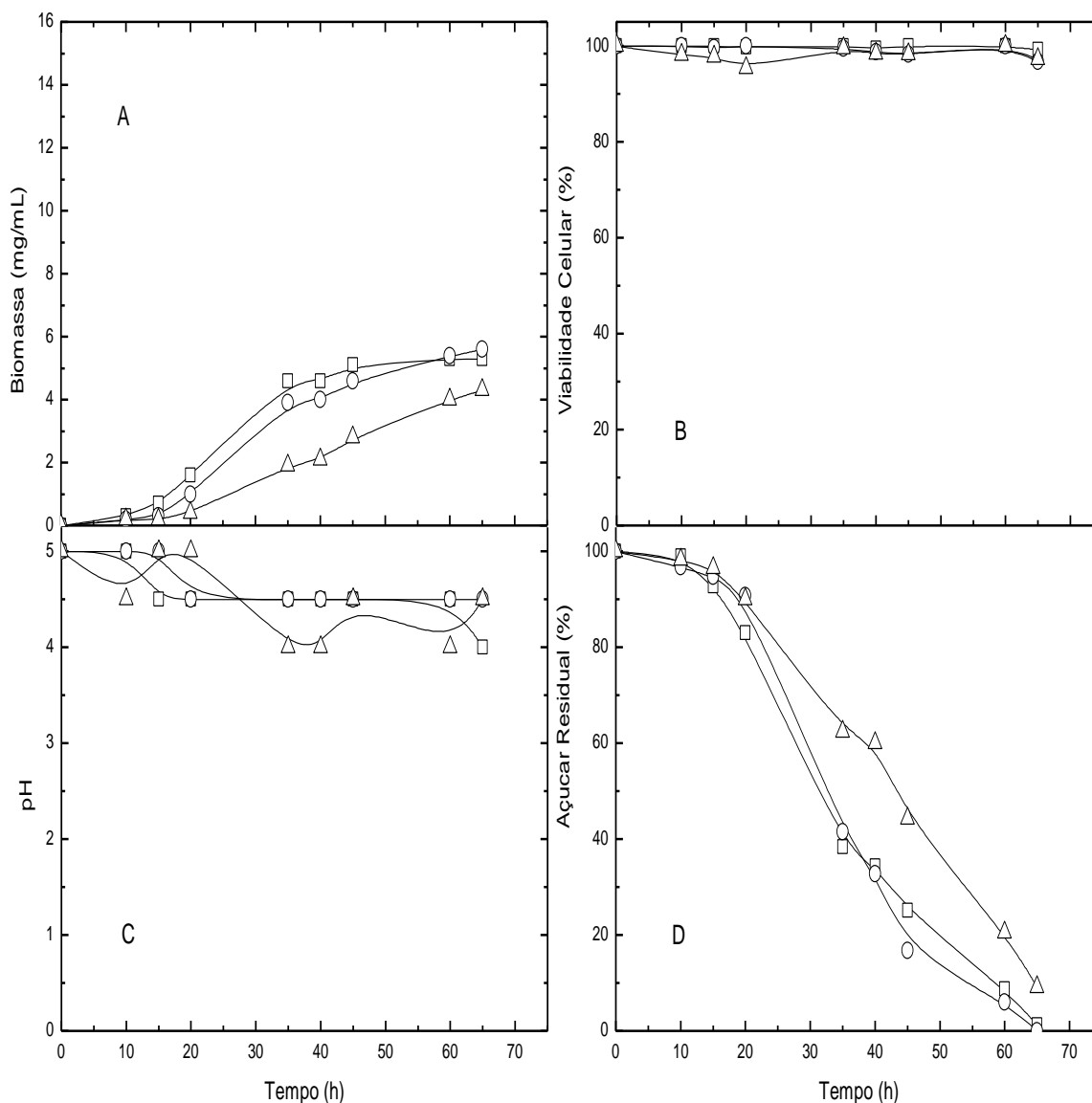


Figura 24: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (**SA - adaptada em maltose**) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△) e 10% (p/v) de Maltose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

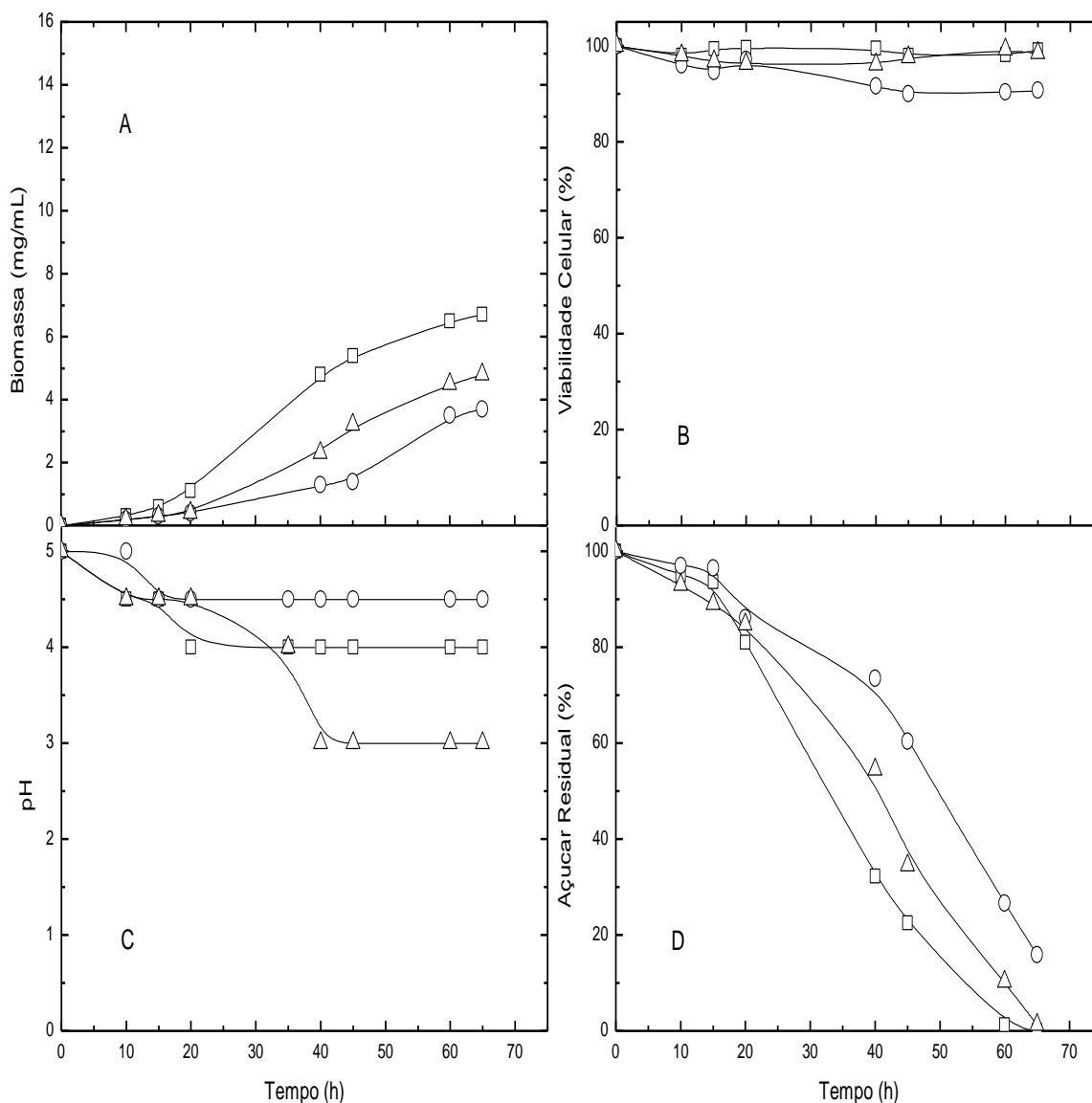


Figura 25: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* (PE - adaptada em maltose) durante crescimento não agitado em 35 mL de meio YNB contendo 1% (p/v) de peptona (□), casaminoácidos (○) ou sulfato de amônio (△) e 10% (p/v) de Maltose. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

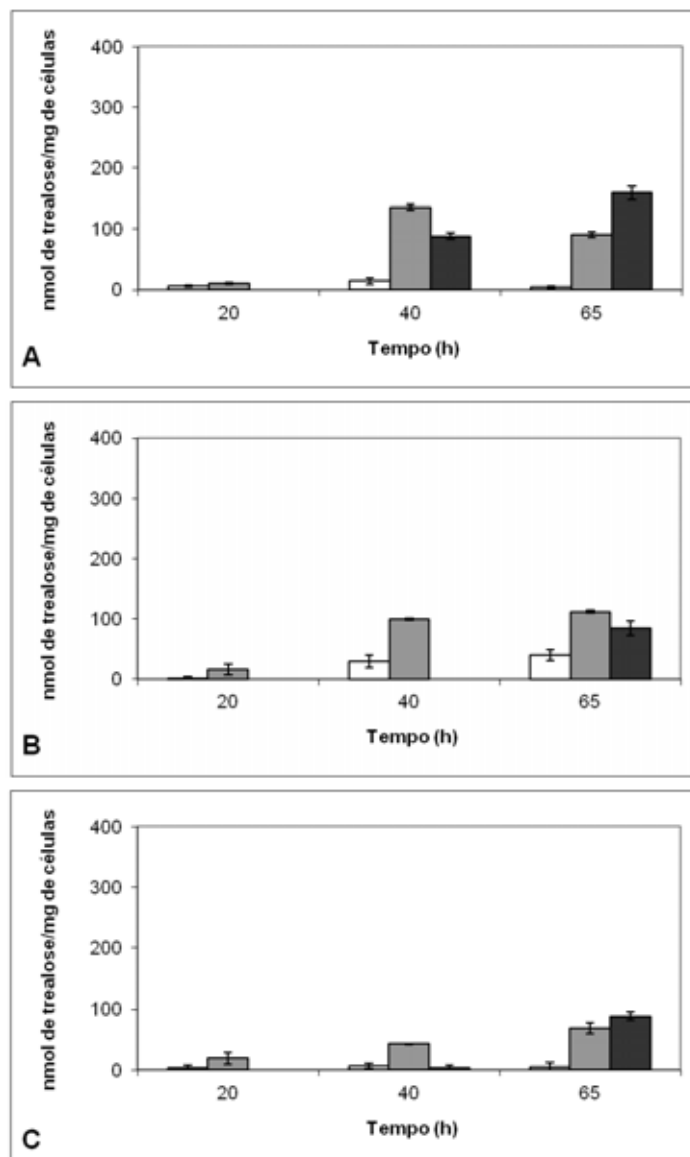


Figura 26: Produção de trealose por *S. cerevisiae* (após adaptação em maltose) **RED Star** (□), **SA** (▒) e **PE** (■) durante crescimento agitado em 35 mL de meio **YNB** contendo 1% (p/v) de peptona (A), casaminoácidos (B) ou sulfato de amônio (C) e **10% (p/v) de Maltose**. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. Durante o cultivo, o meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH 1,0 M.

4.3. Estudos realizados com glicose 20% (p/v)

Para entender melhor os resultados obtidos nos experimentos realizados com Maltose 10% (p/v), experimentos foram realizados utilizando meio de fermentação YNB contendo glicose 20% (p/v), suplementado com peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio, para entender melhor se em alguns casos em que a maltose não foi utilizada, poderia ser devido a capacidade da levedura em utilizar a maltose. Foram feitos experimentos com e sem agitação.

A Tabela 4 apresenta o acúmulo de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar. Quando os cultivos foram realizados com agitação, para a linhagem RED, houve maior produção de biomassa na suplementação com peptona e consumo eficiente da fonte de carbono, observando-se queda na viabilidade celular principalmente a partir de 40 horas de fermentação, tempo em que já havia sido consumido quase todo açúcar do meio. Na suplementação com casaminoácidos e sulfato de amônio houve menor produção de biomassa com consequente aumento de açúcar residual em decorrência da perda da viabilidade celular. No caso da linhagem SA, também houve maior produção de biomassa na suplementação com peptona, com a manutenção da viabilidade celular e consumo da fonte de carbono. Na suplementação com casaminoácidos e sulfato de amônio também houve consumo eficiente da fonte de carbono, porém, havendo maior queda na viabilidade celular. A linhagem PE produziu mais biomassa na suplementação com peptona, com a manutenção da viabilidade celular e consumo da fonte de carbono. Já na suplementação com casaminoácidos e sulfato de amônio foi observada menor produção de biomassa e perda da viabilidade celular com maior açúcar residual na suplementação com casaminoácidos, enquanto que na suplementação com sulfato de amônio o açúcar residual ficou em 12% (p/v) de glicose.

Quando foram realizados experimentos não agitados, em todos os casos, a produção de biomassa foi menor, porém, a suplementação com peptona foi a que propiciou melhores condições de fermentação com a manutenção da viabilidade celular e consumo eficiente da fonte de carbono para as três linhagens analisadas. Apesar de ter sido observada menor produção de biomassa na suplementação com sulfato de amônio, houve a manutenção da viabilidade celular e consequente consumo eficiente da fonte de carbono. Os piores resultados foram obtidos na suplementação com casaminoácidos, onde foi possível observar a baixa produção de biomassa, a perda da viabilidade celular e a presença de açúcar residual, principalmente no caso da linhagem RED. A linhagem SA também mostrou ser eficiente na suplementação com casaminoácidos com a manutenção da viabilidade celular e consumo da fonte de carbono, enquanto que no cultivo da linhagem PE foi possível observar açúcar residual em 15% (p/v).

Tabela 4: Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* (**RED, SA e PE**) durante 40 e 65 horas de cultivo em 25 mL (agitado) e 35 mL (não agitado) meio contendo Glicose 20% (p/v) e 1% (p/v) de peptona, casaminoácidos ou sulfato de amônio.

Condição de fermentação ^a	Linhagem	Tempo (h)	Peptona		Casaminoácidos			Sulfato de amônio ^b			
			Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)
Com agitação (200 rpm)	RED	40	6,9	83,4	9,0	3,6	72,9	53,8	3,5	65,9	42,0
		65	7,4	56,7	0,5	4,5	67,5	23,4	4,5	44,5	15,8
	SA	40	6,9	99,0	7,1	5,3	85,7	13,7	4,2	80,4	42,3
		65	8,0	88,8	0,3	6,0	75,8	0,4	5,0	55,8	1,3
	PE	40	6,8	100,0	19,3	3,5	78,0	62,1	4,9	86,9	49,1
		65	7,5	98,7	3,9	4,9	76,7	31,5	5,6	75,4	12,0
Sem agitação	RED	40	2,5	96,2	41,4	1,3	80,6	61,7	2,0	88,2	41,0
		65	3,4	91,7	0,0	1,9	63,0	45,2	2,4	90,0	0,0
	SA	40	3,9	99,4	47,9	2,9	96,3	51,0	2,2	97,3	56,2
		65	4,3	97,8	0,6	3,4	83,0	1,0	3,0	85,0	3,5
	PE	40	4,0	92,6	64,6	0,7	83,8	80,6	2,2	98,6	62,4
		65	4,3	84,1	2,0	2,5	75,0	15,0	3,4	90,0	2,0

^a Condição de fermentação: 30°C e pH inicial pH 5.0.

^b O meio contendo sulfato de amônio teve o pH ajustado para 5.0 com NaOH 1M.

4.4. Estudos com diferentes concentrações de sacarose - experimentos com alta densidade celular

Nesta etapa do trabalho com experimentos de fermentação com alta densidade celular foram conduzidos vários ensaios exploratórios, visando sempre a manutenção da viabilidade celular e o consumo máximo de açúcar. Foram realizados experimentos com diferentes concentrações de sacarose (22, 25 e 30% (p/v)), alteração na forma de cultivo (batelada simples e batelada alimentada por pulso) - com e sem agitação, variação de tempo dos pulsos de alimentação, variação da temperatura de fermentação (28, 30 e 32°C), e finalmente experimentos com mosto industrial com alta concentração de sacarose, com e sem complementação nutricional.

Em todos os experimentos realizados com alta densidade celular o procedimento de obtenção de células foi feito conforme item 3.2.3.1 e descrito abaixo (Tabela 5), que mostra grande acúmulo de biomassa e com alta viabilidade celular e conforme. Após o preparo o inóculo, as células foram lavadas três vezes com água gelada estéril e centrifugadas. Após cada ciclo de fermentação, as amostras também foram lavadas e centrifugadas.

Tabela 5: Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* (**RED e SA**) durante **20 h** de crescimento agitado em 50 mL meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e **10% (p/v) de Sacarose** para utilização como inóculo.

Linhagem	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (%)
RED	13,80	99,50	4	0
SA	12,80	99,80	4	0
VIN 13	12,40	98,90	4	0
PE	12,80	99,20	4	0

Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

4.4.1. Estudos realizados utilizando sacarose 22% (p/v)

Inicialmente foram realizados experimentos em batelada simples (fermentação descontínua) em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de

extrato de levedo e 22% (p/v) de sacarose, que é aproximadamente a quantidade de açúcar utilizado nos mostos industriais em usinas produtoras de etanol.

Para que os experimentos fossem realizados, inicialmente foi produzida grande quantidade de células conforme descrito. As células foram produzidas em 50 mL de meio para posterior utilização em 25 mL de meio, conseguindo assim, obter concentração maior de células. As células foram centrifugadas e lavadas três vezes com água gelada estéril e inoculadas para se avaliar a resposta frente às condições de cultivo utilizado, em experimentos realizados com e sem agitação.

As figuras 27, 28, 29 e 30 mostram a variação de biomassa, viabilidade celular, pH e o consumo de açúcar pelas linhagens RED e SA durante a fermentação de sacarose 22% (p/v), em dois ciclos sucessivos, em cultivos com e sem agitação. Nos cultivos agitados, observou-se o consumo eficiente da fonte de carbono nos dois ciclos fermentativos, com a manutenção da viabilidade celular, havendo uma pequena queda na viabilidade da linhagem SA no segundo ciclo fermentativo, possivelmente decorrente da ação da concentração da fonte de carbono e do etanol produzido pelas células (figuras 27 e 28). Os resultados mostraram ainda que para ambas as linhagens, no primeiro ciclo de fermentação houve produção de biomassa em torno de 12,5 mg/mL. Já no segundo ciclo de fermentação, a linhagem RED produziu 9 mg/mL de células enquanto que a linhagem SA produziu 11 mg/mL. A menor produção de biomassa no segundo ciclo de fermentação da linhagem RED resultou em consumo inicial mais lento da fonte de carbono

Já para os experimentos realizados sem agitação (figuras 29 e 30), foi possível observar que houve a manutenção da viabilidade celular, porém com consumo ineficiente da fonte de carbono para as duas linhagens utilizadas. No primeiro ciclo de fermentação houve produção de 7 mg/mL de biomassa pela linhagem RED, enquanto que a linhagem SA produziu 9 mg/mL. Já no segundo ciclo de fermentação foi observado aumento na produção de biomassa pela linhagem RED, que foi de 8,5 mg/mL, enquanto que na linhagem SA observou-se menor produção de biomassa, ou seja, 5,5 mg/mL. Os resultados mostram ainda que a agitação exerce forte impacto no processo fermentativo com conseqüente açúcar residual.

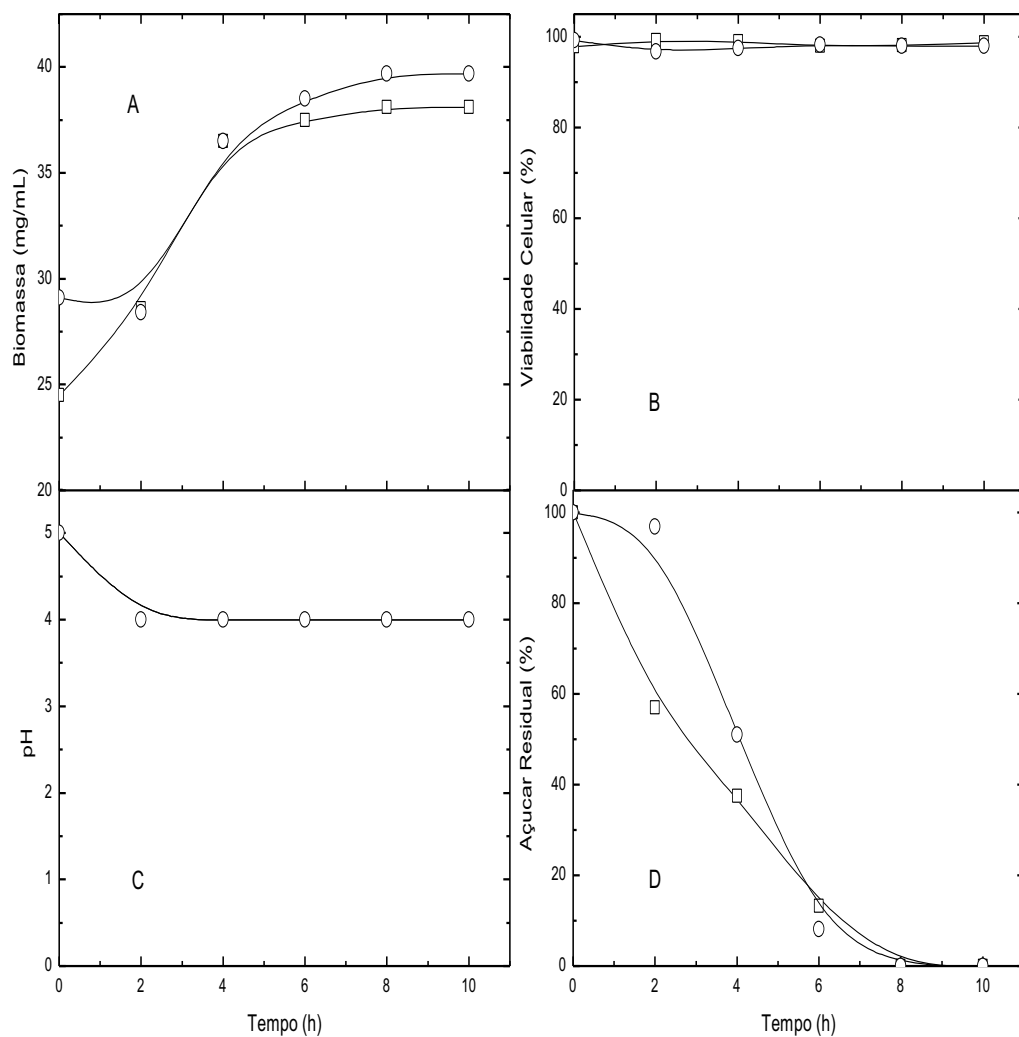


Figura 27: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* RED 1º Ciclo (□) e RED 2º Ciclo (○) durante 10 h de crescimento agitado em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

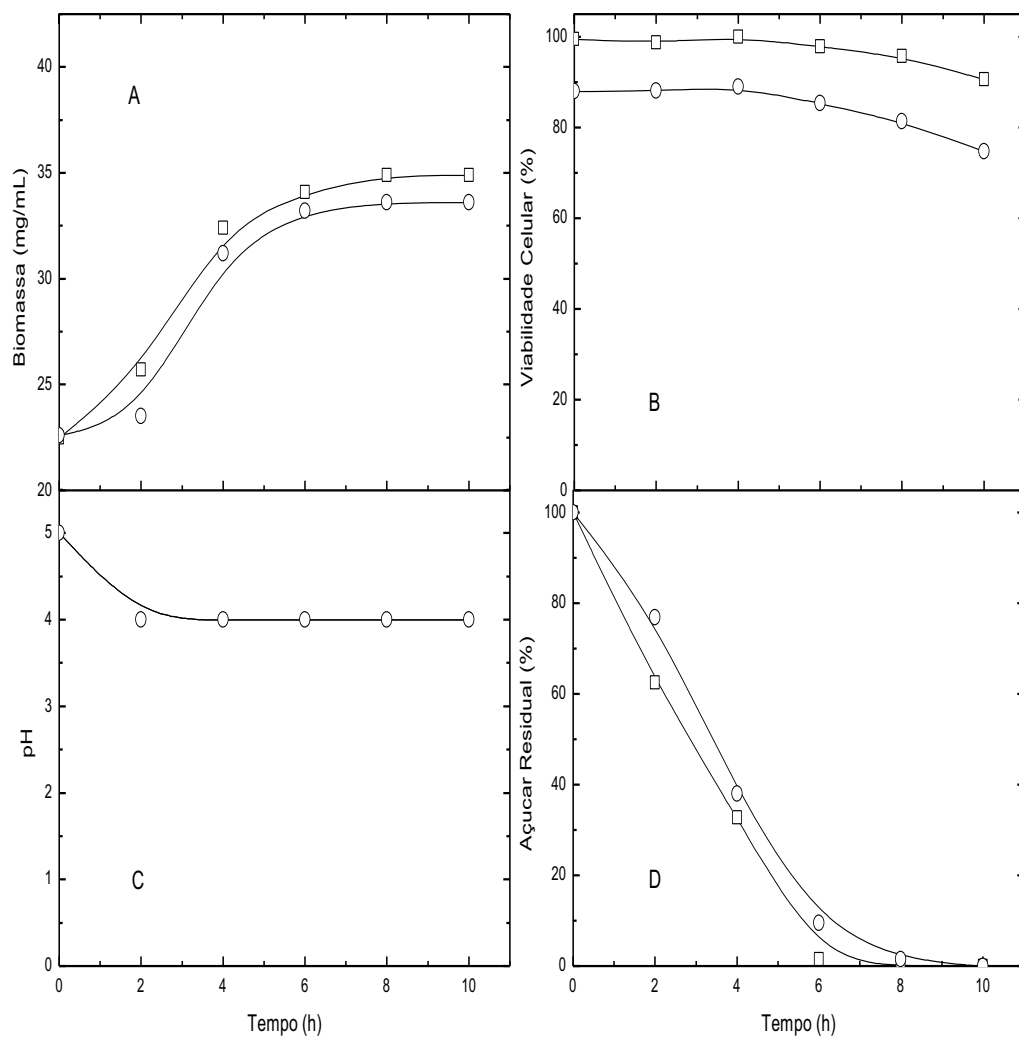


Figura 28: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* SA 1º Ciclo (□) e SA 2º Ciclo (○) durante 10 h de crescimento agitado em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

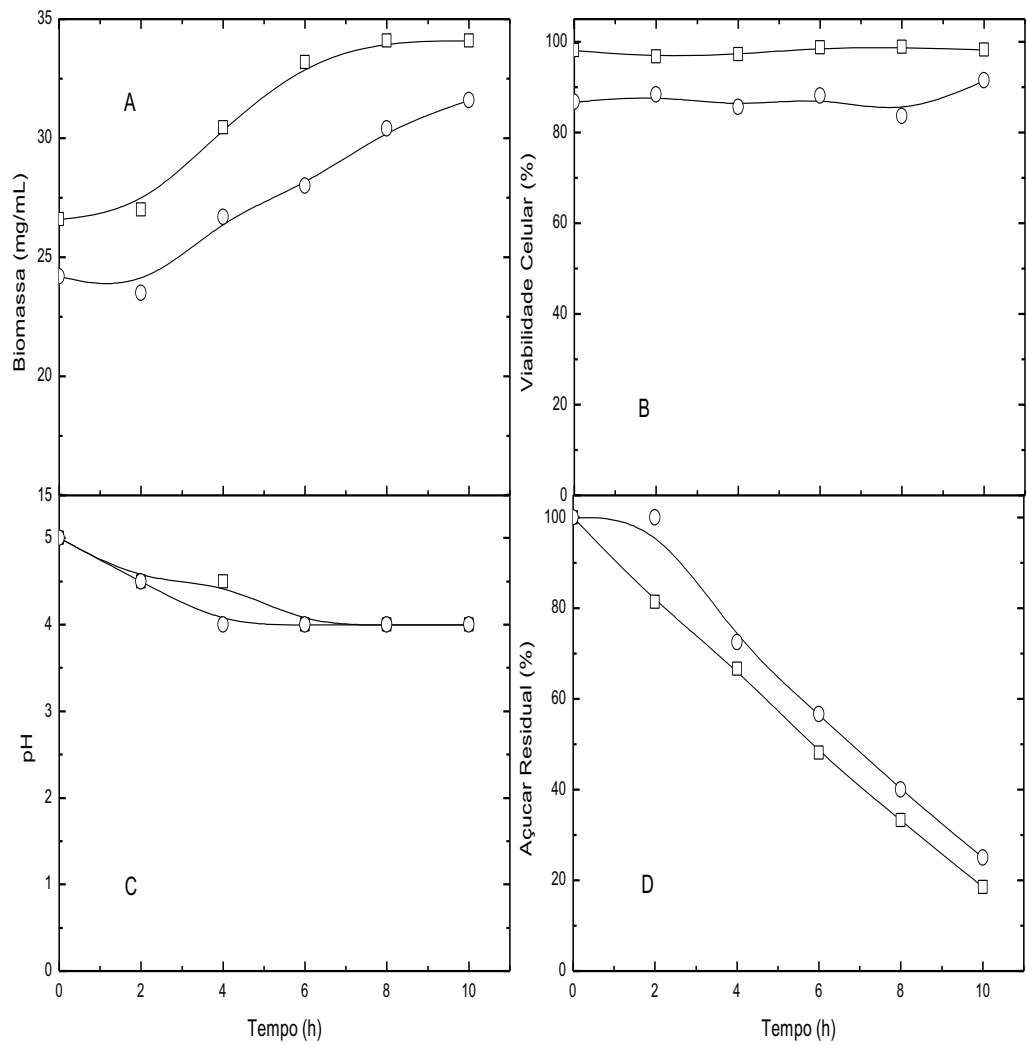


Figura 29: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* RED 1º Ciclo (□) e RED 2º Ciclo (○) durante 10 h de crescimento em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30° C e pH inicial 5,0.

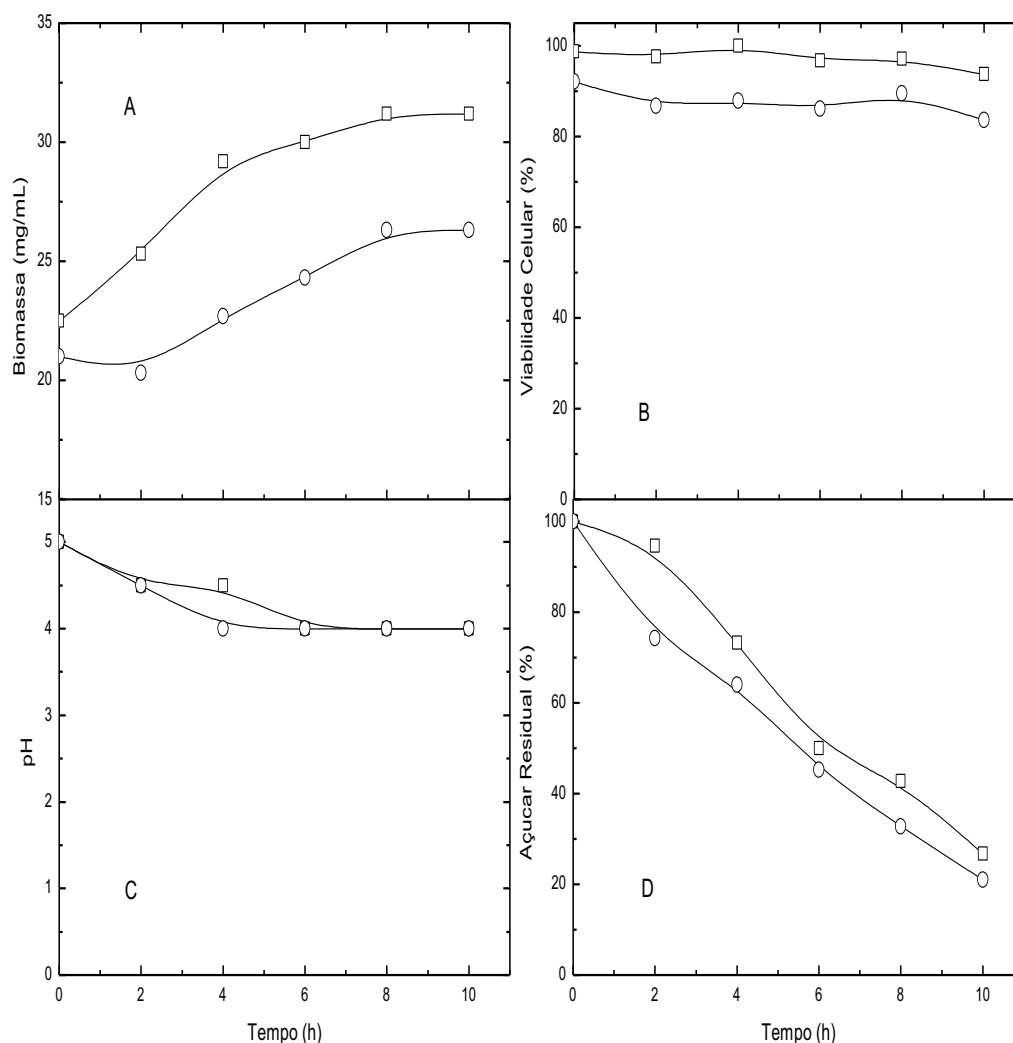


Figura 30: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* SA 1º Ciclo (□) e SA 2º Ciclo (○) durante 10 h de crescimento em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 22% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30° C e pH inicial 5,0.

4.4.2. Estudos realizados utilizando sacarose 25% (p/v)

Após a realização dos experimentos em meio contendo 22% (p/v) de sacarose, a concentração do açúcar foi aumentada para avaliar a resposta das linhagens frente a condições de açúcar mais elevada, para isso, foram realizados

experimentos em meio contendo sacarose 25% (p/v), 1% (p/v) de peptona e 1% (p/v) de extrato de levedo.

Para que os experimentos fossem realizados, inicialmente foi produzido o inóculo conforme descrito e foram utilizadas em experimento com e sem agitação.

Da mesma maneira que nos experimentos realizados com sacarose 22% (p/v), quando os experimentos foram realizados com agitação (figuras 31 e 32), observou-se o consumo eficiente da fonte de carbono pelas linhagens RED e SA nos três ciclos aos quais as células foram submetidas, com a manutenção da viabilidade celular da linhagem RED e havendo uma queda na viabilidade celular da linhagem SA a cada ciclo de fermentação. No primeiro ciclo de fermentação da linhagem RED houve produção de 7,5 mg/mL de biomassa, no segundo ciclo foi produzido 11 mg/mL e no terceiro 10 mg/mL. No cultivo da linhagem SA houve maior produção de biomassa quando comparado com a linhagem RED, uma vez que no primeiro ciclo foi produzido 11 mg/mL, no segundo 10 mg/mL e no terceiro 14,5 mg/mL, com isso, foi possível observar que a linhagem SA fermentou mais eficientemente quando comparada com a linhagem RED mesmo havendo perda da viabilidade a cada ciclo de fermentação.

Quando os experimentos foram realizados sem agitação (figuras 33 e 34), foi possível observar que a biomassa produzida foi maior no primeiro ciclo de fermentação, sendo menor no segundo e ainda menor no terceiro tendo como consequência o crescente açúcar residual após cada ciclo fermentativo para ambas as linhagens utilizadas. No caso da linhagem RED foi observada produção de 8 mg/mL de biomassa no primeiro ciclo, enquanto que no segundo ciclo foi produzido 7,5 mg/mL e no terceiro 5 mg/mL. A linhagem SA também produziu biomassa semelhante aos ciclos realizados com a linhagem RED, sendo produzido 8,5 mg/mL de células no primeiro ciclo, 6,5 mg/mL no segundo e no terceiro 6 mg/mL.

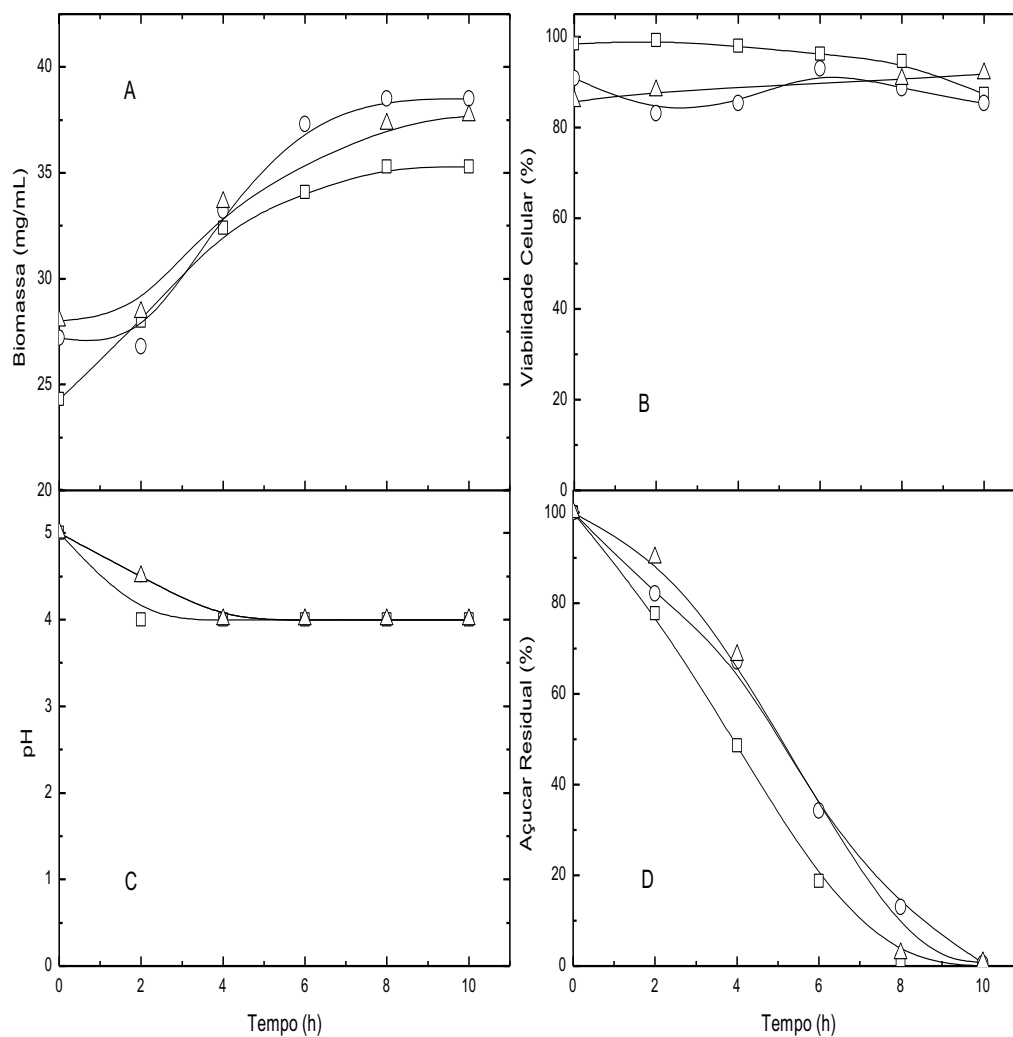


Figura 31: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* RED 1º Ciclo (□), RED 2º Ciclo (○) e RED 3º Ciclo (△) durante 10 h de crescimento agitado em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 25% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

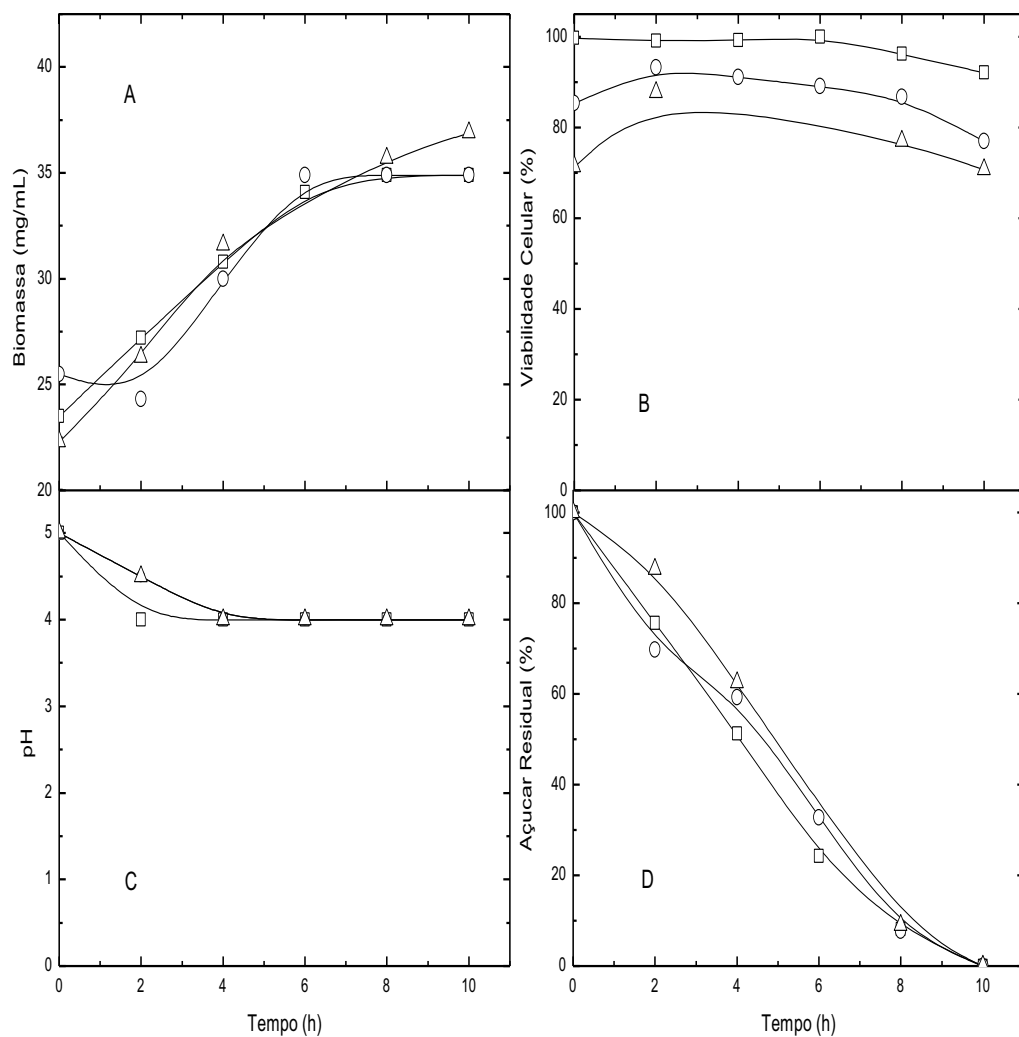


Figura 32: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* SA 1º Ciclo (□), SA 2º Ciclo (○) e SA 3º Ciclo (△) durante 10 h de crescimento agitado em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 25% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0.

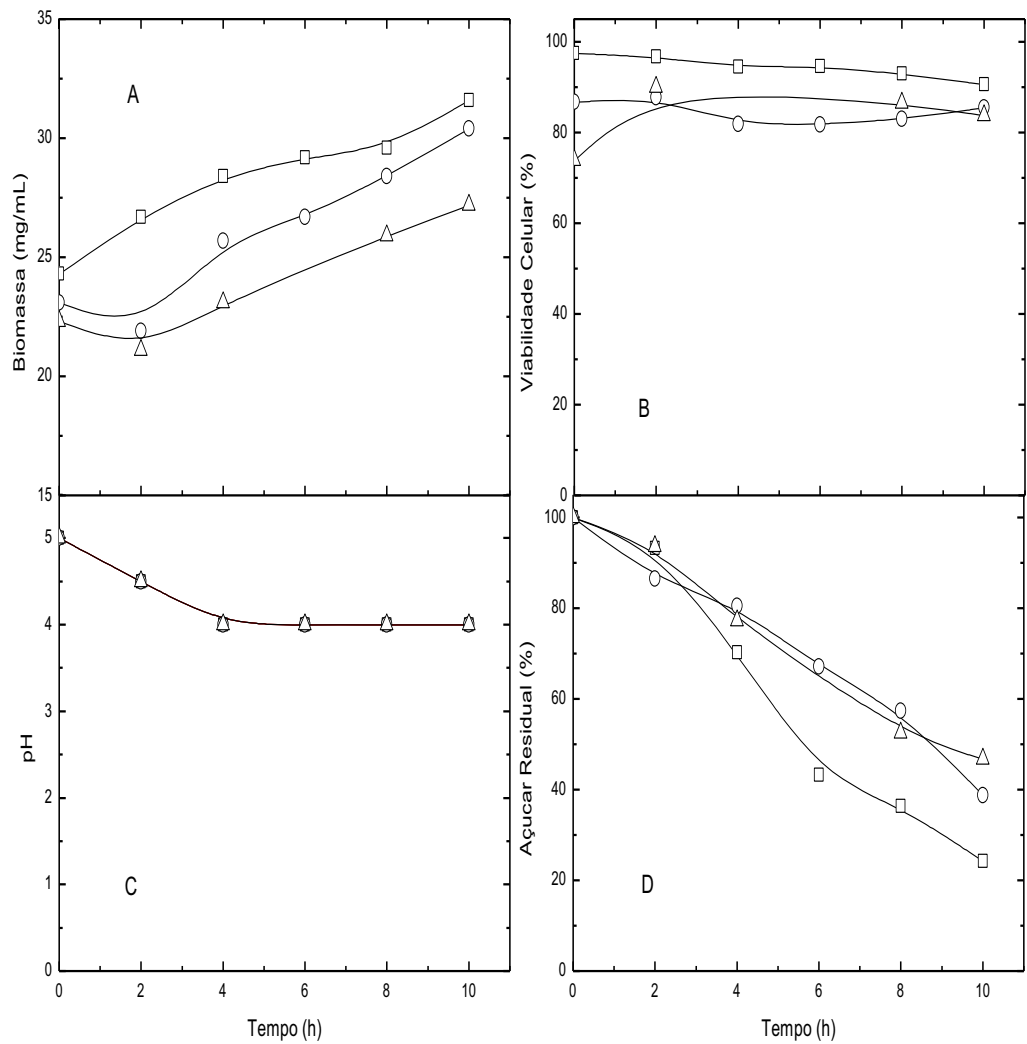


Figura 33: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* RED 1º Ciclo (□), RED 2º Ciclo (○) e RED 3º Ciclo (△) durante 10 h de crescimento em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 25% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30° C e pH inicial 5,0.

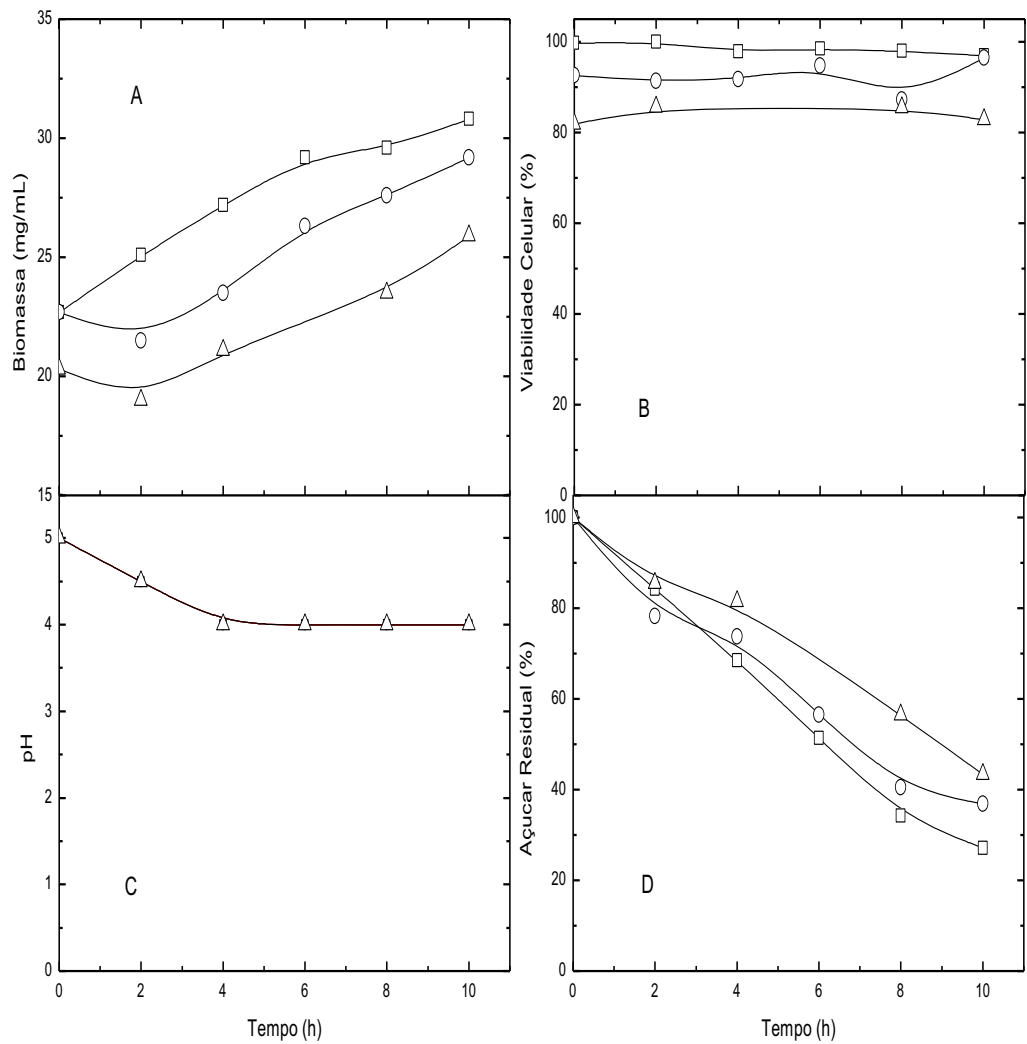


Figura 34: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B), pH (C) e consumo de açúcar (D) por *S. cerevisiae* SA 1º Ciclo (□), SA 2º Ciclo (○) e SA 3º Ciclo (△) durante 10 h de crescimento em 25 mL de meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 25% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 30° C e pH inicial 5,0.

4.4.3. Estudos realizados utilizando meio contendo sacarose 30% (p/v)

Estudos também foram realizados em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e sacarose na concentração de 30% (p/v), a 28°C. Com base nos estudos realizados em meio contendo 22 e 25 % (p/v) de sacarose, optou-se pelo cultivo agitado. Para minimizar o efeito osmótico exercido pela fonte de carbono, optou-se por realizar experimentos em batelada alimentada. Da mesma maneira que o estudo anterior, inicialmente procedeu-se com a produção de células para serem utilizadas como inóculo nos experimentos com alta densidade celular.

Na tabela 6 estão os resultados obtidos nas novas condições e mostram, nos dois ciclos iniciais, para as linhagens RED e SA (tabela 6) que houve a manutenção da viabilidade celular, porém com considerável quantidade açúcar residual, principalmente a partir do no segundo ciclo fermentativo. Por isso, foi realizada a alteração na adição do meio de cultura, dos tempos de 2 e 5 horas para 3 e 6 horas nos ciclos 3 e 4, na tentativa de aumentar o consumo de açúcar. Os resultados obtidos após a alteração dos tempos de adição do meio mostraram o aumento do açúcar residual.

Tabela 6: Produção de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar por *S. cerevisiae* (RED e SA) após 10 h de crescimento agitado cultivada em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose.

Linhagem	Ciclo Fermentativo	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (% p/v)
RED	1º Ciclo	32,40	97,40	4	16,12
	2º Ciclo	32,00	92,50	4	25,30
	3º Ciclo	30,80	86,80	4	48,90
	4º Ciclo	30,45	88,30	4	33,50
SA	1º Ciclo	32,40	98,50	4	17,16
	2º Ciclo	30,80	86,60	4	31,70
	3º Ciclo	30,40	77,60	4	44,60
	4º Ciclo	28,40	82,70	4	37,70

Condições de cultivo: 28° C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Tempos da adição de 8,33 mL de meio de cultivo: 0, 2 e 5 horas para o 1º e 2º ciclo e 0, 3 e 6 horas para o 3º e 4º ciclo.

Como a fermentação foi incompleta com considerável quantidade de açúcar não fermentada (tabela 6), onde cada ciclo fermentativo foi realizado por 10 horas, optou-se por diminuir o volume de meio em cada adição de 8,33 mL para 5,00 mL, nos tempos de 1, 4, 6 e 9 horas, e aumentado o tempo de fermentação para 13

horas, na tentativa de aumentar o consumo da fonte de carbono. Para isso, o inóculo foi produzido como descrito, e além das linhagens RED e SA, utilizou-se a linhagem VIN 13, utilizada nas indústrias vinícolas.

A figura 35 mostra o perfil fermentativo da linhagem RED quando foi submetida a três ciclos fermentativos (figura 35 e tabela 7), onde foi possível observar desempenho semelhante entre as três linhagens, com a manutenção da viabilidade celular nos três ciclos, mas ainda com elevados níveis de açúcar residual, decorrente da fermentação ineficiente devido, talvez, da necessidade de maior tempo de fermentação.

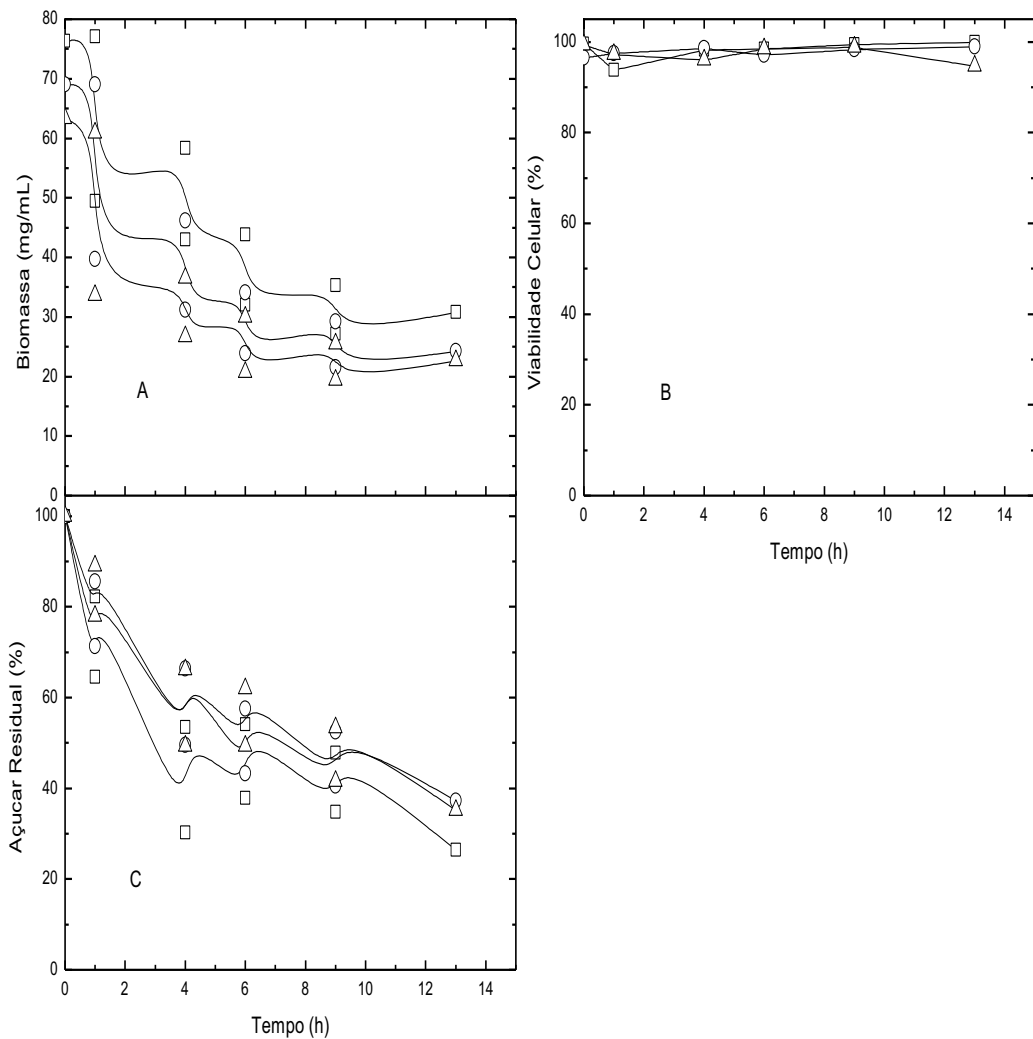


Figura 35: Produção de biomassa (A), viabilidade celular (B) e consumo de açúcar (C) por *S. cerevisiae* RED 1º Ciclo (□), RED 2º Ciclo (○) e RED 3º Ciclo (△) durante 13 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose. Condições de cultivo: 28° C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Tempos da adição de 5,0 mL de meio de cultivo: 0, 1, 4, 6 e 9 horas.

Tabela 7: Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* SA e VIN 13 durante 13 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose.

Linagem	Ciclo Fermentativo	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (% p/v)
RED	1º Ciclo	30,80	100,00	4	26,40
	2º Ciclo	24,30	99,00	4	37,33
	3º Ciclo	22,70	94,70	4	35,20
SA	1º Ciclo	25,90	100,00	4	27,33
	2º Ciclo	21,10	95,90	4	33,46
	3º Ciclo	20,30	89,80	4	37,73
VIN 13	1º Ciclo	26,30	94,40	4	26,66
	2º Ciclo	21,90	91,50	4	36,66
	3º Ciclo	21,90	92,60	4	31,20

Condições de cultivo: 28° C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Tempos da adição de 5,0 mL de meio de cultivo: 0, 1, 4, 6 e 9 horas.

Em consequência aos resultados da tabela 7, que mostram considerável quantidade de açúcar remanescente e ainda com alta viabilidade celular, optou-se por aumentar o período do ciclo fermentativo de 13 horas para 18 horas, mantendo-se as condições de cultivo do experimento anterior.

Os resultados obtidos mostraram que o aumento do tempo do ciclo fermentativo favoreceu na utilização da fonte de carbono nos dois ciclos aos quais as linhagens foram submetidas (tabela 8), onde o consumo foi mais eficiente no primeiro ciclo e menos eficiente no segundo, talvez em decorrência da perda da viabilidade celular no segundo ciclo, causado por estresses fermentativos como o do efeito tóxico exercido pelo etanol produzido. As linhagens RED, SA e VIN 13 comportaram-se de maneira semelhante quanto ao consumo da fonte de carbono, porém havendo maior perda da viabilidade celular para a VIN 13.

Tabela 8: Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* **RED, SA e VIN 13** durante **18 h** de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e **30% (p/v) de Sacarose**.

Linagem	Ciclo Fermentativo	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (% p/v)
RED	1º Ciclo	27,20	94,00	4	9,06
	2º Ciclo	24,30	90,00	4	19,06
SA	1º Ciclo	24,30	96,10	4	13,86
	2º Ciclo	22,30	83,10	4	23,46
VIN 13	1º Ciclo	23,90	85,30	4	10,40
	2º Ciclo	24,30	76,60	4	16,13

Condições de cultivo: 28° C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Tempos da adição de 5,0 mL de meio de cultivo: 0, 1, 4, 6 e 9 horas.

Experimentos também foram realizados na temperatura de 32° C, na tentativa de que o consumo de açúcar ocorresse mais rapidamente. A tabela 9 mostra os dados obtidos em cultivos realizados a 32°C e se observa que o aumento na temperatura dos experimentos não resultou em melhor eficiência no processo. A linhagem RED (tabela 9) manteve a viabilidade elevada nos três ciclos fermentativos, enquanto que na linhagem SA houve pequena variação da viabilidade celular, e a maior perda foi para a VIN 13. Observa-se queda no desempenho fermentativo com os ciclos, com o aumento da quantidade de açúcares remanescentes no meio de cultura e produção de etanol muito aquém do esperado.

Tabela 9: Produção de biomassa (A) e viabilidade celular (B) de *S. cerevisiae* **RED, SA e VIN 13** durante **13 h** de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e **30% (p/v) de Sacarose**.

Linagem	Ciclo Fermentativo	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (% p/v)	Etanol (% v/v)
RED	1º Ciclo	28,00	94,10	4	19,36	13,18
	2º Ciclo	21,50	95,60	4	33,00	11,53
	3º Ciclo	18,20	93,10	4	39,16	10,00
SA	1º Ciclo	23,50	93,30	4	25,52	12,44
	2º Ciclo	17,40	89,00	4	43,12	9,90
	3º Ciclo	18,20	88,10	4	35,64	9,54
VIN 13	1º Ciclo	21,90	68,00	4	29,92	11,59
	2º Ciclo	17,70	78,10	4	43,12	9,41
	3º Ciclo	18,60	72,50	4	39,60	9,17

Condições de cultivo: 32° C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Tempos da adição de 5,0 mL de meio de cultivo: 0, 1, 4, 6 e 9 horas.

Em consequência dos resultados mostrados na tabela 9, decidiu-se pela temperatura de 28°C, alteração nos tempos de pulsos de sacarose para 0, 2, 5, 8 e 12 horas, e aumento no tempo do ciclo de fermentação de 18h para 21 h

Os resultados mostram que a diminuição da temperatura de cultivo propicia melhores condições de fermentação, com maior consumo de sacarose e produção de etanol (tabela 10). A linhagem RED foi a que apresentou melhor desempenho, preservando a viabilidade celular e produzindo etanol acima de 16% (v/v), o que sugere ser possível a fermentação de mostos concentrados, desde que encontradas as condições adequadas de cultivo.

Tabela 10: Produção de biomassa, e viabilidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol por *S. cerevisiae* RED, SA e VIN 13 durante 21 h de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em meio contendo 1% (p/v) de peptona, 1% (p/v) de extrato de levedo e 30% (p/v) de Sacarose.

Linhagem	Ciclo Fermentativo	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade Celular (%)	pH	Açúcar Residual (% p/v)	Etanol (% v/v)
RED	1º Ciclo	29,60	96,30	4	4,40	16,33
	2º Ciclo	21,60	95,00	4	16,28	14,18
	3º Ciclo	19,40	94,60	4	21,56	13,69
SA	1º Ciclo	23,50	86,80	4	9,73	14,09
	2º Ciclo	19,00	85,20	4	21,12	13,67
	3º Ciclo	18,20	86,80	4	23,76	13,24
VIN 13	1º Ciclo	23,50	60,70	4	14,53	14,06
	2º Ciclo	21,90	70,00	4	21,56	13,31
	3º Ciclo	23,10	76,80	4	22,88	13,02

Condições de cultivo: 28° C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Tempos da adição de 5,0 mL de meio de cultivo: 0, 2, 5, 8 e 12 horas.

4.4.4. Estudos realizados utilizando mosto industrial contendo sacarose 30% (p/v)

Os resultados apresentados nos estudos realizados com diferentes formas de cultivo e com diferentes constituintes no meio de cultura mostraram que essas diferenças interferem diretamente no processo fermentativo, na produção da biomassa, manutenção da viabilidade celular, consumo da fonte de carbono e consequente redução dos níveis de produção de etanol. Para contornar tais problemas e avaliar de maneira mais efetiva as respostas das linhagens de leveduras frente às condições nas quais elas não são submetidas, onde há elevada concentração de açúcar para produção de etanol, estudos foram realizados com a utilização de mosto industrial com 20° Brix tendo como base o caldo de cana

clarificado acrescido de melaço e água, que foi cedido pela Usina Santa Fé, Nova Europa-SP. Para que os estudos fossem realizados, procedeu-se como o item 3.2.3.3, onde inicialmente foi determinada a concentração de açúcar e foi acrescida sacarose comercial com o objetivo de se obter mosto com concentração de 30% (p/v) de sacarose.

Inicialmente foi produzido o inóculo como descrito. Os experimentos foram conduzidos adicionando-se 5,0 mL de mosto acrescido de sacarose com pulso nos tempos de 0, 2, 4, 7 e 10 horas e com fermentação com tempo total de 15 horas.

Os resultados obtidos mostraram, para a linhagem RED (tabela 11) que houve grande perda da viabilidade celular já no primeiro ciclo de fermentação, sendo ainda maior no segundo ciclo, o que acabou interferindo no consumo da fonte de carbono, que no segundo ciclo contou com açúcar residual em torno de 70% (p/v). Já no experimento realizado com a linhagem SA (figura 37) observou-se que também houve açúcar residual nos dois ciclos fermentativos, porém, quando comparada com a linhagem RED, desempenhou-se de maneira mais eficiente no segundo ciclo de fermentação, com açúcar residual em torno de 40% (p/v). O melhor resultado observado com a linhagem SA foi possível em decorrência da manutenção da viabilidade celular (acima de 90% de células viáveis). Para os experimentos realizados com a linhagem PE (tabela 11), observou-se que a linhagem se comportou de maneira semelhante a linhagem SA, com açúcar residual em torno de 40% (p/v) no segundo ciclo fermentativo e mantendo a viabilidade celular em torno de 80%, com a diferença de que iniciou a fermentação com viabilidade próxima a 90%, mostrando que não houve grande variação.

Como resultados anteriores mostraram que mostos industriais suplementados com peptona exerce forte impacto no processo fermentativo de sacarose, em cultivos com baixa densidade celular (BETITE, 2011), e considerando a baixa performance das linhagens em cultivos não suplementados, foram realizados experimentos suplementados com peptona.

Os resultados obtidos no cultivo da linhagem RED (tabela 11) mostraram que a suplementação nitrogenada melhorou a eficiência na fermentação, principalmente no segundo ciclo fermentativo, onde foi possível observar açúcar residual em torno de 45% (p/v), que quando cultivada sem suplementação apresentava-se em torno de 70% (p/v). Os resultados obtidos com a linhagem SA (tabela 11) também mostraram

melhora na fermentação com consumo da fonte de carbono nos dois ciclos fermentativos com a manutenção da viabilidade celular. Para a linhagem PE (tabela 11) também se observou melhora nas fermentações com a manutenção da viabilidade celular e redução no açúcar residual quando comparado com os experimentos não suplementados.

Os resultados utilizando-se mosto com concentração de 30% (p/v) de sacarose mostraram que a suplementação do meio de cultura com a peptona aumenta a eficiência da fermentação com redução do açúcar residual. Em decorrências desses resultados, foram realizados experimentos aumentando-se a concentração da fonte nitrogenada para 2% (p/v) de peptona.

Optou-se por utilizar somente as linhagens SA e PE, por serem comumente utilizadas na produção de etanol no Brasil.

Os resultados obtidos mostraram, para a linhagem SA (tabela 11) que houve melhora na fermentação quando comparada com os experimentos suplementados com 1% (p/v) de peptona, com a manutenção da viabilidade celular nos dois ciclos fermentativos e consumo eficiente da fonte de carbono, observando-se principalmente que quase todo o açúcar foi consumido no primeiro ciclo de fermentação. Os resultados obtidos nos cultivos realizados utilizando a linhagem PE (tabela 11) foram ainda melhores, com a manutenção da viabilidade celular e consumo total da fonte de carbono no primeiro ciclo de fermentação, mostrando que essa linhagem é altamente tolerante ao estresse osmótico, produzindo biomassa e fermentando eficientemente (PEREIRA et al., 2011).

Para as duas linhagens foi observado que no segundo ciclo de fermentação houve aumento no açúcar residual.

A manutenção da viabilidade celular durante a fermentação é uma característica que as linhagens de leveduras devem ter para a realização de ciclos fermentativos, para que seja possível a produção de altos níveis de etanol em Fermentação de Mosto com Altos Teores de Açúcares Fermentescíveis, com a realização de ciclos repetidos com o reciclo de células (PEREIRA et al., 2011). Para isso, o sistema requer linhagens robustas capazes de converter eficientemente açúcar em etanol rapidamente e que possuam alta tolerância a estresse osmótico, ao etanol e a outros inibidores (PEREIRA et al., 2011), além da suplementação nutricional dos meios de cultura.

Tabela 11: Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar por *S. cerevisiae* **RED, SA e PE** durante **15 h** de crescimento agitado cultivado em batelada alimentada por pulso em mosto contendo **30% (p/v)** de Sacarose sem suplementação, suplementado com 1 ou 2% (p/v) de peptona. Condições de cultivo: 30° C, 200 rpm e pH inicial 5,0. Tempos da adição de 5,0 mL de meio de cultivo: 0, 2, 4, 7 e 10 horas.

Linhagem	Ciclo (h)	Sem suplementação			Peptona 1% (p/v)			Peptona 2% (p/v)		
		Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar residual (%)
RED	1	21,60	71,00	30,40	22,30	79,70	26,5	-	-	-
	2	17,80	57,40	70,80	17,80	61,70	43,70	-	-	-
SA	1	24,10	95,80	26,00	23,50	95,00	17,20	27,60	100,00	4,50
	2	19,00	91,50	39,00	19,00	91,60	22,90	24,70	96,00	16,90
PE	1	24,10	79,60	31,70	26,30	86,70	20,60	33,60	91,60	0,00
	2	21,50	73,60	38,80	21,10	85,50	30,20	29,60	92,60	15,70

Conclusões

5. CONCLUSÕES

O álcool produzido no Brasil é obtido, em sua maior parte, por fermentação de açúcares contidos no mosto de cana-de-açúcar, e as principais características do processo são alta densidade celular, curto tempo de processo e reciclo das leveduras. O atual programa de produção de etanol combustível no Brasil apresenta vários gargalos tecnológicos, e entre eles destacam-se as contaminações do processo por microrganismos indesejáveis e o baixo rendimento alcoólico, devido à fermentação com baixos teores de açúcar. Estes fatores associados, incluindo o fato do processo ocorrer acima da temperatura ideal, resultam em um processo pouco eficiente, gerando grandes volumes de vinhaça (10-15 litros/litro de álcool), que se torna um dos principais resíduos da agroindústria canavieira, além de introduzir no processo industrial grande consumo de energia na destilação. Como o volume de vinhaça gerado está associado ao baixo teor alcoólico, uma forma de minimizar este problema seria a introdução de práticas industriais com a produção de mostos de alto teor alcoólico, que poderiam ser obtidos através da fermentação de mostos mais concentrados em açúcares totais via Tecnologia de Fermentação de Mostos com Altos Teores de Açúcares Fermentecíveis.

Neste contexto, um dos objetivos foi o estudo visando a obtenção de informações relativas às características fisiológicas das linhagens de leveduras industriais utilizadas na produção de etanol combustível em destilarias brasileira com relação as suas demandas por fontes de nitrogênio, em meios contendo sacarose, maltose ou glicose como fonte de carbono, e fontes nitrogenadas com diferentes complexidades estruturais. Um outro aspecto explorado neste trabalho foi a avaliação da possibilidade de emprego das leveduras industriais em processos de fermentação alcoólica de mostos com altos teores de açúcares.

5.1. Estudos realizados com sacarose em meios suplementados com fontes de nitrogênio com diferentes naturezas estruturais

Os estudos com sacarose mostraram que as linhagens industriais apresentam diferentes perfis de crescimento nos meios suplementados com diferentes fontes de nitrogênio. A produção de biomassa pode ter reflexo no perfil de consumo de açúcar,

como foi o caso das linhagens RED e CAT, no cultivo com agitação. As linhagens BG e SA mostraram comportamento diferente, e apesar de crescerem diferentemente nas fontes de nitrogênio, apresentaram consumo da fonte de açúcar, indicando não ocorrer a correlação intensa de crescimento/consumo de açúcar. No geral foi a suplementação com peptona que propiciou maior produção de biomassa e manutenção da viabilidade celular, isto quando se analisa o cultivo agitado. No cultivo não agitado, como esperado, a produção de biomassa é menor, e os perfis de crescimento também variam nas diferentes fontes de nitrogênio. Nestas condições somente a linhagem SA é a que apresenta o perfil de utilização de carbono similar nas três fontes nitrogenadas. Também é na suplementação com peptona que se observa maior acúmulo de biomassa e manutenção da viabilidade celular; e ainda, nas outras fontes nitrogenadas a queda da viabilidade celular é maior no cultivo agitado quando comparado com o não agitado.

Em muitas situações a produção de trealose é atribuída a uma maior tolerância das leveduras ao estresse fermentativo. Neste estudo pode-se observar que a produção do dissacarídeo foi sempre maior nos meios suplementados por peptona, que também propiciou melhores condições para a produção de biomassa e manutenção da viabilidade celular. A forma de cultivo, com e sem agitação interfere no desempenho fermentativo das leveduras, uma vez que atua de forma decisiva no maior acúmulo de biomassa, devido a presença de maior quantidade de oxigênio. Os dados também mostram que é no meio não agitado que há maior produção do dissacarídeo. Considerando que é no meio suplementado com peptona que se observa maior acúmulo de biomassa, manutenção da viabilidade celular mais eficiente e também é nesta suplementação que ocorre maior produção de trealose, então podemos sugerir que há, neste caso, uma boa correlação entre o fenômeno de acúmulo do dissacarídeo com o melhor desempenho fermentativo.

A avaliação da resposta das linhagens industriais brasileiras frente ao estresse induzido por etanol foi feita através do cultivo das linhagens em meio rico contendo etanol. Os resultados obtidos mostraram que quando os cultivos foram realizados em meio contendo etanol, os níveis de trealose produzidos foram maiores quando comparados com os níveis de trealose produzidos no meio sem etanol, e a quantidade de trealose produzida variou entre as linhagens, sugerindo que as linhagens diferem na resposta ao efeito induzido pelo etanol, e que este efeito pode

ter um significado importante nos mecanismos de resistência ao estresse fermentativo.

A observação por imagens das células de leveduras antes e após fermentação foi também utilizada para se verificar a morfologia dos microrganismos após a submissão ao processo fermentativo. As figuras mostram as imagens com aumento de quatrocentas vezes das linhagens RED e SA, obtidas antes e após fermentação, em cultivo agitado e não agitado. A análise das figuras e a correlação com as condições de cultivo indicam que em situação de consumo de açúcar eficiente parece não haver modificações significativas antes e após a fermentação. Este é o caso da linhagem SA e da RED na suplementação com peptona e sulfato de amônio. Na suplementação com casaminoácidos detecta-se a presença de células alongadas e outras agregadas, o que pode ser um indicativo de resposta da levedura ao estresse fermentativo.

5.2. Estudos realizados com maltose e glicose em meios suplementados com fontes de nitrogênio com diferentes naturezas estruturais

Os estudos com maltose mostraram que nem todas as linhagens industriais brasileiras fermentam o dissacarídeo. Os resultados obtidos com as linhagens consideradas boas fermentadoras de maltose (RED, SA e PE) indicam que elas apresentam perfis de crescimento diferentes nas fontes de nitrogênio utilizadas. Nos cultivos agitados os suplementos peptona e casaminoácidos propiciaram melhores condições de fermentação, com maior produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e eficiente utilização de maltose, sendo que a linhagem RED desempenho fermentativo satisfatório na suplementação com sulfato de amônio.

Nos cultivos não agitados a produção de biomassa é menor e mais lenta quando comparada com os cultivos com agitação, e a produção de biomassa variou entre as linhagens. Na ausência de agitação são os suplementos peptona e sulfato de amônio que propiciam melhores condições de fermentação. Observa-se que a presença de oxigênio tem um acentuado efeito no desempenho fermentativo das leveduras industriais, e o mais surpreendente é o comportamento da linhagem RED, no meio suplementado com casaminoácidos.

O perfil de variação de produção de trealose também foi diferente entre as linhagens, e foi no cultivo agitado onde se detectou maior produção do dissacarídeo. Pode-se observar que as linhagens brasileiras acumulam mais trealose que a linhagem RED, talvez como reflexo da melhor adequação desta para a fermentação de maltose.

Os resultados com glicose indicam, como esperado, que as linhagens industriais em estudo fermentam eficientemente o monossacarídeo, uma vez que as leveduras são organismos glicofílicos. A peptona foi o suplemento nitrogenado que propiciou melhores condições de fermentação, com maior acúmulo de biomassa e preservação da viabilidade celular, além de eficiente consumo do açúcar. Na suplementação com casaminoácidos e sulfato de amônio, apesar de propiciarem condições favoráveis de fermentação, ocorre considerável perda de viabilidade celular. A presença de oxigênio também se mostrou importante na fermentação da glicose, induzindo maior produção de biomassa e consumo de mais rápido do açúcar, principalmente no meio com peptona.

Os resultados descritos nesta parte da tese são de importância do ponto de vista industrial e biotecnológico, uma vez que indicam que as linhagens industriais de leveduras apresentam demandas diferenciadas com relação a fontes de nitrogênio com graus de complexidade estrutural variados, e também dependem do açúcar. Um ponto importante a ser observado é a capacidade que certas linhagens têm em melhor resistir a determinadas condições estressantes, como pH, temperatura, estresse nutricional, estresse osmótico e etanólico, sugerindo que estudos minuciosos referentes sobre a fisiologia das leveduras podem culminar em maior produção de produtos biotecnológicos, decorrentes da elaboração de processos fermentativos mais adequados às características do micro-organismo.

5.4. Estudos realizados com alta densidade celular

Os estudos com alta densidade celular foram realizados, na sua maioria, com as linhagens RED e SA, e tiveram como objetivo definir condições experimentais para a condução e Fermentação de Mosto com Altos Teores de Açúcares Fermentescíveis, e que pudessem propiciar ao final do processo a completa utilização da sacarose, associada á preservação da viabilidade celular do

microrganismo, para que pudesse ser utilizado em ciclos fermentativos sucessivos. Os vários ensaios exploratórios, visaram sempre a manutenção da viabilidade celular e o consumo máximo de açúcar. Foram realizados experimentos com diferentes concentrações de sacarose (22, 25 e 30% (p/v)), alterando a forma de cultivo (batelada simples e batelada alimentada por pulso) - com e sem agitação, variação de tempo dos pulsos de alimentação, variação da temperatura de fermentação (28, 30 e 32°C), e finalmente experimentos com mosto industrial com alta concentração de sacarose, com e sem complementação nutricional.

Os experimentos iniciais foram com sacarose 22 e 25% (p/v), em cultivo agitado e não agitado, e em dois ciclos fermentativos. Os dados mostram para as linhagens RED e SA completa utilização sacarose, em 8h (22%) e 10h (25%) de fermentação, com a manutenção da viabilidade celular quando os experimentos são agitados. Os cultivos não agitados, além de menor biomassa, não consumiram completamente a sacarose.

Como ocorreu a completa utilização do açúcar nos cultivos com sacarose 22 e 25% (p/v), iniciou-se os experimentos com sacarose 30% (p/v). Nesta concentração foram introduzidas várias modificações nas condições de cultivo, principalmente, no processo de batelada alimentada por pulsos. A cada experimento fazia-se um nova alteração na forma de cultivo, com o objetivo de aprimorar o desempenho fermentativo das linhagens. Estas alterações envolveram a mudança no tempo de adição do pulso de sacarose, das temperaturas de cultivo (28 e 32°C), e também aumentando o tempo de fermentação. Finalmente foram realizados experimentos com mosto industrial, tendo como base caldo de cana, ao qual foi adicionada sacarose sólida para ser ter uma concentração de 30% (p/v), No mosto industrial foi adicionado um suplemento nitrogenado, como forma de melhorar o desempenho fermentativo das leveduras.

Na análise do estudo com alta densidade celular e mostos concentrados se deve levar em consideração um conjunto de fatores que determinam o desempenho fermentativo do micro-organismo. Assim as características fisiológicas no que diz respeito à tolerância osmótica, alcoólica, robustez e vitalidade devem ser consideradas. Todas estas características estão, inexoravelmente, associadas às condições de cultivo, principalmente, as exigências nutricionais das leveduras e suas particularidades por demanda de nitrogênio.

Estudos anteriores foram realizados em nosso laboratório utilizando mosto com concentração aproximada de 22, 30 e 35% (p/v) de sacarose em mosto com base de caldo de cana, com baixa densidade celular, e os dados obtidos mostraram que a suplementação com uma fonte de nitrogênio é necessária para obter uma fermentação eficiente. Os resultados ainda mostraram que a fonte nitrogenada peptona foi a que propiciou melhores condições de fermentação, com produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e consumo da fonte de carbono (BETITE, 2011).

Considerações Finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Sacarose 22%

No geral foi a suplementação com peptona que propiciou maior produção de biomassa e manutenção da viabilidade celular;

No cultivo não agitado, como esperado, a produção de biomassa é menor, e os perfis de crescimento também variam nas diferentes fontes de nitrogênio;

Também é na suplementação com peptona que se observa maior acúmulo de biomassa e manutenção da viabilidade celular; e ainda, nas outras fontes nitrogenadas a queda da viabilidade celular é maior no cultivo agitado quando comparado com o não agitado;

A produção de trealose foi sempre maior nos meios suplementados por peptona, que também propiciou melhores condições para a produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e consumo da fonte de carbono;

A forma de cultivo, com e sem agitação interfere no desempenho fermentativo das leveduras. Os dados também mostram que é no meio não agitado que há maior produção do dissacarídeo;

A avaliação da resposta das linhagens industriais produtoras de etanol frente ao estresse induzido por etanol mostraram que na presença de etanol, os níveis de trealose produzidos foram maiores quando comparados com os níveis de trealose produzidos no meio sem etanol, e a quantidade de trealose produzida variou entre as linhagens;

A análise das figuras e a correlação com as condições de cultivo indicam que em situação de consumo de açúcar eficiente parece não haver modificações significativas antes e após a fermentação. Este é o caso da linhagem RED na suplementação com peptona e sulfato de amônio e SA na suplementação com as três fontes de nitrogênio;

Na suplementação com casaminoácidos detecta-se a presença de células alongadas e outras agregadas, o que pode ser um indicativo de resposta da levedura ao estresse fermentativo.

6.2. Maltose 10%

Os estudos com maltose mostraram que nem todas as linhagens industriais brasileiras fermentam o dissacarídeo;

Nos cultivos agitados os suplementos peptona e casaminoácidos propiciaram melhores condições de fermentação, e a linhagem RED mostrou desempenho fermentativo satisfatório na suplementação com sulfato de amônio;

Na ausência de agitação são os suplementos peptona e sulfato de amônio que propiciam melhores condições de fermentação;

Observa-se que em maiores concentrações de oxigênio há um acentuado efeito no desempenho fermentativo das leveduras industriais, sendo observado o efeito da agitação no cultivo da linhagem RED no meio suplementado com casaminoácidos;

O perfil de produção de trealose também foi diferente entre as linhagens, e foi no cultivo agitado onde se detectou maior produção do dissacarídeo. Pode-se observar que as linhagens brasileiras acumulam mais trealose que a linhagem RED, talvez como reflexo da melhor adequação desta para a fermentação de maltose.

6.3. Glicose 20%

As linhagens industriais fermentam eficientemente o monossacarídeo, uma vez que as leveduras são organismos glicofílicos;

Peptona foi o suplemento nitrogenado que propiciou melhores condições de fermentação, com maior acúmulo de biomassa e preservação da viabilidade celular, além de eficiente consumo do açúcar;

Na suplementação com casaminoácidos e sulfato de amônio, apesar de propiciarem condições favoráveis de fermentação, ocorre considerável perda de viabilidade;

A presença de maiores concentrações de oxigênio também se mostrou importante na fermentação da glicose, induzindo maior produção de biomassa e consumo mais rápido do açúcar.

6.4. Estudos realizados com alta densidade celular

Nos experimentos com sacarose 22 e 25%, agitados, os dados mostram que as linhagens RED e SA utilizam toda a sacarose, com a manutenção da viabilidade celular;

Nos cultivos não agitados, além de menor biomassa, não consumiram completamente a sacarose;

Nos estudos com sacarose 30% foi possível observar que adequações na forma de cultivo, como tempo de adição de meio e alterações no tempo e temperatura de fermentação há possibilidade de produção de concentrações mais elevadas de etanol que a atualmente produzida pelas usinas.

Os resultados utilizando-se mosto industrial com concentração de 30% de sacarose mostraram que a suplementação do meio de cultura com a peptona aumenta a eficiência da fermentação com redução do açúcar residual, sendo mais positivos na suplementação com 2% da fonte nitrogenada.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALDIGUIER, A. S.; ALFENORE, S.; COMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, S.E.; GUILLOUET, S. E.; MOLINA-JOUVE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 26, p. 217-222, Apr. 2004.
- ALFENORE, S.; MOLINA-JOUVE, C.; GUILLOUET, S. E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; BENBADIS, L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 67-72, Aug. 2002.
- ALPER, H.; MOXLEY, J.; NEVOIGT, E.; FINK, G. R.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. **SCIENCE**, v.314, n. 5805, p. 1565- 1568, Dec. 2006.
- AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 434 p.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S. A.; CORDIOLI, M. L. A. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 4, p. 1-11, Feb. 2008.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, Aug. 2008.
- BELTRAN, G.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; ROSÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMON, J. M. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on kinetics and nitrogen consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 996-1002, 2005.
- BETITE, V. **Comportamento fermentativo de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto com diferentes concentrações de sacarose e fontes estruturalmente complexas de nitrogênio**. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M. High gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 639-646, Sept. 1984.
- CRUZ, S. H.; BATISTOTE, M.; ERNANDES, J. R. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 109, n. 4, p. 349-355, 2003.
- CSONKA, L. N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 121-147, Mar. 1989.

D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 322-330, July 1987.

DEVANTIER, R.; PEDERSEN, S.; OLSSON, L. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 622-629, Jan. 2006.

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

ERNANDES, J. R.; WILLIAMS, J. W.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Effect of yeast adaptation to maltose utilization on sugar uptake during the fermentation of brewer's wort. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, p. 67-71, Feb. 1993.

FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 125-145, Sept. 2001.

GANCEDO, C.; FLORES, C. L. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 351-359, Nov. 2004.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2. p. 334-361, June 1998.

GOFFEAU, A.; BARREL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALLIDERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-547, Oct. 1996.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p. 808-810, Feb. 2007.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON, K.; POWER, R. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1190-1196, Oct. 2007.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Molecular biology intelligence unit: yeast stress responses**. New York: Chapman & Hall, 1997. 252 p.

HOLZER, H. Catabolite inactivation in yeast. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 1, p. 178-181, Aug. 1976.

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1331, p. 41-79, Sept. 1997.

IKEGAMAI, T.; YANAGISHITA, H.; KITAMOTO, D.; HARAYA. Accelerated ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* with addition of activated carbon. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1661-1665, Sept. 2000.

IRAQUI, I.; VISSERS, S.; BERNARD, F.; CRAENE, J. O.; BOLES, E.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acid and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the *AGP1* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 2, p. 989-1001, Feb. 1999.

JAUNIAUX, J. C.; GRENSON, M. *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence, protein similarity with the other baker's yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 190, p. 39-44, Jan. 1990.

JONES, A.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very high gravity fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 1048-1051, Mar. 1994.

LARGE, P. J. Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. **Yeast**, v. 2, p. 1-34, May 1986.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, Jan. 1981.

LI, F.; ZHAO, X. Q.; GE, X. M.; BAI, F. W. An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculation yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1079-1086, May 2009.

MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. In: BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; JONES, E. W. **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces***: gene expression. New York: Cold Spring Harbor, 1992. v. 2, cap. 6, p. 283-317.

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, p. 1-18, Mar. 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MIRANDA JUNIOR, M.; BATISTOTE, M.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Sucrose fermentation by brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 3, p. 191-197, 2009.

MIRANDA JUNIOR, M.; BATISTOTE, M.; ERNANDES, J. R. Glucose and fructose fermentation by wine yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 3, p. 199-204, 2008.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; PUEYO, E.; POLO, M. C. Analytical methods of the characterization of proteins and peptides in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 63-75, Nov. 2002.

NEVES, M. J.; TERENCEZI, H. F.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 10, p. 17-19, 1994.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34-50, Mar. 2000.

PARROU, J. L.; FRANÇOIS, J. A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. **Analytical Biochemistry**, v. 248, p. 186-188, Feb. 1997.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strain for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1655-1661, June 2010.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 130-136, May 2011a.

PEREIRA, F. B.; GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 1, p. 45-53, Jan. 2011b.

PETER, G. J.; DURING, L.; AHMED, A. Carbon catabolite repression regulates amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* via the Tor signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 5546-5552, Mar. 2006.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 36-43, Aug. 2006.

SAMPEDRO, J. G.; URIBE, S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 257, p. 319-327, 2004.

SANTOS, M. T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast flocculation by *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 151-154, Nov. 1993.

SCHMIDELL, W. Biorreatores e processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial: Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 2, cap. 8, p. 179-192.

SCHNEPER, L.; DUVEL, K.; BROACH, R. J. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 624-630, Oct. 2004.

STEINER, H. Y.; SONG, W.; ZHANG, L.; NAIDER, F.; BECHER, J. M.; STACEY, G. An arabidopsis peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. **The Plant Cell**, v. 6, p. 1289-1299, Sept. 1994.

TER SCHURE, E. G.; SILLJÉ, H. H. W.; RAEVEN, L. J. R. M.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 1101-1108, 1995.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of particulate materials and osmoprotectants on of very high gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, May 1994.

THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, p. 61-68, May 1992.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Assimilable nitrogen utilization and production of volatile and non-volatile compounds defined medium by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 145-157, Sept. 2007.

XUE, C.; ZHAO, X. Q.; YUAN, W. J.; BAI, F. W. Improving ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by optimization of medium composition. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2257-2261, May 2008.

WILES, A. M.; CAI, H.; NAIDER, F.; BECKER, M. Nutrient regulation of oligopeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 152, p. 3133-3145, 2006.