

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

VIVIA CRISTINA BETITE

**Comportamento fermentativo de linhagens industriais de  
*Saccharomyces cerevisiae* em mosto com diferentes  
concentrações de sacarose e fontes estruturalmente  
complexas de nitrogênio**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química Universidade Estadual Paulista,  
UNESP, como Parte dos requisitos para a  
obtenção do Título Mestre em Biotecnologia.

Araraquara

2011

VIVIA CRISTINA BETITE

**Comportamento fermentativo de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto com diferentes concentrações de sacarose e fontes estruturalmente complexas de nitrogênio.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química Universidade Estadual Paulista, UNESP, como Parte dos requisitos para a obtenção do Título Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ernandes

Araraquara

2011

VIVIA CRISTINA BETITE

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 14 de março de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Roberto Emendes (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof.ª Dr.ª Daniela Alonso Bocchini Martins  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. João Aílrio Jorge  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto

## **Dados Curriculares**

Vivia Cristina Betite

### **1. Dados Pessoais**

Dados pessoais

Nascimento: 17 de Agosto de 1980

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: Itápolis - SP

Estado civil: solteira

Filiação: Antonio Valdir Betite

Claudete Aparecida Botero Betite

Profissão: Bióloga e Farmacêutica

Documento de Identidade: 23.498.685-3

Cadastro de Pessoa Física: 2233009328-22

Endereço: Rua 15 de Novembro, 220

CEP: 14.915-000 – Curupá – Tabatinga - SP

Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni s/n

CEP: 14800-900 – Araraquara-SP

### **2. Formação Acadêmica**

Graduada em Farmácia-Bioquímica na Universidade Paulista, UNIP, concluído em 15 agosto de 2009.

Licenciada em Ciências Biológicas na Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, concluído em 05 de julho de 2004.

### **3. Participação em Cursos**

Controle Microbiológico do Açúcar, ministrado por: Vanessa Moreira Costa, realizado pela Fermentec em Piracicaba- SP, no período de Março a 03 de Abril de 2009, com carga horária de 32 horas.

Análise Microbiológica da Água, ministrado por: Claudio Rosa Gallo realizado pela Fermentec em Piracicaba, SP, no período de 19 a 21 de Janeiro de 2009, com carga horária de 20 horas.

Controle Microbiológico por Microscopia e Plaqueamento – Reciclagem, ministrado por: Dinailson Corrêa de Campos e Osmar Parazzi Junior realizado pela Fermentec em Piracicaba, SP, no período de 26 a 30 de Janeiro de 2009, com carga horária de 40 horas.

Curso à distância de Fermentação, com duração de 01:50 horas em 7 de novembro de 2008 realizado pelo Centro de Tecnologia Canavieira.

II Curso de Monitoramento Teórico e Prático da Fermentação Etanólica, de carga horária de 40 horas, realizado no período de 11 a 15 de fevereiro de 2008, no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.

Controle Microbiológico por Microscopia e Plaqueamento, realizado no período de 16 a 20 de abril de 2007, com carga horária de 40 horas, pela Fermentec em Piracicaba, São Paulo.

Curso de Homeopatia, realizada pelo curso de Farmácia e Bioquímica, com duração de 8 horas, durante a II Jornada de Farmácia e Bioquímica, na Universidade Paulista- UNIP, Campus de Araraquara, no dia 24 de Setembro de 2005.

Administração de Medicamentos Injetáveis, realizado pela Intecq em 27 de outubro de 2005, com carga horária de 8 horas, em São Jose do Rio Preto.

Curso de Informática, ministrado pela Microenter Informática, realizado em Tabatinga, nos períodos de fevereiro a dezembro de 1997.

#### **4. Participação em Encontros**

29ª Reunião Anual-Encontros Fermentec - Desenvolvendo Tecnologias - Consciência Ambiental; módulo: Cana e Açúcar, Fermentação Alcoólica e Controles, realizado no Hotel Fonte Colina Verde, São Pedro SP, no período de 03 a 05 de junho de 2008.

II Jornada de Farmácia e Bioquímica, realizada pelo curso de Farmácia e Bioquímica, na Universidade Paulista-UNIP, Campus de Araraquara, de 19 a 24 de Setembro de 2005.

I Jornada e Bioquímica, realizada entre 9 e 13 de Setembro de 2004, perfazendo 8 horas de palestras, na Universidade Paulista, Campus de Araraquara.

III Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada a Medicina, em Ribeirão Preto-SP, no período de 07 a 08 de junho de 2002.

#### **5. Estágio**

Realização de Estágio de Treinamento na Disciplina Imunologia no Departamento de Ciências Biológicas, no período de 09 de fevereiro a julho de 2004, num total de 800 horas. Contendo a seguinte programação:

- Preparo de materiais utilizados nos experimentos com DNA, RNA e proteínas: lavagem esterilização e acondicionamento.
- Preparo de soluções, géis e meio de cultivo.
- Acompanhamento de algumas metodologias utilizadas no laboratório: mini prep de plasmídios, PCR e outras.

#### **6. Publicação**

FRANZÉ, R.V.; MARQUES, M. O.; MUTTON, M.A.; BETITE, V. C.; RAVANELI, G.C; GIRO, J.F. Análise multivariada na determinação da colheita de cana-de-açúcar sob efeito do glifosato como madurador, Revista **STAB**, 2010.

Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado nosso caminho. Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas apenas vemos entre um passo e outro. A todas elas chamamos de amigos.

Há muito tipos de amigos. Talvez cada folha de uma árvore caracterize um deles. O primeiro que nasce o broto é o amigo Pai e o amigo Mãe. Mostram o que é ter vida. Depois vem o amigo irmão, com quem dividimos o nosso espaço para que ele floresça como nós.

Passamos a conhecer toda a família de folhas, a qual respeitamos e desejamos o bem, mas a vida apresenta outros amigos, os quais não sabíamos que iam cruzar o nosso caminho. Muitos deles são designados amigos do peito, do coração. São sinceros, são verdadeiros. Sabem quando não estamos bem, sabem o que nos faz feliz.

As vezes, um desses amigos do peito estala o nosso coração e então é chamado de amigo namorado. Esse dá brilho aos nossos olhos, música aos nossos lábios, pulos aos nossos pés.

Mas também há aqueles amigos por um tempo, talvez umas férias, ou mesmo um dia ou uma hora, esses costumam colocar muitos sorrisos na nossa face, durante o tempo que estamos por perto.

Falando de perto, não podemos nos esquecer dos amigos distantes, que ficam nas pontas dos galhos, mas que quando o vento sopra aparecem novamente entre uma folha e outra.

O tempo passa, o verão se vai, o outono se aproxima e perdemos algumas de nossas folhas. Algumas nascem num outro verão e outras permanecem por muitas estações, mas o que nos deixa mais feliz é que as que caíram continuam por perto, continuam aumentando a nossa raiz com alegria.

Lembranças de momentos maravilhosos enquanto cruzavam o nosso caminho.

Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito e os que não deixaram nada.

Vocês meus amigos fazem parte da minha árvore, do meu jardim..... do meu mundo.

**Amo muito todos vocês e a quem dedico este trabalho.**

## Eu te agradeço Senhor

Em minha oração Senhor...  
Hoje eu não vou pedir  
Só quero agradecer  
Eu te agradeço por tudo  
Por me aliviar a dor  
E me ajudar a seguir  
E me fazer crescer  
E abrir meus olhos pro mundo  
Por cada dia  
Por cada vez que eu me refaço  
Pelo o aconchego de um abraço  
Uma palavra de carinho  
Por cada sonho, que se tornou realidade  
Por me mostrar cada verdade  
Por está sempre em meu caminho  
Por tanta luz  
Por tanto amor  
Tantas alegrias  
Eu te agradeço Senhor  
Por tanta força  
Por cada passo que eu dou  
Por minha família  
Eu te agradeço Senhor  
Eu te agradeço Senhor

Banda Calypso



## Agradecimentos

O final de uma dissertação é um momento vivenciado por uma avalanche de sentimentos (de um lado alegria, alívio e cansaço; de outro, tristeza, incerteza, expectativa e otimismo) e marcado por um processo de aprendizagem, amadurecimento pessoal, profissional e acadêmico. Em meio a muitas sensações vivenciadas nesta fase está à certeza da conquista de mais um ideal, o qual só foi possível com muita determinação, e perseverança. Também constitui um momento de reconhecimento e, portanto, ficam aqui os meus agradecimentos a muitas pessoas importantes, sem as quais este trabalho não seria concluído.

Os meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. José Roberto Ernandes, pela oportunidade de trabalho, orientação, confiança, pelas valiosas discussões e sugestões, sendo um exemplo de dedicação como educador, especialmente pela amizade. E por ter acreditado e apostado em mim.

Às Profs. Dr. Maria Célia Bertolini e Cecília Laluce por permitirem a utilização dos laboratórios e equipamentos sob suas responsabilidades.

Aos amigos do laboratório Rodrigo, Fernanda Zanolli, Fernanda Cupertino, Henrique e Estela, pela amizade e companheirismo.

À Eliane e a Flávia pelos anos de convivência, pelas conversas, por estarem sempre por perto nas horas alegres e tristes em que sempre precisamos de um ombro amigo. Pelas “conversas sérias” que nos fazem crescer e rever conceitos. Pelas risadas, confiança, pelos ensinamentos e ajuda no laboratório, enfim por serem minhas amigas. Obrigada por vocês estarem presentes na minha vida.

Ao Fernando e ao Tarcísio pela ajuda nas análises e pela amizade.

Ao meu grande amigo Messias Miranda Junior, que me ensinou todas as análises do laboratório, pela sua amizade, dedicação e ensinamento, pelas horas alegres, pelo desabafo. Enfim a esta amizade que sempre será eterna.

À Usina Santa Fé pela doação de mosto e fermento para a realização deste trabalho e pela amizade adquirida nos dois anos de serviço.

Ao pessoal do laboratório da Usina Santa Fé pela amizade e alegrias proporcionadas e pelas conversas.

Aos meus pais Valdir e Claudete, meus irmãos Talita e Junior e minha avó Margarida e avó Anilva por sempre estarem comigo em todas as horas.

Ao meu avô Luiz que foi muito especial para mim e um exemplo para todos nós, que hoje se encontra ao lado de Deus e nos deixou muitas SAUDADES.

Ao meu namorado Sérgio pela dedicação e ajuda nas horas mais difíceis.

À Empresa Química Real e em especial ao Ricardo Ventura pela amizade e pelos ensinamentos.

À todos os funcionários do Instituto de Química.

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

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. **Muito obrigado!**

# Resumo

O etanol combustível produzido no Brasil apresenta alguns problemas tecnológicos que afetam a sua produção em larga escala, entre estes destacamos a contaminação do processo por microrganismos indesejáveis, e a fermentação de mosto com baixa concentração de açúcares. Neste trabalho estudou-se aspectos relacionados com leveduras contaminantes do processo industrial, e o desempenho fermentativo de linhagens industriais utilizadas em mostos concentrados e suplementados com fontes estruturalmente complexas de nitrogênio. Foram utilizados dois meios básicos, um constituído da base nitrogenada YNB, e outro a base de caldo de cana, no qual foi adicionado diferentes concentrações de sacarose. Estes meios foram suplementados com fonte de nitrogênio que variaram de simples sal inorgânico como sulfato de amônio, e preparações comerciais de hidrolizados enzimáticos (peptona) e ácidos de proteínas (casaminoácidos). Três linhagens industriais foram inoculadas em mosto a base de caldo de cana contendo sacarose 22%, 30% e 35% (p/v), e suplementados com fontes de nitrogênio. A 30°C, em cultivos agitados e não agitados, verificou-se que a utilização completa de sacarose só ocorreu no meios suplementados com uma fonte de nitrogênio. No geral a suplementação com peptona foi a que propiciou fermentação mais eficiente, quando comparada com sulfato de amônio, maior acúmulo de biomassa e manutenção da viabilidade celular. Os estudos mostraram que nas condições de cultivo e com inoculação de baixa densidade celular, é necessária a suplementação para completa utilização da sacarose. No meio com sacarose 35% (p/v), atingiu-se um nível de 14 % (v/v) de etanol no cultivo não agitado e suplementado, sugerindo ser possível a obtenção de vinhos com maior quantidade de etanol, desde que encontradas as condições de trabalho que se aproximem do limite da álcool tolerância das leveduras. O meio YNB se mostrou mais adequado para se estudar a demanda de nitrogênio pelas diferentes linhagens industriais. Neste meio também foi observado que a suplementação com peptona é a que propicia fermentações mais eficientes. Os estudos realizados com as linhagens isoladas de dornas de fermentação mostraram, em meio YNB, desempenho inferior quando comparado com as linhagens industriais, entretanto, o desempenho destes isolados em mosto industrial é superior ao observado no meio YNB, indicando que podem causar

prejuízos ao processo de produção de etanol, se presentes em quantidades significativas nas dornas de fermentação.

# Abstrat

The fuel ethanol industry in Brazil has some technological problems that affect its production on a large scale, among those are contamination by undesirable microorganisms, and wine with low ethanol concentration. We study aspects of microbial contamination of industrial processes, and the fermentation performance of industrial strains of concentrated musts supplemented with structurally complex nitrogen sources. We used two basic media, one consisting of a nitrogen base YNB, and another based on sugar cane juice, which was added increasing concentrations of sucrose. These media were supplemented with nitrogen sources varying from simple inorganic salt such as ammonium sulfate, and commercial preparations of enzymatic hydrolysates (peptone) and acidic protein (casaminoacids). Three industrial strains were inoculated into based sugar cane juice containing 22% sucrose, 30% and 35% (w/v) and supplemented with nitrogen sources. At 30°C, in shaken cultures, it was found that the efficient sucrose utilization occurred only in media supplemented with a nitrogen source. In general supplementation with peptone was the one that led to more efficient fermentation compared with ammonium sulfate, with higher biomass accumulation and maintenance of cell viability. Studies have shown that in conditions and with low cell density nitrogen supplementation was required for almost complete sucrose utilization. In sucrose 35% (w/v), it was achieved a level of 14-15% (v/v) ethanol in nitrogen supplemented cultures, suggesting the possibility of producing wines with higher amounts of ethanol in working conditions approaching the limit of yeast alcohol tolerance. The YNB medium was more appropriate to study the demand for nitrogen for different industrial strains. In this medium was also observed that supplementation with peptone induced more efficient fermentation. Studies with isolates from the fermentation vats showed reduced fermentation performance when compared with industrial strains, however the performance of these isolates on industrial must is higher than in YNB medium, indicating that their presence in significant amount may negatively affect ethanol production.

## Lista de Figuras

- Figura 1- Representação das vias de utilização de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae*. 38
- Figura 2 - Plaqueamento das leveduras coletadas na Usina Santa Fé em meio YEPD com corante Rosa Bengala. 44
- Figura 3 - Plaqueamento em meio YEPD das colônias obtidas do plaqueamento em meio YEPD com Rosa Bengala. A figura 3A mostra a cepa SC, colônia com pouco crescimento e a Figura 3B mostra a cepa RG e LS que apresentam colônia rugosa e colônia lisa. 44
- Figura 4 - As fotos acima ilustram as 3 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que foram coletadas na Usina Santa Fé. (A) linhagem RG, apresenta colônia rugosa (células em cachos maiores), (B), linhagem LS apresenta colônia lisa brilhante (células individuais) e (C) linhagem SC apresenta a colônia rugosa (células em cachos menores). As linhagens SC e RG são linhagens com características floculantes. 45
- Figura 5 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante crescimento aeróbico em mosto com 22% de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fontes de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 52
- Figura 6 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT, durante crescimento aeróbico em mosto com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fontes de nitrogênio, com 22% (p/v) de sacarose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 53



- Figura 7 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante crescimento aeróbico em mosto com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fontes de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 54
- Figura 8 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante crescimento anaeróbico em mosto com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio, sulfato de amônio, peptona, sem fontes de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 55
- Figura 9 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT, durante crescimento anaeróbico em mosto com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 56
- Figura 10 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante crescimento anaeróbico em mosto com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 57

- Figura 11- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante crescimento aeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fontes de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 61
- Figura 12- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT, durante crescimento aeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fontes de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 62
- Figura 13- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante crescimento aeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fontes de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 63
- Figura 14 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante crescimento anaeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 64

- Figura 15- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT, durante crescimento anaeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 65
- Figura 16 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante crescimento anaeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 66
- Figura 17 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT, durante crescimento anaeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: casaminoácidos, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. 67
- Figura 18 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT, durante crescimento anaeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: casaminoácidos, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. 68
- Figura 19 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante crescimento anaeróbico em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: casaminoácidos, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0. 69

- Figura 20- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante crescimento aeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 74
- Figura 21- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT durante crescimento aeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 75
- Figura 22- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA durante crescimento aeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 76
- Figura 23- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE durante crescimento aeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2 % (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 77

- Figura 24- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT durante crescimento aeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2 % (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 78
- Figura 25 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA durante crescimento aeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2 % (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona, sem fonte de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 79
- Figura 26- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE durante crescimento anaeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2 % (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 80
- Figura 27 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT durante crescimento anaeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2 % (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 81
- Figura 28- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA durante crescimento anaeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 82

- Figura 29 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* RED durante crescimento anaeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 83
- Figura 30 - Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT e SA, cultivadas sem agitação e com agitação em mosto com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% de fonte de nitrogênio: sem suplementação de nutriente, sulfato de amônio, peptona. O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M. 89
- Figura 31- Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT e SA, cultivadas sem agitação e com agitação em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% de fonte de nitrogênio: sem suplementação de nutriente, sulfato de amônio, peptona. O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M. 90
- Figura 32- Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT e SA, cultivadas sem agitação em mosto com 30% (p/v) de sacarose, contendo 1% de fonte de nitrogênio: sem suplementação de nutriente, casaminoácidos. 91
- Figura 33- Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT, SA, cultivadas com agitação, em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo fontes de nitrogênio: 1% de peptona (A), 2% peptona, 1% de sulfato de amônio, 2% de sulfato de amônio sem suplementação de nutriente. O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M. 91

- Figura 34- Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT, SA cultivadas sem agitação, em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo fontes de nitrogênio: 2% de peptona, 2% de sulfato de amônio. O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M. 93
- Figura 35- Atividade da invertase por *S. cerevisiae* pelas linhagens PE, CAT, SA, cultivadas com agitação e sem agitação, em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo fontes de nitrogênio: 1% de peptona e 2% de peptona ou 1% de sulfato de amônio e 2% de sulfato de amônio. O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M. 97
- Figura 36- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SC, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 5% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 98
- Figura 37- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* RG, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 5% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 100
- Figura 38- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* LS, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 5% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 101

- Figura 39- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 5% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 102
- Figura 40- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SC, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 103
- Figura 41- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* RG, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 104
- Figura 42- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* LS, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 105
- Figura 43- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio, casaminoácidos. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 106



- Figura 44- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio, casaminoácidos. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 107
- Figura 45- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante crescimento aeróbico em meio YNB com 22% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona, sulfato de amônio, casaminoácidos. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio foi reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 110
- Figura 46- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae*, SC, SA, LS, RG, durante crescimento aeróbico em mosto com Brix 17°, sem suplementação de fontes de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0. 111
- Figura 47- Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* LS durante crescimento anaeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2 % (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 114
- Figura 48 - Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* RG durante crescimento anaeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2 % (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio, peptona. Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M. 115

## Lista de Tabelas

Tabela 1-	Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo 22% (p/v) de sacarose sem fontes de nitrogênio, 1% de peptona ou 1% sulfato de amônio.	58
Tabela 2-	Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE, CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo 30% (p/v) de sacarose sem fontes de nitrogênio, 1% de peptona ou 1% de sulfato de amônio.	70
Tabela 3-	Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE, CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo 30% (p/v) de sacarose e 1% de casaminonoácidos.	70
Tabela 4-	Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo 35% (p/v) de sacarose sem fontes de nitrogênio, 1% de peptona ou 2% de peptona.	71
Tabela 5-	Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo 35% (p/v) de sacarose sem fontes de nitrogênio, 1% de Sulfato de amônio ou 2% de Sulfato de amônio.	84
Tabela 6-	Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens, após 65 h de cultivo em mosto contendo 35% (p/v) de sacarose, suplementado com 2% de peptona ou 2% de sulfato de amônio.	85
Tabela 7-	Produção de etanol (v/v) pelas linhagens industriais, após 65 h de cultivo em mosto contendo 30% (p/v) de sacarose, sem fontes de nitrogênio, 1% de peptona ou 1% de sulfato de amônio.	86

Tabela 8-	Produção de etanol (v/v) pelas linhagens, após 65 h de cultivo em mosto contendo 35% (p/v) de sacarose, sem fontes de nitrogênio, 1 e 2% de peptona e sulfato de amônio, crescidas a 30°C com agitação a 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.	86
Tabela 9-	Produção de etanol (v/v) pelas linhagens, após 65 h de cultivo em mosto contendo 35% (p/v) de sacarose, sem fontes de nitrogênio, 2% de peptona ou 2% de sulfato de amônio.	87
Tabela 10-	Efeito da condição de cultivo na perda de etanol causada pela evaporação.	87
Tabela 11-	Atividade da invertase pelas linhagens industriais, após 65 h de cultivo em mosto contendo 35 % (p/v) de sacarose, com 1% e 2% de peptona ou 1% e 2% de sulfato de amônio e com agitação.	95
Tabela 12-	Atividade da invertase pelas linhagens industriais, após 65 h de cultivo em mosto contendo 35 % (p/v) de sacarose, com 2% de peptona ou 2% de sulfato de amônio.	96
Tabela 13-	Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar pelas linhagens, cultivadas em meio YNB contendo 5 % (p/v) de sacarose e 1% de peptona ou 1% de sulfato de amônio.	104
Tabela 14-	Produção de biomassa, viabilidade celular, monitoramento do pH e consumo de açúcar pelas linhagens SC, RG, LS, SA, CAT e PE, cultivadas em meio YNB contendo 22% (p/v) de sacarose e 1% de peptona, 1% sulfato de amônio ou 1% de casaminoácidos.	112

## Abreviaturas

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico

D.O - densidade óptica

M - molar

mM - milimolar

mg - miligramas

mL - mililitros

nm - nanômetros

nmoles - nanomoles litros

NH<sub>4</sub>SO<sub>2</sub> - sulfato de amônio

YNB - yeast nitrogen base

YPD (ou YEPD) - meio de cultivo contendo extrato de levedura, peptona e glicose

PE, CAT, SA, RED, RG, LS – linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

µg - microgramas

µL - microlitros

## Sumário

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>31</b>
<b>1.1.</b>	<b><i>Produção do etanol pelas usinas brasileiras</i></b>	<b>32</b>
<b>1.2.</b>	<b><i>A Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i></b>	<b>33</b>
<b>1.3.</b>	<b><i>As características do mosto e as exigências nutricionais das leveduras</i></b>	<b>36</b>
<b>2.0</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>40</b>
<b>3.0</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Microrganismos utilizados</i></b>	<b>43</b>
<b>3.2.</b>	<b><i>Meios YEPD e YNB</i></b>	<b>43</b>
<b>3.3.</b>	<b><i>Mosto industrial</i></b>	<b>43</b>
<b>3.4.</b>	<b><i>Isolamento das leveduras contaminantes das dornas industriais</i></b>	<b>44</b>
<b>3.5.</b>	<b><i>Manutenção da cultura e preparo do inóculo</i></b>	<b>45</b>
<b>3.6.</b>	<b><i>Condições de crescimento e obtenção da suspensão de células</i></b>	<b>45</b>
<b>3.7.</b>	<b><i>Determinação da atividade enzimática da invertase</i></b>	<b>46</b>
<b>3.8</b>	<b><i>Determinação dos parâmetros fermentativos</i></b>	<b>46</b>
<b>3.8.1</b>	<b><i>Determinação da produção de biomassa</i></b>	<b>46</b>
<b>3.8.2</b>	<b><i>Determinação da viabilidade celular</i></b>	<b>47</b>
<b>3.8.3</b>	<b><i>Determinação do pH</i></b>	<b>47</b>
<b>3.9.</b>	<b><i>Medidas de consumo de nutrientes e produção de etanol</i></b>	<b>47</b>
<b>3.9.1.</b>	<b><i>Determinação de açúcar residual</i></b>	<b>47</b>
<b>3.9.2.</b>	<b><i>Determinação da concentração de etanol</i></b>	<b>48</b>
<b>3.9.3</b>	<b><i>Determinação de trealose</i></b>	<b>48</b>
<b>4.0.</b>	<b><i>Reprodutibilidade</i></b>	<b>48</b>
<b>5.0</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>5.1.</b>	<b><i>Análise comparativa dos estudos dos parâmetros fermentativos das linhagens industriais e dos isolados em mosto com 22, 30 e 35% de sacarose, em diferentes condições de cultivo.</i></b>	<b>49</b>

5.1.1.	<i>Estudos com sacarose 22%</i>	50
5.1.2	<i>Estudos com sacarose 30%</i>	59
5.1.3.	<i>Estudos com sacarose 35%</i>	71
5.2.	<b><i>Determinação da trealose</i></b>	<b>87</b>
5.3	<b><i>Determinação da invertase</i></b>	<b>94</b>
5.4.	<b><i>Estudos com meio YNB contendo 5 % (p/v) de sacarose com diferentes fontes de nitrogênio</i></b>	<b>99</b>
5.5.	<b><i>Estudos com meio YNB contendo 22% (p/v) de sacarose e diferentes fontes de nitrogênio</i></b>	<b>104</b>
5.6.	<b><i>Estudos realizados com as linhagens isoladas utilizando mosto com 17° Brix sem suplementação e mosto com 35% (p/v) de sacarose com suplementação de fontes de nitrogênio</i></b>	<b>113</b>
7.0	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>117</b>
	<b>REFERÊNCIA</b>	<b>120</b>

# Introdução

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1. Produção do etanol pelas usinas brasileiras

O processo de obtenção do etanol começa com o transporte da cana-de-açúcar até a moenda, onde são submetidas à lavagem com água. A matéria-prima é picada, desfibrada e encaminhada para a extração do caldo. Na fabricação do açúcar o caldo é tratado através de processos de aquecimento e adição de cal para separar as impurezas e as bactérias, e em seguida é submetido à evaporação para transformar-se em xarope, que é utilizado na fabricação do açúcar (AMORIM, 2005).

Este açúcar por apresentar muita umidade é levado aos secadores rotativos antes de ser ensacado. Nesta etapa, o açúcar que não se cristalizou dá origem ao mel final (melaço), que é utilizado como uma fonte de açúcares para a produção do álcool. O caldo misto, que resulta da moagem da cana, é diretamente encaminhado para a fábrica do álcool. Neste caso ele é purificado por meio de vários processos e técnicas de aquecimento e decantação para formar o mosto. Ao caldo misto pode, ainda, ser adicionado o melaço. Este líquido é enviado às dornas para o processo de fermentação (ALVES, 1994), e por não apresentar uma composição definida pode interferir com o processo fermentativo.

O mosto é colocado nas dornas juntamente com uma mistura composta de “leite de levedura”, água e ácido sulfúrico (“pé-de-cuba”). Atualmente, muitas das leveduras são do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, e foram resultantes de um processo de seleção considerando as suas características fermentativas em processos industriais. O sistema utilizado é baseado no método Melle-Boinot, em que o mosto fermentado é centrifugado para a separação das leveduras, que serão tratadas e recicladas no processo. A fermentação pode ser contínua ou descontínua com grande variedade de arranjo físico. O mosto fermentado é denominado vinho e é conduzido à destilação, onde através de várias colunas será alternadamente aquecido e condensado, separando-se todos os produtos secundários e proporcionando a obtenção de vários tipos de etanol: etílico hidratado, etílico anidro e outros. A tendência das indústrias sucroalcooleiras é de se transformar em complexos energéticos que além do etanol e do açúcar, possam



fabricar ração animal, fertilizantes entre outros e ainda gerar energia. (AMORIM, 2005).

Apesar do atrativo econômico e ambiental do bioetanol, o atual estágio de desenvolvimento tecnológico de produção apresenta alguns passivos ambientais que carecem de soluções tecnológicas, como por exemplo, a excessiva produção de vinhaça (12-14 L/L de etanol produzido), como consequência de processo de fermentação de baixo teor alcoólico (~8,5-9,0 % v/v). Outra limitação do processo é, em grande parte, associada à presença de contaminantes microbianos, os quais requerem para o seu controle o uso intensivo de antibióticos e biocidas (NOLASCO, 2010).

## **1.2. A levedura *Saccharomyces cerevisiae***

A fermentação alcoólica é um processo que consiste em um fenômeno biológico, cujo principal agente é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que possui a capacidade de transformar açúcares, seu principal alimento, mas na ausência destes, pode utilizar ácidos orgânicos e até mesmo o próprio etanol. Este microrganismo utiliza o açúcar para obter energia para suas funções vitais e não para produzir etanol como se requer na atividade industrial. Dessa forma para a levedura, a fabricação de álcool é uma consequência e não a finalidade da fermentação. Ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, gera uma forma de energia (ATP) que será empregada na realização de vários trabalhos fisiológicos como absorção, excreção e outros, além de biossíntese, necessários a manutenção da vida, crescimento e multiplicação (AMORIM, 2005).

A diferença entre fermentação e respiração não consiste somente na produção de álcool e gás carbônico, na fermentação; e de água e gás carbônico, na respiração. Na fermentação a molécula de glicose produz duas moléculas de ATP e na respiração 38 moléculas de ATP. Se o meio possui oxigênio e a concentração de açúcar for baixa, ocorre à respiração. Em termos energéticos a respiração é muito mais favorável para a levedura do que a fermentação. Em condições industriais a levedura utiliza anaerobicamente seu substrato (glicose e frutose), através de uma série de reações enzimáticas (a partir da sacarose) que

ocorrem em seqüência ordenada. Isto ocorre no citoplasma celular sendo, portanto, nessa região da célula que se processa a fermentação alcoólica (ALVES, 1994).

Diversos fatores podem afetar o rendimento fermentativo, ou seja, a eficiência da conversão do açúcar em etanol. Estes podem ser de ordem física (temperatura e pressão osmótica), química (pH, oxigenação, nutrientes minerais, orgânicos e inibidores) e microbiológica (espécie, linhagem e concentração da levedura, além da contaminação bacteriana). Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando a maior formação de produtos secundários (glicerol, ácidos orgânicos) e de biomassa (CARVALHO, 2001).

O volume de álcool que a fermentação produz depende do grau Brix (medida da quantidade de sólidos por cem gramas) do mosto, ou seja, da quantidade de açúcares nele existentes. A levedura absorve a sacarose na forma de seus monossacarídeos estruturais, glicose e frutose, após a hidrólise pela exoenzima, chamada invertase. A utilização do açúcar ocorre por duas formas: na respiração, com a presença de oxigênio e na fermentação pela ausência desse elemento. Por isso, é denominado um microrganismo aeróbio facultativo (ALVES, 1994).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui dois tipos de invertase: uma forma extracelular (ou periplasmática) e outra intracelular, que apresenta atividade catalítica similar, mas sua composição de aminoácidos é diferente. A invertase externa é localizada na parede celular e associada à manana, sendo esta conseqüência da expressão de um RNA com um transcrito maior, o qual é reprimido em altas concentrações de sacarose ou pelos seus produtos de hidrólise. Já a invertase interna é localizada no citoplasma, isso em conseqüência da expressão de um RNA com um transcrito menor (SALVATO, 2006). Muitos trabalhos têm estudado linhagens de leveduras com diferentes atividades de invertase (CARVALHO, 2001; PATARO, et.al.2002; TAKESHIGE; OUCHI, 1995), pois a velocidade de hidrolise da sacarose pode tornar o meio mais estressante, uma vez que as hexoses em concentrações elevadas no meio fermentativo aumentam a pressão osmótica do meio com conseqüente aumento na produção da trealose e glicerol, resultando em menor produção de etanol (BASSO; AMORIM, 1998).

A atividade invertásica de células de leveduras é oscilante. Vitolo, *et.al.* 1989, estudaram a atividade da invertase em células de *S. cerevisiae*, em melaço de cana e concluíram que, durante o cultivo contínuo das leveduras, a parede celular e o espaço periplasmático são submetidos a mudanças morfológicas contínuas as quais afetam a interação entre a invertase e as moléculas de sacarose conduzindo às oscilações na atividade invertásica.

As enzimas glicolíticas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, vitaminas, minerais, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros). Alguns estimulam e outros reprimem a ação enzimática afetando o desempenho do processo conduzido pelas leveduras. Os produtos finais do metabolismo do açúcar dependem das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa a maior parte é convertida em etanol e gás carbônico. Os carboidratos considerados substrato para a fermentação podem ser endógenos (glicogênio e a trealose), quanto exógenos (sacarose, glicose e frutose) que são fornecidos a levedura (AMORIM, 2005).

Outro fator importante na tecnologia da fermentação alcoólica é a trealose, dissacarídeo constituído de duas moléculas de glicose. Além de ser um carboidrato de reserva, exerce função protetora contra estresse, sendo responsável pela manutenção das células vegetativas e de esporos viáveis. Essa função protetora é resultado da inter-relação entre sua localização e mobilização na célula. Na fermentação industrial, a levedura se acha continuamente exposta a situações estressantes, que de acordo com a intensidade pode acarretar a exaustão de seu conteúdo de trealose e se isso ocorrer há queda da viabilidade celular (AMORIM, 2005).

O aumento no acúmulo da trealose ocorre devido a mudanças na atividade das enzimas que metabolizam a trealose provocado pelo aumento da temperatura, pelo estresse osmótico e em situações de limitação de nutrientes. (THEVELEIN, 1984).

### 1.3. As características do mosto e as exigências nutricionais das leveduras

O mosto utilizado pelas destilarias brasileiras é composto de caldo de cana, melaço e água, apresentam um grau Brix de 16 a 20 e, além disso, durante a fermentação é necessário o controle da sua densidade, acidez, componentes nutritivos ao crescimento das leveduras e temperatura, que deve ser mantida entre 30 a 33°C. A composição da cana-de-açúcar é muito variável, chegando divergir dentro de uma mesma região, especialmente em função das condições climáticas, com as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, com o tipo de cultivo empregado, com a variedade, o estágio da maturação e a idade da cana e a utilização da vinhaça na irrigação dos canaviais. As composições químicas do melaço e do caldo da cana dependem muito da espécie de cana utilizada (SANTOS, 2008).

A fermentação alcoólica tem seu início devido à ação das leveduras que usam os açúcares do mosto para seu crescimento e multiplicação dando como resultado a produção de álcool. Isto é influenciado pelas condições que o meio oferece. Então para suprir as exigências das leveduras alguns macros nutrientes e/ou micro nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, manganês, enxofre, cobalto, cobre, zinco) são adicionados ao mosto a fim de complementar as deficiências do meio quanto a certos elementos indispensáveis às leveduras para a máxima transformação dos açúcares. O mosto exige uma suplementação adequada de certos sais minerais para que a fermentação se processe com maior vigor, pois embora seja rico em certos elementos possui um desequilíbrio entre os outros sais (SANTOS, 2008).

Um elemento importante para a qualidade do produto final é o nitrogênio amoniacal, na ausência deste a levedura metaboliza outros compostos como os aminoácidos, cujos desdobramentos resultam substâncias indesejáveis, verificando um sensível aumento no teor de alcoóis superiores. Quanto à fonte de nitrogênio a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza este elemento nas formas amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) amídica (uréia) ou amínica (na forma de aminoácido) e pequenos peptídeos e não possui habilidade metabólica para aproveitar o nitrato (SANTOS, 2008; VILANOVA *et al.*, 2007).

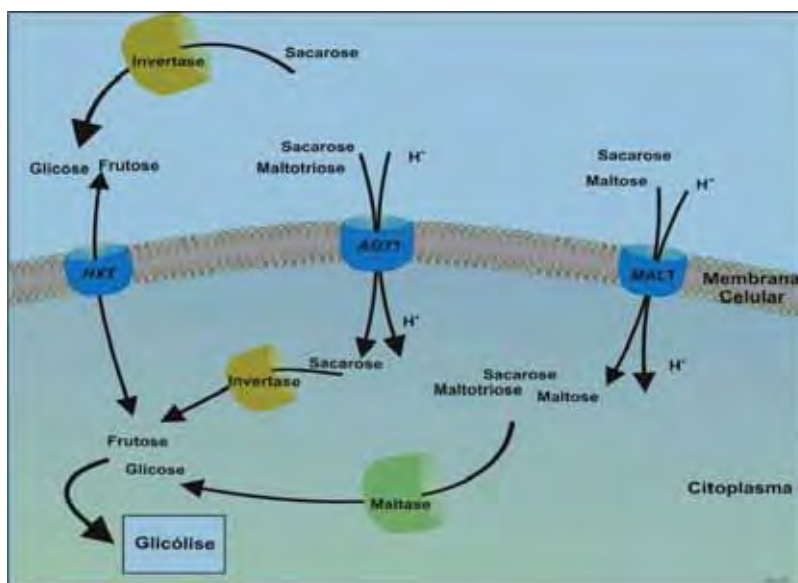
O transporte de nitrogênio através da membrana plasmática da levedura é feito através de permeases. Mais de 20 sistemas de transporte específicos medeiam o transporte ativo de aminoácidos pela membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Além dos sistemas específicos, a *Saccharomyces cerevisiae* 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- isômero de aminoácidos básicos, neutros e ácidos (JAUNIAUX & GRENSON, 1990; HORÁK, 1986). 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 a insuficiência de compostos nitrogenados no meio de cultura pode provocar baixa produção de biomassa e afetar o processo fermentativo (VILANOVA *et al.*, 2007).

Os peptídeos são outra fonte importante de nitrogênio utilizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e seus sistemas de transportes são através do transporte ativo. É um processo bioquímico específico em que peptídeos pequenos 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 (MIRANDA *et al.*, 2008).

Em relação à fonte de carbono, altas concentrações de açúcares podem ser eficientemente fermentadas pela levedura. Apesar desta tecnologia já ser amplamente utilizada em vários processos fermentativos, como por exemplo, em cervejaria, a utilização de altas concentrações de açúcar para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar não apresenta resultados satisfatórios já que ocorre uma queda do rendimento conforme a concentração de sacarose aumenta (JONES *et al.*, 1994; TAKESHIGE & OUCHI, 1995). Um dos possíveis problemas envolve a rápida hidrólise extracelular da sacarose pela invertase (Figura 1), o que provoca um severo estresse osmótico nas células de levedura pelas enormes concentrações de glicose e frutose produzidas. Altas concentrações de glicose e frutose reprimem a expressão dos transportadores de hexoses (*HXT 1* e *HXT 7*),

além de incrementar os ciclos de síntese e degradação de trealose, glicogênio e glicerol (ERASMUS *et al.*, 2003). Conseqüentemente, aumenta o gasto energético, além de que menos carbono é direcionado para a produção de etanol, diminuindo o rendimento da fermentação. Embora seja universalmente aceito que em *S. cerevisiae* a sacarose é hidrolisada extracelularmente pela invertase, uma série de trabalhos tem mostrado que este açúcar é também transportado diretamente para o interior das células (FONTANA, 1992).

Na verdade os genes que codificam para a invertase (genes *SUC*) permitem a síntese de duas formas da enzima, uma contendo um peptídeo sinal que permite a secreção da proteína, e outra forma intracelular sem este peptídeo sinal. Em *S. cerevisiae* o transportador codificado pelo gene *AGT1* é responsável pelo transporte ativo de sacarose. Esta permease possui alta afinidade pelo açúcar, e as linhagens que possuem este transportador crescem mais rapidamente em sacarose do que linhagens sem esta permease. Desta forma ocorre um rápido equilíbrio entre a concentração dos açúcares no interior e exterior da célula, impedindo o estresse osmótico (STAMBUK *et al.*, 1999; STAMBUK *et al.*, 2000)).



**Figura 1:** Representação das vias de utilização de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: SALVATO, 2006.

A glicose e a frutose são consideradas açúcares repressores, ou seja, são utilizados preferencialmente pela levedura. Em uma mistura com outros açúcares não repressores, serão utilizados somente quando esses monossacarídeos forem exauridos do meio. Outro aspecto é que as leveduras do gênero *Saccharomyces*

são organismos glicofílicos, isto é, tem preferência por glicose. Num meio contendo os dois açúcares, frutose é utilizada concomitantemente, entretanto, a glicose é exaurida mais rapidamente, o que causa uma discrepância no consumo de glicose e frutose ao longo da fermentação, e muitas vezes com graves conseqüências industriais (BERTHELIS *et al.*, 2004; BERTHELIS *et al.*, 2008).

Neste trabalho estudou-se a utilização de diferentes concentrações de sacarose por linhagens industriais de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas na produção de etanol. A escolha deste açúcar deveu-se ao fato do mosto utilizado na produção de etanol ter como fonte de carbono a sacarose, e ser deficientes em concentrações de nitrogênio, por isso foi estudado o efeito da fonte de nitrogênio no desempenho fermentativo das leveduras industrial PE, CAT, SA e RED STAR, linhagens comercial utilizadas pela usina Santa Fé no início da safra para começar a fermentação; e também foram empregadas três linhagens, SC, LS e RG, isoladas das dornas de fermentação.

A principal fonte de carbono utilizada neste trabalho foi sacarose nas concentrações de 5, 22, 30 e 35% (p/v). A concentração utilizada no mosto das usinas para a produção de etanol é em torno de 19 a 22 % p/v. Uma linhagem que consiga consumir sacarose a 35% p/v será muito atrativa para as usinas. 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, suplementados com sulfato de amônio, casaminoácidos ou peptona. As fermentações foram conduzidas em duas condições diferentes: com agitação e sem agitação.

Visto que as leveduras são capazes de utilizar diferentes compostos nitrogenados e concentrações diferentes fontes de carbono, os estudos referentes à utilização desses nutrientes e a relação entre o metabolismo do carbono e nitrogênio se fazem necessário para se melhor compreender como a suplementação nutricional pode ser utilizada para melhorar o desempenho fermentativo.

# Objetivos



## **2.0. OBJETIVOS**

Os principais objetivos desenvolvidos neste projeto foram:

Avaliar a eficiência fermentativa das linhagens industriais em mosto com concentração de 22%, 30% e 35% de sacarose.

Estudar o efeito da adição das fontes de nitrogênio em mosto concentrado e em meio sintético.

Isolar as linhagens de leveduras das dornas de fermentação para verificar seu desempenho fermentativo em meios sintético YNB e em mosto.

Comparar a capacidade fermentativa das linhagens industriais com as linhagens isoladas através de diferentes condições de cultivo: com e sem agitação e dos parâmetros fermentativos como a produção de biomassa, consumo de açúcar, viabilidade celular, atividade enzimática da invertase, produção de trealose e de etanol.

# Material e Métodos

### **3.0 MATERIAL e MÉTODOS**

O presente projeto foi desenvolvido no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química-UNESP, Araraquara.

#### **3.1. Microrganismos utilizados**

Os microrganismos usados neste estudo foram:

a) Linhagens industriais PE, CAT e SA, freqüentemente utilizadas pelas usinas de açúcar e álcool para iniciar o ciclo de fermentação, e RED STAR linhagem cedida por Lasaffre, Lille, França;

b) Linhagens LS, SC e RG, isolados de dornas de fermentação da Usina Santa Fé, em Nova Europa-SP.

#### **3.2. Meios YEPD e YNB**

As células de levedura foram mantidas em meio YEPD sólido 1,0% (p/v) de extrato de levedura; 2,0% (p/v) de glicose; 2,0% (p/v) de peptona; 2,0% (p/v) de Agar. No isolamento de leveduras contaminantes, ao meio YEPD foi adicionado 0,003g de corante Rosa Bengala.

O meio de cultura YNB foi preparado contendo 0,17% (p/v), sacarose nas concentrações de 5% e 22% (p/v). As fontes de nitrogênio utilizadas foram: preparações comerciais de hidrolisados de proteínas (peptona), sulfato de amônia  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  e hidrolisados ácidos de proteínas (casaminoácidos), e adicionados aos meios na concentração de 1 ou 2% (p/v).

#### **3.3. Mosto industrial**

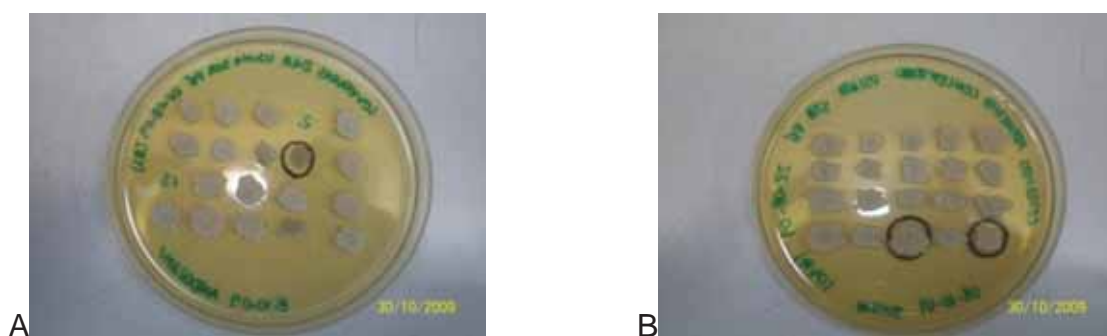
O mosto tendo como base o caldo de cana foi cedido pela Usina Santa Fé, com 17° Brix. Neste mosto foi acrescentada sacarose para se ter um meio com a concentração de 22, 30 e 35% (p/v) de sacarose. Estes meios foram suplementados com as fontes de nitrogênio acima citadas. Os meios de cultura sempre foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 120°C e 1 atm.

### 3.4. Isolamento das leveduras contaminantes das dornas industriais

As leveduras coletadas na Usina Santa Fé foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YEPD, com Rosa de Bengala, 1,0% (p/v) de extrato de levedura; 2,0% (p/v) de glicose; 2,0% (p/v) de peptona; 2,0% de Agar e 0,003g de corante Rosa Bengala, e foram incubadas a 30°C por 48 horas (Figura 2). As colônias que desenvolveram coloração e características morfológicas diferentes foram transferidas aleatoriamente com auxílio de palitos esterilizados para meio YEPD sólido, sem corante, e incubadas a 30 °C por 48 horas. Depois de crescidas foram selecionadas aleatoriamente três linhagens, que foram denominadas SC, LS e RG, de acordo com o crescimento das colônias e morfologia (Figura 3), e a Figura 4 mostra as características morfológicas microscópicas dos isolados.



**Figura 2:** Plaqueamento das leveduras coletadas na Usina Santa Fé em meio YEPD com corante Rosa Bengala.



**Figura 3:** Plaqueamento em meio YEPD das colônias obtidas do plaqueamento em meio YEPD com Rosa Bengala (Figura 2). A figura 3A mostra a cepa SC, colônia com pouco crescimento e a Figura 3B mostra a cepa RG e LS que apresentam colônia rugosa e colônia lisa.



**Figura 4:** As fotos acima ilustram as 3 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que foram coletadas na Usina Santa Fé. (A) linhagem RG, apresenta colônia rugosa (células em cachos maiores), (B), linhagem LS apresenta colônia lisa brilhante (células individuais) e (C) linhagem SC apresenta a colônia rugosa (células em cachos menores). As linhagens SC e RG são linhagens com características flocculantes.

### 3.5. Manutenção da cultura e preparo do inóculo.

As culturas estoques das leveduras foram mantidas em meio YEPD Agar, inicialmente sendo incubadas por 24 horas a 30°C e posteriormente foram armazenadas a 4°C, sendo utilizada por um período máximo de 10 dias. O inóculo foi preparado a partir das leveduras coletadas da cultura estoque com alça de platina e transferidas para tubos de ensaio contendo 4 mL de água destilada esterilizada a fim de se obter uma concentração de final de 0, 025mg de células/mL.

### 3.6. Condições de crescimento e obtenção da suspensão de células

O crescimento foi realizado em Erlenmeyer de 125 mL com volume de meio de 25 mL. Após a inoculação de 0, 025mg de células/mL, os frascos foram incubados a 30°C em incubadora BOD (sem agitação), ou a 200 rpm, em mesa agitadora New Brunswick Scientific Co. Inc.

Os parâmetros fermentativos foram obtidos através da determinação do acúmulo de biomassa, viabilidade celular, pH, consumo de açúcar e produção de etanol. Para isso foram coletados 0,5 mL da amostra do meio de cultura nos seguintes intervalos de tempo: 15, 19, 23, 38, 42, 46, 61, 65 horas, onde a partir desse volume, foi utilizado 0,1 mL determinar a biomassa e 0,05 mL para a viabilidade celular e pH. O restante do material foi centrifugado, separando as células do meio de cultura. O sobrenadante foi estocado a -5°C para análises posteriores da utilização da fonte de carbono, através da dosagem de açúcar

residual e etanol. As células foram separadas e utilizadas na determinação de trealose.

### **3.7 Determinações da atividade enzimática da invertase**

Para a determinação da atividade invertásica, utilizou-se o procedimento descrito por Vitolo (1989), no qual células intactas separadas do meio de crescimento por centrifugação foram lavadas por três vezes e suspensas em tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,6. Este procedimento mede a quantidade de açúcares redutores liberados da sacarose pela ação da invertase de parede usando o método de DNS. Os tubos de reação contendo 2 mL de solução 10% de sacarose em tampão acetato e os tubos brancos contendo 2 mL de tampão acetato foram incubados a 37°C, por 10 minutos. A reação enzimática foi iniciada com a adição de 30 µL das células intactas aos tubos. Após os 10 minutos a 37°C, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL do reagente de DNS. Os tubos foram transferidos para banho de água fervente por 5 minutos e após o resfriamento em banho de gelo, acrescentou-se 8 ml de água destilada em cada tubo e as medidas espectrofotométricas foram efetuadas a 546 nm. Uma curva de calibração foi traçada utilizando soluções padrões com quantidades equimolares de glicose e frutose 0,005M. O fator que converte absorvância em atividade é a inclinação do gráfico  $\Delta A_{546}$  versus concentração de açúcar ( $\mu\text{mol}$ ). Uma unidade de atividade é dada pela quantidade ( $\mu\text{mol}$ ) açúcar redutor liberado por minuto/mL de amostra. A atividade específica, número de unidade de atividade por miligrama de células (U/mg) será utilizada neste estudo para que se tenha um dado comparativo entre as diferentes condições de cultivo.

### **3.8. Determinação dos Parâmetros Fermentativos**

#### **3.8.1. Determinação da produção de biomassa**

O crescimento celular foi medido periodicamente através de medidas turbidimétricas a 570 nm 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, que para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é 0,6711. O fator  $f$  foi determinado a partir da medida de absorvâncias de suspensões com diferentes concentrações de células, das quais 1,0 mL de cada suspensão foi filtrado em membrana Millipore, secadas em estufas a 100°C, por duas horas, e o fator  $f$  foi obtido de uma curva padrão que relacionava absorvância x massa seca.

### **3.8.2 Determinação da viabilidade celular**

A determinação da viabilidade celular foi periodicamente acompanhada através método de coloração com azul de metileno (LEE *et al.*,1981). Na determinação da viabilidade celular, o volume de 50  $\mu$ L da amostra foi transferido para 450  $\mu$ l da solução padrão de azul de metileno (0,025g de azul de metileno; 0,09g NaCl; 0,042g KCl; 0,048g CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O; 0,02g NaHCO<sub>3</sub>) e o volume completado para 1000 mL) 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.

### **3.8.3. Determinação do pH**

A determinação do pH procedeu-se utilizando tiras com indicadores coloridos, cuja alteração de cor é sensível ao pH do meio.

## **3.9. Medidas do consumo de nutrientes e produção de etanol**

### **3.9.1 Açúcar residual**

A utilização da glicose pelas leveduras foi determinada através do método do ácido 3,5 dinitrossalicílico - DNS (1,0 g ácido 3,5 dinitrosalicílico; 30 g tartarato de sódio e potássio; 1,6 g NaOH; e o volume completado para 100 mL), que se baseia no poder redutor de açúcares, originando um composto colorido 3-amino 5-nitro salicílico (MILLER,1959). Para a dosagem do açúcar, as amostras obtidas foram adequadamente diluídas e a 200  $\mu$ L foram adicionados 150  $\mu$ L de água e 100  $\mu$ L de HCl 6,0 M . As amostras foram incubadas a 60° C por 7 minutos e neutralizadas com 0,5 mL de NaOH 2,4 M. Adicionou se 1,0 mL do reagente DNS nos respectivos tubos de ensaio. O tubo contendo o branco foi preparado

adicionando-se 0,2 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 absorvância foram realizadas a 546 nm.

### **3.9.2. Determinação 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 30 mL/min. A vazão do hidrogênio foi de 30 mL/min e do ar sintético de 300 mL/min. Foi utilizada uma solução de etanol como padrão e a curva de calibração foram obtidos com soluções de etanol 0,5 e 1% v/v.

### **3.9.3. Determinação da Trealose**

Para a determinação de trealose 1,0 mL da cultura foi coletado e lavado por 3 vezes com solução salina (0,85%). Para a extração da trealose as células foram suspensas em 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,25mM e a suspensão incubada por 20 minutos em banho fervente. A seguir, as amostras foram centrifugadas e uma alíquota de 25 µL do sobrenadante foi adicionada 12,5 µL de ácido acético 1M e 12,5 µL de tampão acetato de sódio 300 mM, contendo 15 mM de CaCl<sub>2</sub> em pH 5,5. Iniciou-se a reação enzimática com 50 µL da enzima trealase obtida a partir de *Humicola grisea*. A mistura da reação foi incubada overnight a 50° C. A glicose proveniente da hidrólise da trealose foi dosada pelo kit comercial (Labtest, Brasil) contendo o sistema enzimático Glicose oxidase/peroxidase. A quantidade de trealose foi expressa em nmoles de glicose/mg de células (MIRANDA et.al. 2009).

## **4.0. Reprodutibilidade**

Os dados apresentados nesta dissertação representam, na maioria dos casos, a média de pelo menos três experimentos repetidos de forma idêntica.



# Resultados

## 5.0 RESULTADOS

Os estudos apresentados neste trabalho foram realizados em dois tipos básicos de meio: um meio utilizado foi o mosto industrial, constituído de caldo de cana clarificado, no qual se adicionou melaço e água, com uma concentração final de 17° Brix, (17g de soluto por 100 mL de caldo), que foi gentilmente cedido pela Usina Santa Fé, Nova Europa-SP. A este mosto foi adicionada sacarose comercial para obter meios com concentrações aproximadas de sacarose 22%, 30% e 35% (p/v) para estudar o desempenho fermentativo das linhagens industriais em altas concentrações de sacarose. Um segundo meio contendo base nitrogenada YNB 0,17%, com sacarose 5% ou 22% (p/v). Este meio foi usado para comparar o comportamento fermentativo de isolados do processo de fermentação com a linhagem industrial SA, que foi escolhida aleatoriamente.

Aos meios de cultura foi adicionada uma fonte de nitrogênio na concentração de 1% ou 2%. As fontes de nitrogênio utilizadas neste trabalho foram preparações comerciais de hidrolisados enzimáticos de proteínas (Peptona), hidrolisados ácidos de proteínas (casaminoácidos) e sulfato de amônio  $[(NH_4)_2SO_4]$ . Estas fontes foram escolhidas por serem comumente utilizadas como constituintes no meio de cultura e por apresentarem diferentes graus de complexidade estrutural devendo interferir diretamente no fluxo metabólico das leveduras quanto à assimilação e utilização como fonte de nitrogênio e também na mutua interação que deve ocorrer com a fonte de carbono (MIRANDA *et.al.*, 2008).

### 5.1 Análise comparativa dos estudos dos parâmetros fermentativos das linhagens industriais e dos isolados em mosto com 22, 30 e 35% de sacarose, em diferentes condições de cultivo.

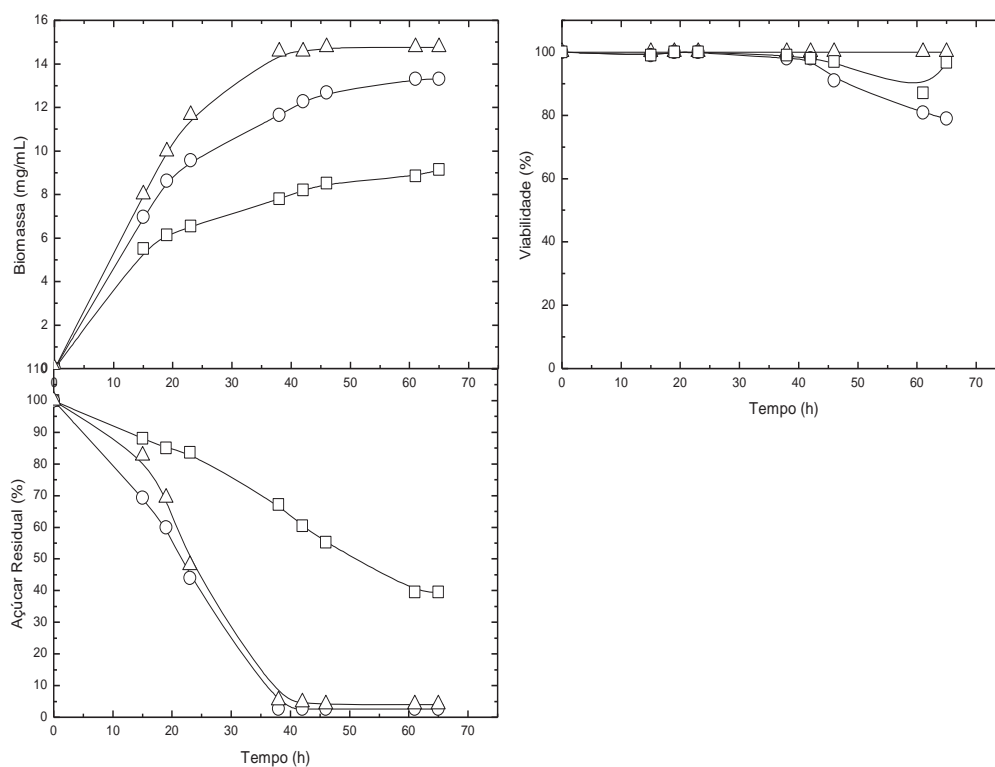
#### 5.1.1. Estudos com sacarose 22%

As Figuras 5 a 10 e a Tabela 1 mostram a variação dos parâmetros fermentativos na fermentação de sacarose 22% (p/v) pelas linhagens PE, CAT e SA com agitação (Figuras 5 a 7), e sem agitação (Figuras 8 a 10). Nos cultivos agitados sem suplementação de fontes de nitrogênio a produção de biomassa foi de 9,0 mg/mL pelas linhagens PE CAT e SA e nos meios não agitados foi em torno de 7,0 mg/mL, a agitação promove o multiplicação das leveduras durante os

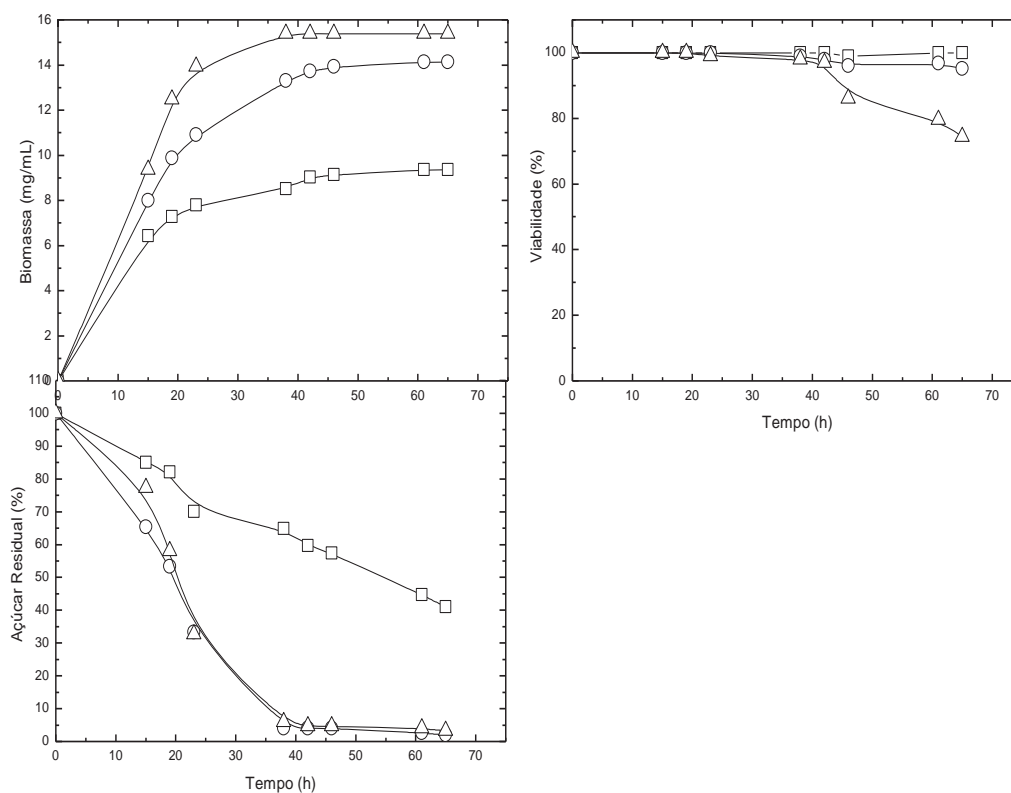
cultivos. A Figura 7 mostra o desempenho fermentativo da linhagem SA e foi a levedura que apresentou melhores condições fermentativas sobrando apenas 2,2% de açúcar no meio, ou seja, exauriu quase toda a sacarose presente no meio de cultivo, enquanto que PE e CAT (Figuras 5 e 6) sobrou 39,6% e 41% de açúcar no meio, respectivamente, nesta concentração de sacarose o efeito sobre a viabilidade celular foi mínimo.

No cultivo com agitação em mosto suplementado com peptona a produção de biomassa foi ainda maior em torno de 15 mg/mL e com sulfato de amônio 14 mg/mL, o consumo de açúcar foi de 4,0 % para PE e SA e 3,0 % para CAT e a viabilidade foi de 74% para CAT enquanto que para PE e SA foi de 96% e 82%, pois a partir das 38 horas de cultivo a concentração de açúcar no meio diminuiu drasticamente e conseqüentemente a viabilidade também diminuiu. Esta fonte de nitrogênio melhorou as condições da fermentação para todas as linhagens e os cultivos com suplementação de sulfato de amônio o desempenho fermentativo das leveduras foram inferiores.

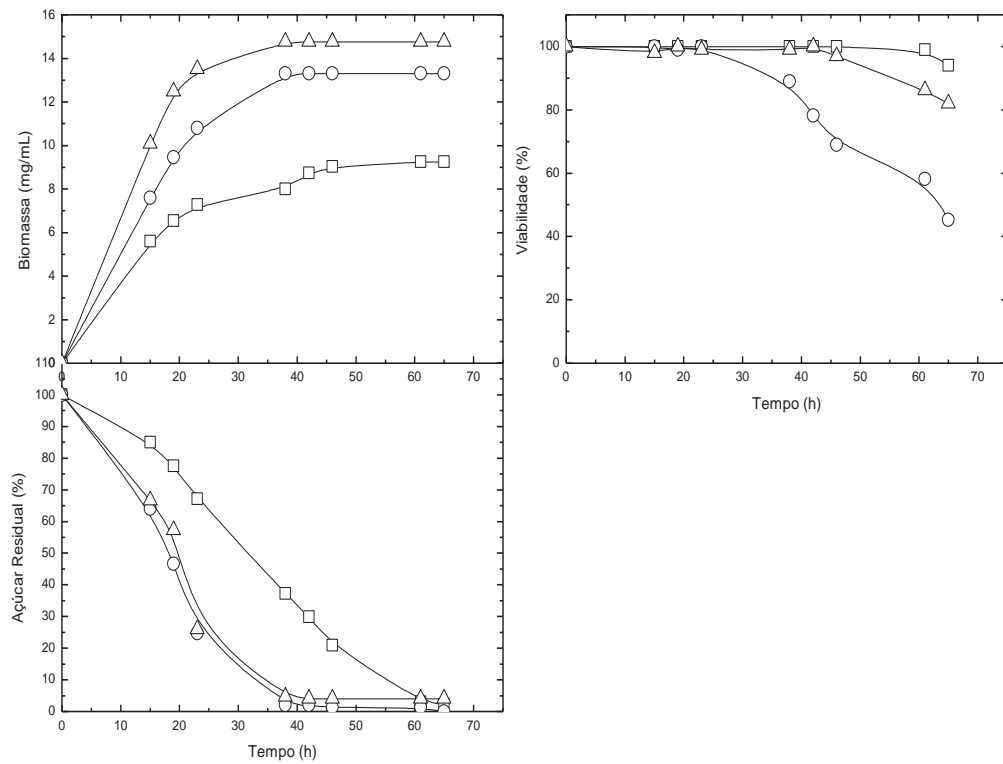
Nos meios não agitados (Figura 8, 9,10 e Tabela 1), houve menor produção de biomassa, manutenção da viabilidade celular e o consumo eficiente da fonte de carbono para as três linhagens utilizadas quando suplementado com fontes de nitrogênio, apesar de uma fermentação mais lenta. A linhagem PE no meio não suplementado com fontes de nitrogênio o consumo de açúcar foi de 26,5% já as linhagens CAT e SA foram mais eficiente e o consumo foi de 10% e 7,4%. Com estes estudos verificou-se a necessidade da suplementação nutricional para a exaustão total da fonte de carbono.



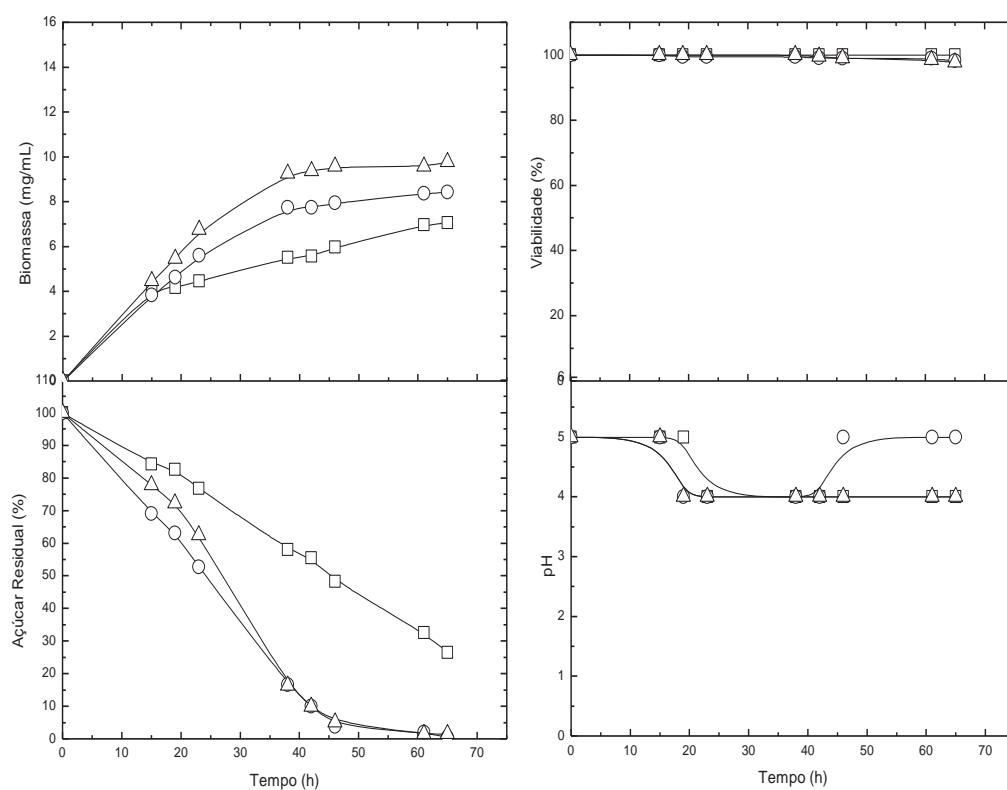
**Figura 5:** Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante **crescimento aeróbico** em mosto com **22% de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fontes de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



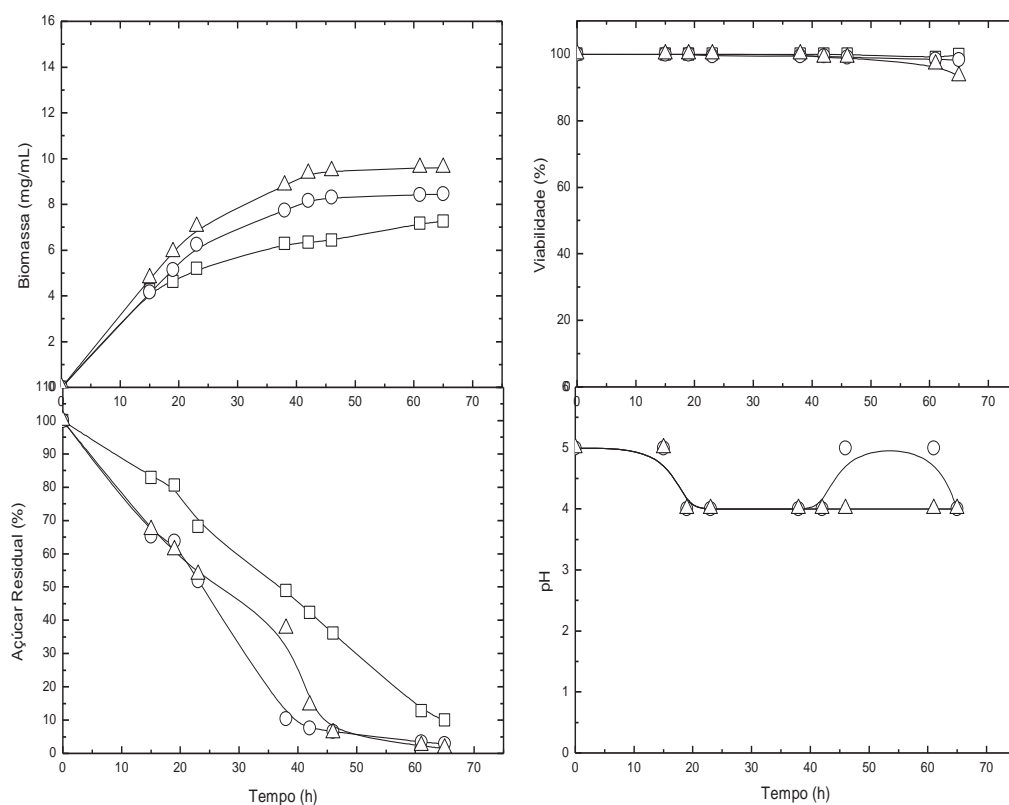
**Figura 6:** Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* **CAT**, durante **crescimento aeróbico** em mosto com **22% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fontes de nitrogênio (□) com 22% (p/v) de sacarose. Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 7:** Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante **crecimento aeróbico** em mosto com **22% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fontes de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

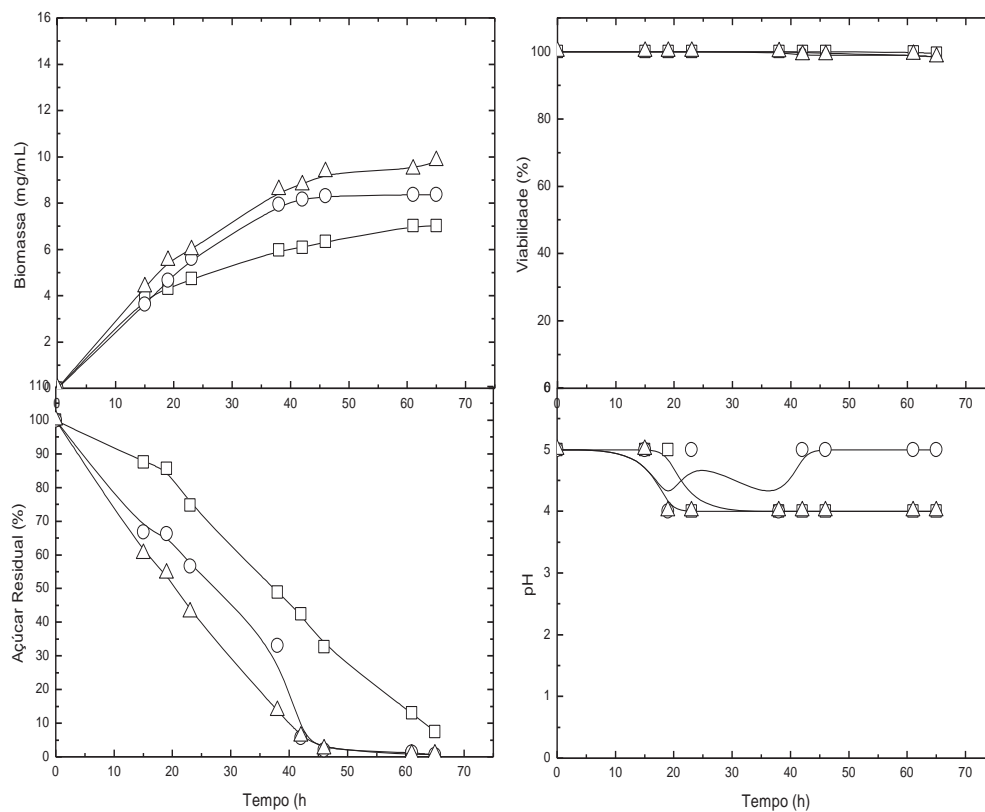


**Figura 8:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **22% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio, sulfato de amônio (○), peptona (Δ) sem fontes de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 9:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* **CAT**, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **22% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ) sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.





**Figura 10:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **22% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 1:** Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo **22% (p/v) de sacarose** sem fontes de nitrogênio, 1% de peptona ou 1% sulfato de amônio.

Formas de cultivo	Linhagens	Sacarose			1% Peptona			1% Sulfato de Amônio		
		Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)
Com Agitação 200(rpm)	PE	9,15	100	39,6	14,8	96	4,0	13,3	79	2,7
	CAT	9,36	99	41,0	15,4	74	3,3	14,0	95	2,0
	SA	9,25	94	2,2	14,8	82	4,0	13,3	45	0,0
Sem Agitação	PE	7,5	100	26,5	10	97	1,5	8,4	98	0,5
	CAT	7,5	99	10,0	9,6	93	1,5	8,8	98	1,5
	SA	7,3	99	7,4	9,5	98	0,7	8,4	98	0,7

Condições de fermentação: 30°C, pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

### 5.1.2. Estudos com sacarose 30%

Os resultados obtidos na fermentação de mosto com sacarose 30% (p/v) com e sem suplementação de peptona ou sulfato de amônio estão mostrados nas Figuras 11 a 13 (com agitação) e Figuras 14 a 16 (sem agitação) e na Tabelas 2. Nos cultivos com agitação e na ausência de suplementação as linhagens PE, CAT e SA não tiveram desempenho fermentativo eficiente e o açúcar residual foi de 44,4%, 50,6% e 31,3% (Tabela 2), ou seja, sobrou açúcar no meio de cultivo, conseqüentemente a viabilidade se manteve em torno de 98 e 100% e a produção de biomassa foi de 8,6 mg/mL, 9,2mg/mL e 8,3 mg/mL e nos cultivos não agitados estes parâmetros foram inferiores.

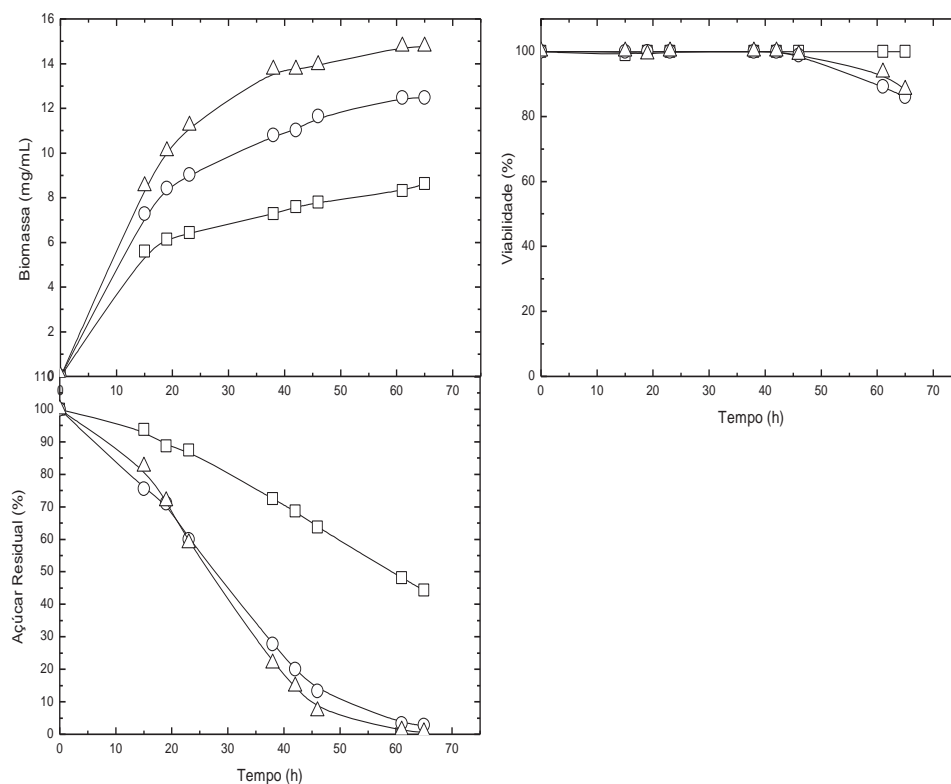
Nos cultivos agitados e suplementados com peptona a produção de biomassa foi de 14,8 mg/mL, 15 mg/mL e 13,9 mg/mL para as linhagens PE, CAT e SA, respectivamente; e para o meio suplementado com sulfato de amônio foi de 12,5 mg/mL, 12,3 mg/mL e 12,3 mg/mL, sendo inferior para as três linhagens (Tabela 2 e Figuras 11, 12 e 13) e o consumo de açúcar destas linhagens foi mais eficiente nos meios suplementados com peptona, principalmente para a linhagem PE que praticamente exauriu o açúcar no meio em 38 horas de cultivo, o que pode ter induzido a queda da viabilidade celular após este tempo de fermentação.

Nos cultivos sem agitação os meios suplementados com peptona a produção de biomassa é menor que no cultivo agitado para as linhagens PE, CAT e AS, respectivamente, 10 mg/mL, 9,3 mg/mL e 8,7mg/mL, e nos meios com sulfato de amônio foi inferior, e a viabilidade celular de 97%, 89% e 91% e nos meios com sulfato de amônio foram maior, pois o consumo de açúcar nos meios suplementados com peptona foi mais eficiente que em sulfato de amônio (Figuras 14, 15 e 16 e Tabela 2). No geral, apesar de ser eficiente o consumo de açúcar, a velocidade de fermentação é inferior à observada no meio com agitação.

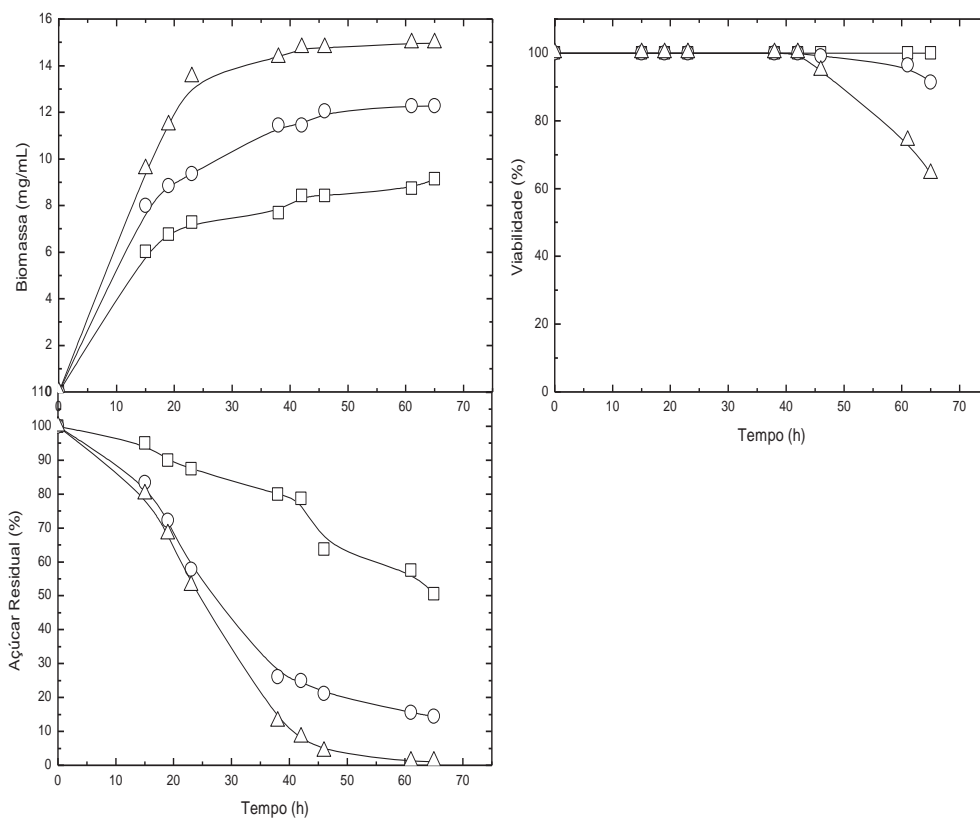
Em alguns experimentos foi utilizado casaminóacido como fonte de nitrogênio, que apresenta predominantemente aminoácidos livres na sua composição. Os cultivos foram sem agitação por ser uma condição em que apresentou condições de fermentação inferiores nos estudos anteriores. Esta fonte de nitrogênio induziu também melhores condições da fermentação (Figuras 17, 18 e 19 e Tabela 3). A produção de biomassa pelas linhagens PE CAT e SA foi de 10,4 mg/mL, 9,2 mg/mL e 10 mg/mL e a viabilidade celular de 96%, 98% e 97% e o

consumo de açúcar de 6,0%, 8,0% e 1,2%, sendo a Linhagem SA a que apresentou melhor desempenho fermentativo quando comparado com as outras linhagens.

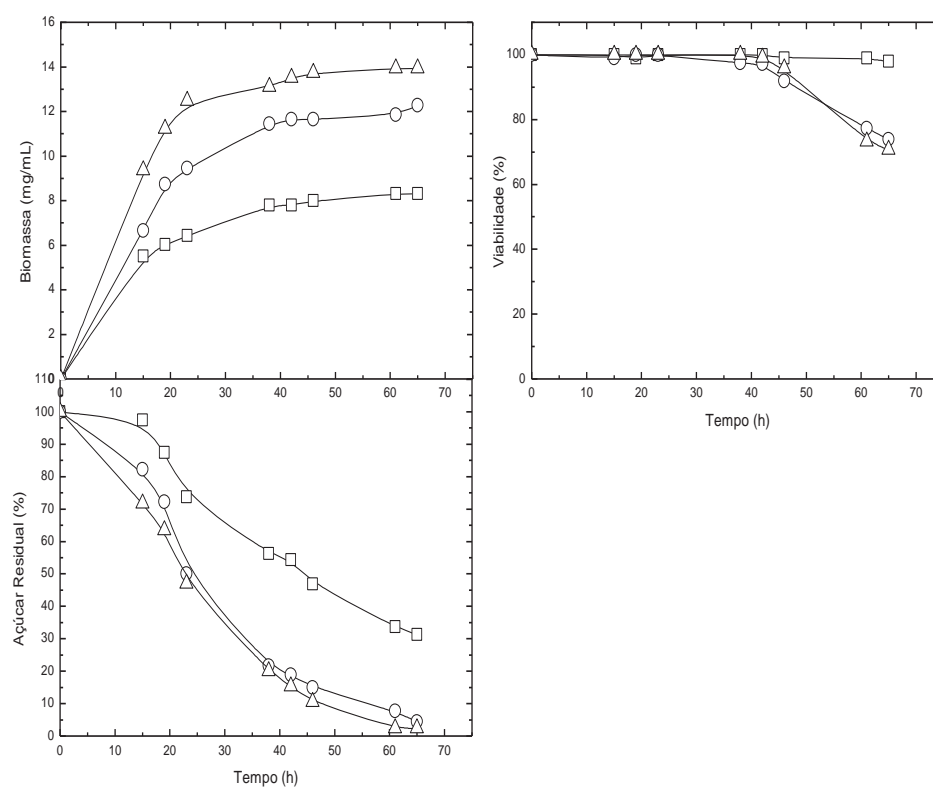
A produção de etanol nos cultivos sem agitação foi de 14% (v/v) nos meios suplementados com peptona e de 13% (v/v) com sulfato de amônio. Nos meios sem suplementação a produção de etanol foi inferior (9,0% v/v), sugerindo que houve utilização plena da fonte de carbono e que é possível a obtenção de vinhos mais concentrados em etanol com a preservação da viabilidade celular (Tabela 4). Portanto a fonte de nitrogênio é necessária para melhorar a condições da fermentação.



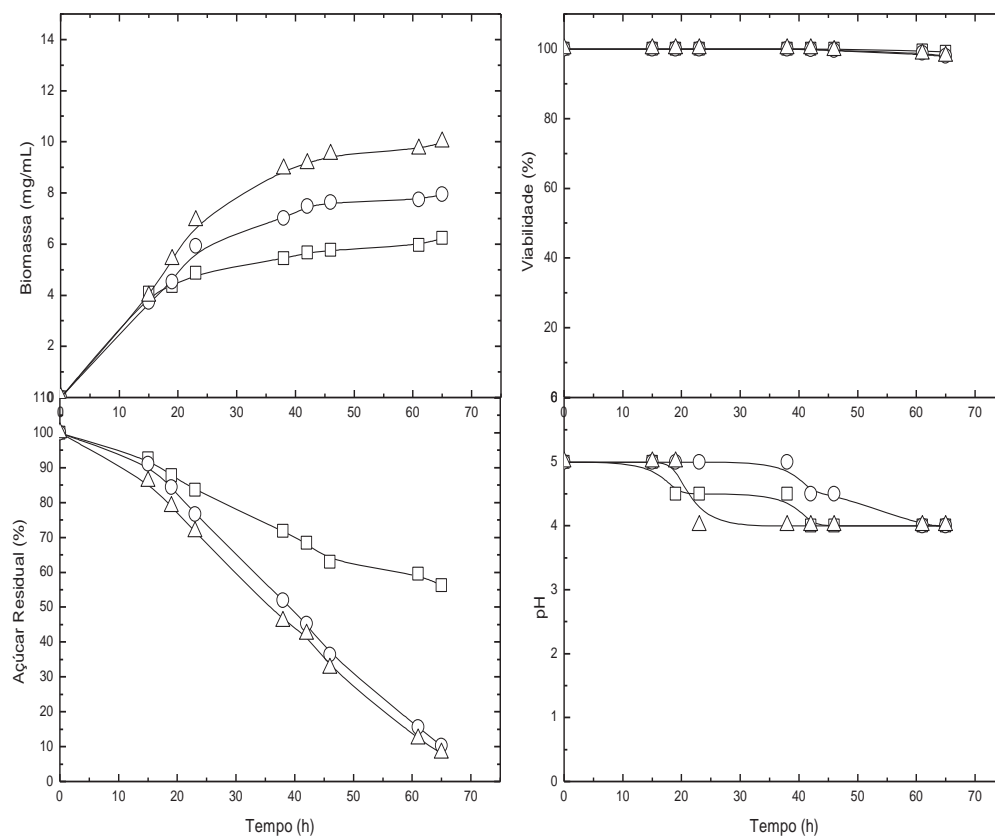
**Figura 11:** Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante **crescimento aeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ) sem fontes de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 12:** Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* **CAT**, durante **crescimento aeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ) sem fontes de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

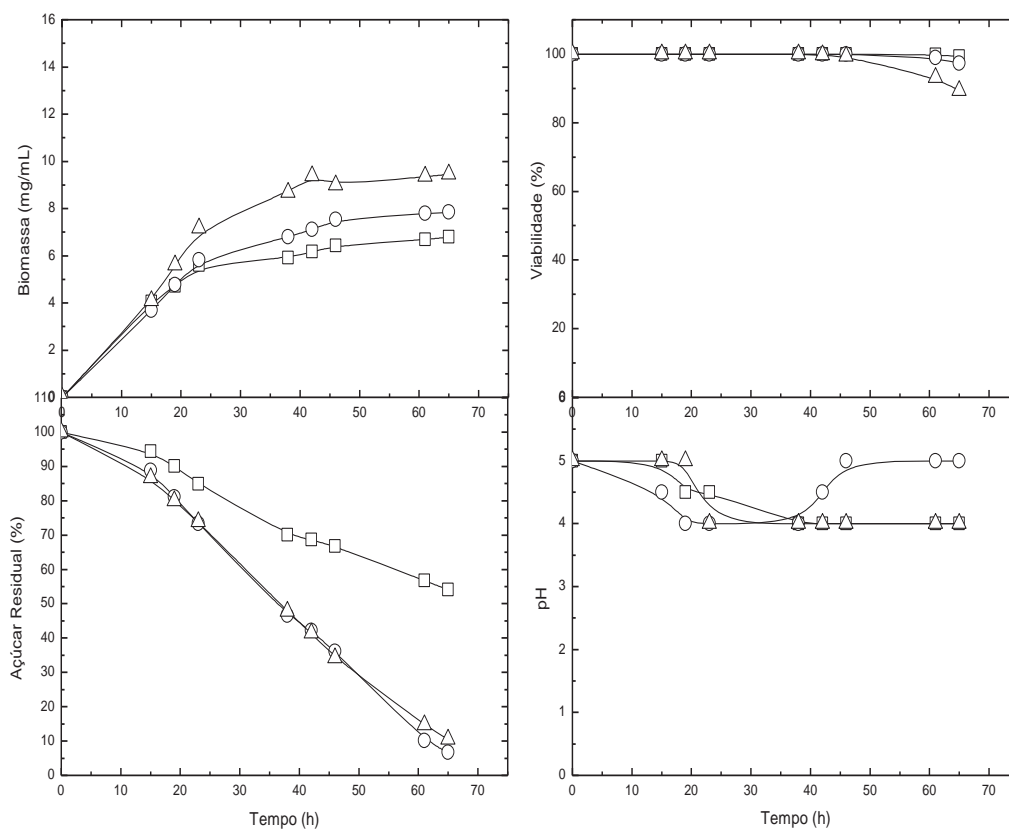


**Figura 13:** Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante **crescimento aeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ) sem fontes de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

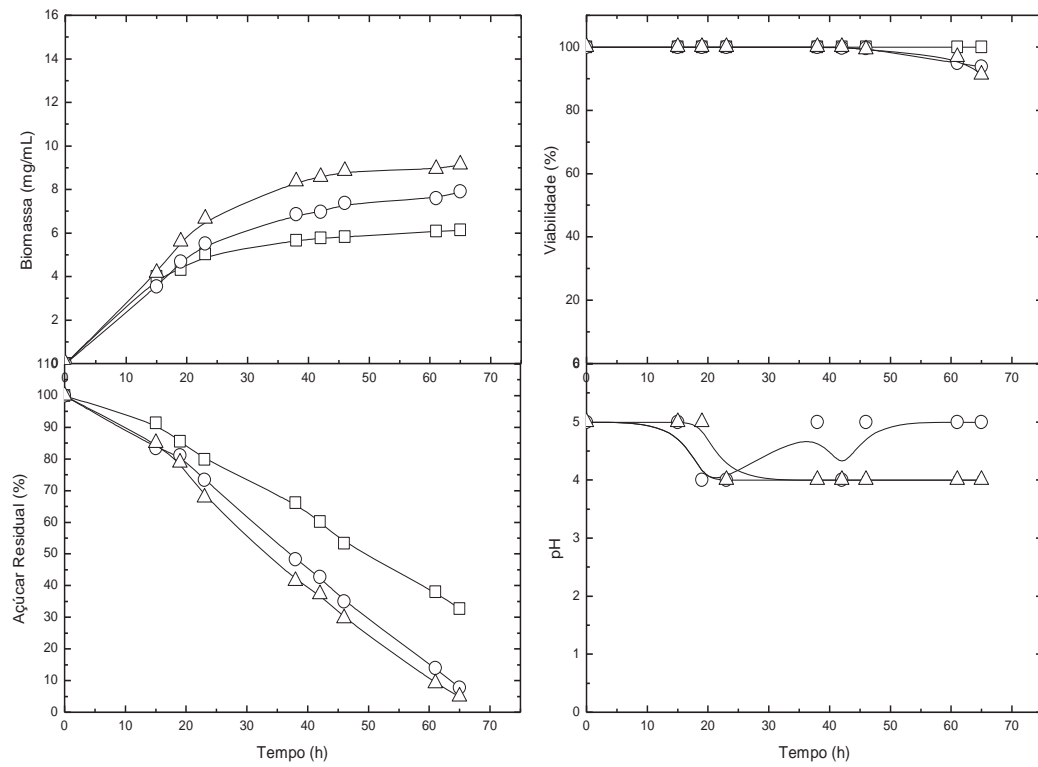


**Figura 14:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

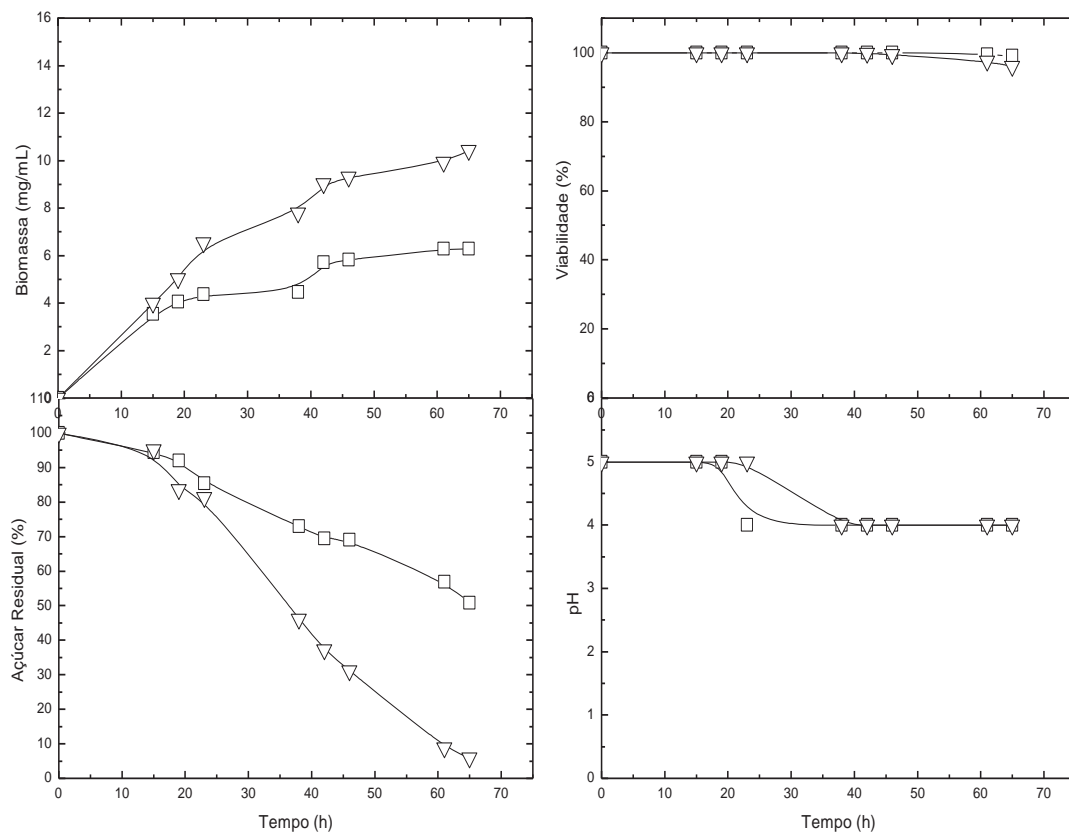




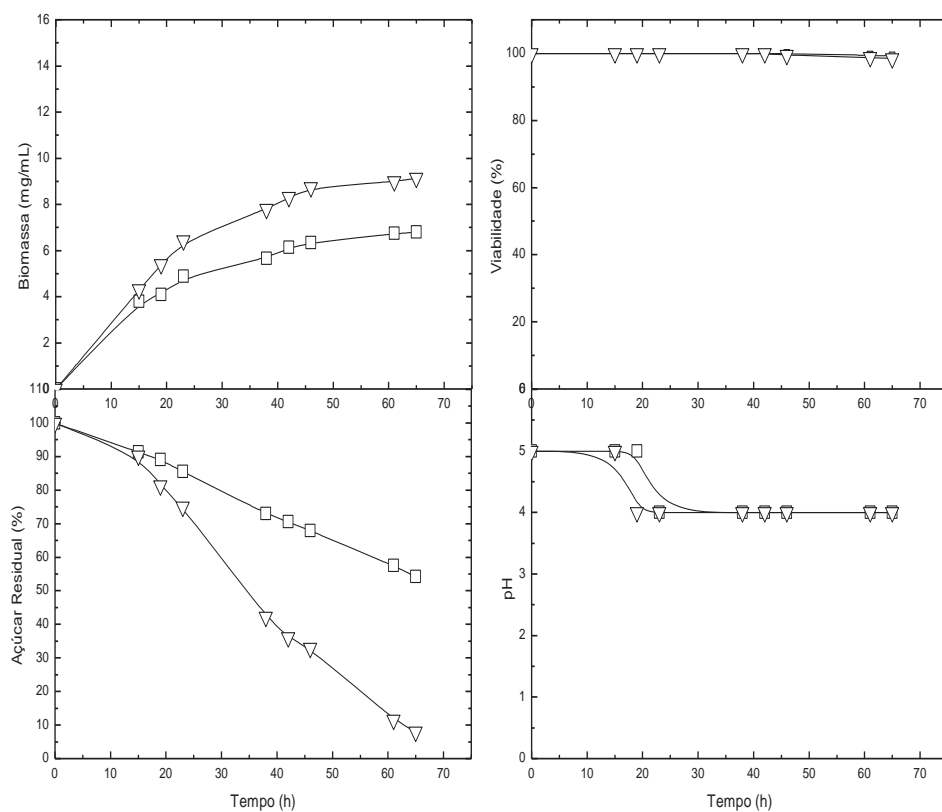
**Figura 15:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* **CAT**, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



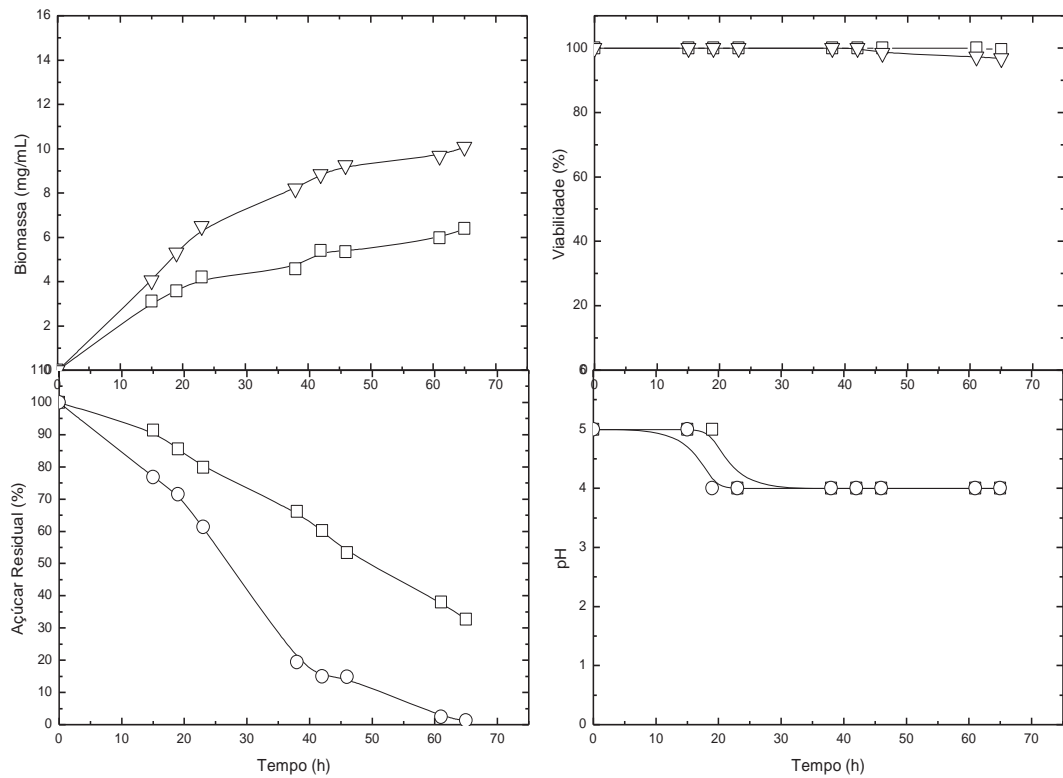
**Figura 16:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 17:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: casaminoácidos (▽), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0.



**Figura 18:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* **CAT**, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: casaminoácidos (▽), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0.



**Figura 19:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **30% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: casaminoácidos (▽), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0.

**Tabela 2:** Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE, CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo **30% (p/v) de sacarose** sem fontes de nitrogênio, 1% de peptona ou 1% de sulfato de amônio.

Formas de cultivo	Linhagens	Sacarose			1% Peptona			1% Sulfato de Amônio		
		Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)
Com Agitação 200(rpm)	PE	8,6	100	44,4	14,8	88	0,58	12,5	86	2,8
	CAT	9,2	100	50,6	15,0	64	1,17	12,3	91	14,4
	SA	8,3	98	31,3	13,9	70	2,4	12,3	73	4,4
Sem Agitação	PE	6,2	99	56,3	10	97	8,0	7,9	97	10,3
	CAT	6,8	99	54	9,3	89	10,5	7,8	97	6,7
	SA	6,0	99	33	8,7	91	5,0	7,9	93	7,8

Condições de fermentação: 30°C, pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 3:** Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE, CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo **30% (p/v) de sacarose** e 1% de casaminoácidos.

Formas de cultivo	Linhagens	Casaminoácidos		
		Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)
Sem agitação	PE	10,4	96	6,0
	CAT	9,2	98	8,0
	SA	10,0	97	1,2

Condições de fermentação: 30°C, pH inicial 5,0.

**Tabela 4:** Produção de etanol (v/v) pelas linhagens industriais, após 65 h de cultivo em mosto contendo **30% (p/v) de sacarose**, sem fontes de nitrogênio, 1% de peptona ou 1% de sulfato de amônio.

	Sacarose	Sulfato Amônio	Peptona
PE	8,6	13,4	13,9
CAT	9,2	13,0	13,3
SA	9,0	12,9	13,8

Condições de fermentação: 30°C sem agitação, pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

### 5.1.3. Estudos com sacarose 35%

As figuras 20 a 29 e as Tabelas 5, 6 e 7 mostram a variação dos parâmetros fermentativos em mostos com 35% (p/v) de sacarose suplementado com 1% ou 2% de peptona ou sulfato de amônio, com e sem agitação. Estes estudos foram utilizados para avaliar o efeito da concentração da fonte de nitrogênio no desempenho fermentativo das leveduras.

Nos meios agitados e sem suplementação da fonte de nitrogênio a produção de biomassa, o consumo de açúcar foi inferior e a viabilidade se manteve como foi observado nos estudos com concentração de 22% e 30% (p/v) de sacarose quando comparado com os cultivos com adição de peptona ou sulfato de amônio, e isto acontece devido o baixo consumo de açúcar. Os estudos com mosto com 35% (p/v) e suplementado com 1% (p/v) de peptona (Figuras 20, 21 e 22 e Tabela 5) mostraram que a produção de biomassa pelas linhagens PE, CAT e SA foram de 13mg/mL; 14,6mg/mL e 14,5 mg/mL, a viabilidade de 53,4%, 46,7% e 41,3%, e o consumo de açúcar eficiente, remanescendo no meio de cultura para as linhagens PE e SA 10% e CAT de 1,3%, respectivamente; e aparentemente foi a CAT a linhagem que consumiu mais eficientemente o açúcar presente no meio.

Nos cultivos com agitação e suplementados com 2% (p/v) de peptona as linhagens CAT e SA apresentaram maior produção de biomassa com 15,3 mg/mL, 15,4 mg/mL e PE 13,0 mg/mL e o consumo de açúcar de CAT e SA foi de 1,4%, e PE de 4,4% sendo superior quando comparado com 1% desta fonte de nitrogênio

(Tabela 5). A viabilidade diminuiu mais rapidamente após 38 horas de fermentação quando comparado com a utilização de 1% de fonte de nitrogênio. Pode-se observar com estes estudos que uma concentração maior da fonte de nitrogênio melhora o desempenho fermentativo das linhagens, e que a queda no valor da viabilidade celular ocorre, principalmente, após 38h de cultivo, momento em que praticamente acontece a estabilização de consumo de açúcar.

O desempenho fermentativo das linhagens industriais em meios suplementados com de 1% ou 2% (p/v) de sulfato de amônio (Tabela 6 e Figuras 20 a 25) foi inferior ao obtidos na complementação com peptona. Este comportamento foi observado para todas as linhagens industriam estudadas (RED, PE, CAT e SA). Apesar da peptona induzir melhores condições de fermentação, em algumas condições o sulfato de amônio também é eficiente, como é na fermentação com as linhagens CAT e SA.

Os cultivos sem agitação foi realizados com a adição de 2% (p/v) de sulfato de amônio ou peptona e estão mostrados na Tabela 7 e nas Figuras 26, 27, 28 e 29. Estes resultados comparam os parâmetros fermentativos das linhagens industriais e isoladas. A comparação entre os cultivos agitados e não agitados mostra que a agitação propicia melhores condições de fermentação, induzida pela presença do oxigênio e/ou por propiciar homogeneização do meio de cultura durante o processo fermentativo. A produção de biomassa das linhagens isoladas foi inferior quando comparadas com as linhagens industriais, a linhagem RG foi de 3,6 mg/mL, a viabilidade foi mantida com 99% e o açúcar remanescente de 20% (p/v), indicando que mesmo com baixa produção de biomassa o isolado é capaz de consumir uma quantidade considerável de açúcar, o que sugere que a sua presença como pode interferir negativamente no processo fermentativo. O isolado LS deve ser a uma das linhagens industriais adicionadas no início da safra.

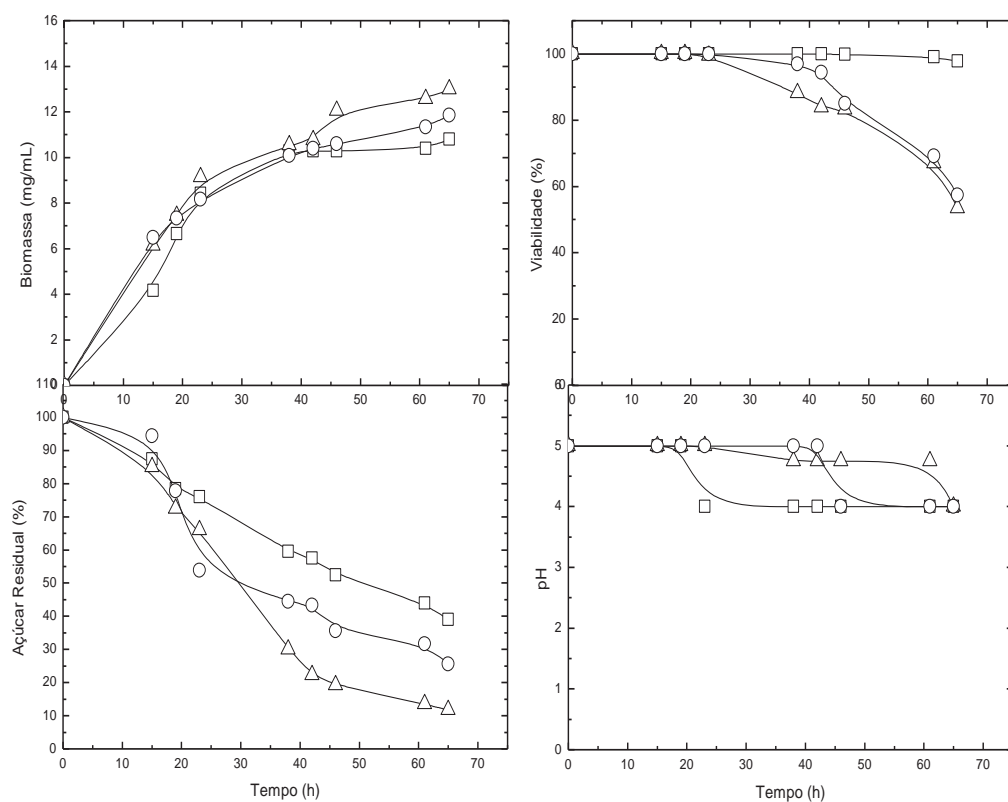
A análise dos dados mostra que a suplementação nutricional, com uma fonte de nitrogênio, é fundamental para propiciar maior acúmulo de biomassa, utilização eficiente da fonte de carbono e conseqüentemente maior produção de etanol. A viabilidade celular permaneceu alta em todas as condições estudadas e a



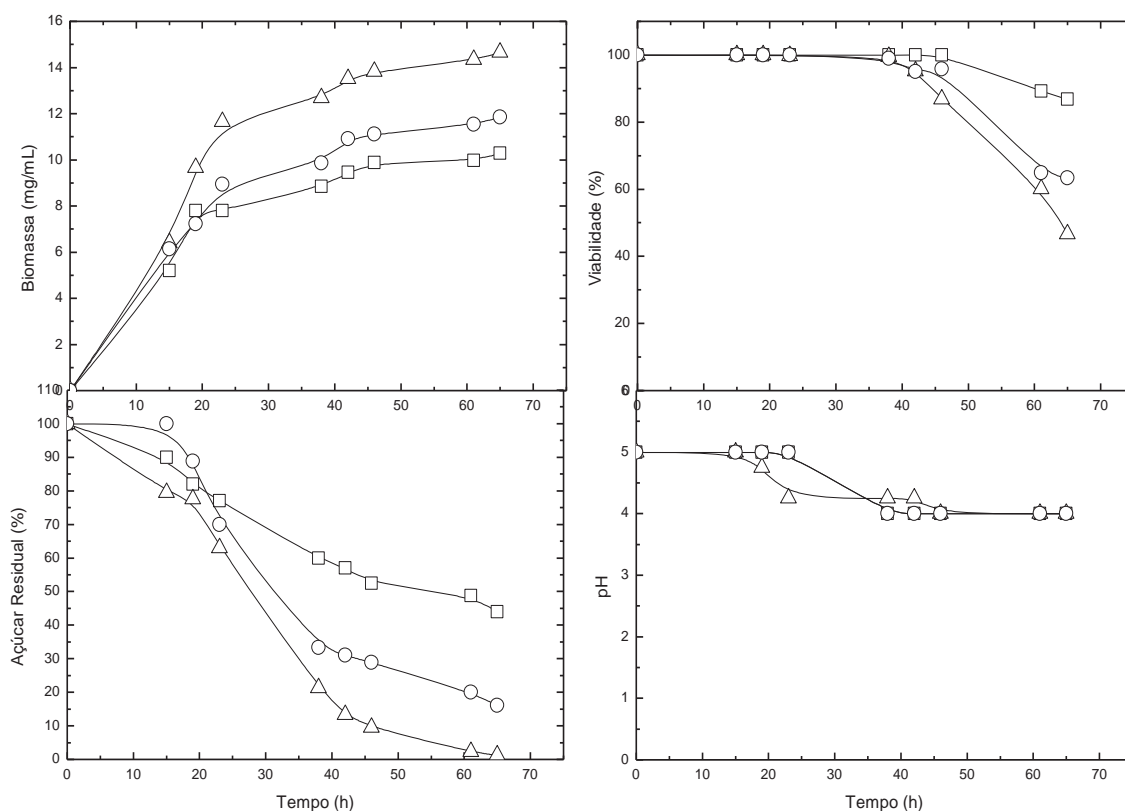
queda só foi observada após a exaustão da fonte de carbono especialmente com a suplementação com peptona.

A fermentação de mostos concentrados é importante para aumentar a produção de etanol e a conseqüente redução da vinhaça. As Tabelas 8 e 9 mostram a quantidade de etanol nas diferentes condições de cultura. As maiores concentrações foram em torno 14-15% (v/v), nos meios suplementados com peptona. Na análise destes resultados tem que se considerar a perda de etanol provocada pela evaporação, principalmente nos cultivos agitados. A Tabela 10 mostra a concentração de etanol após 38 e 65 horas, em condições de agitação e estático. Neste controle uma solução aquosa de etanol foi colocada juntamente com os frascos de cultivo, e nos tempos definidos foi feita a determinação da concentração de etanol.

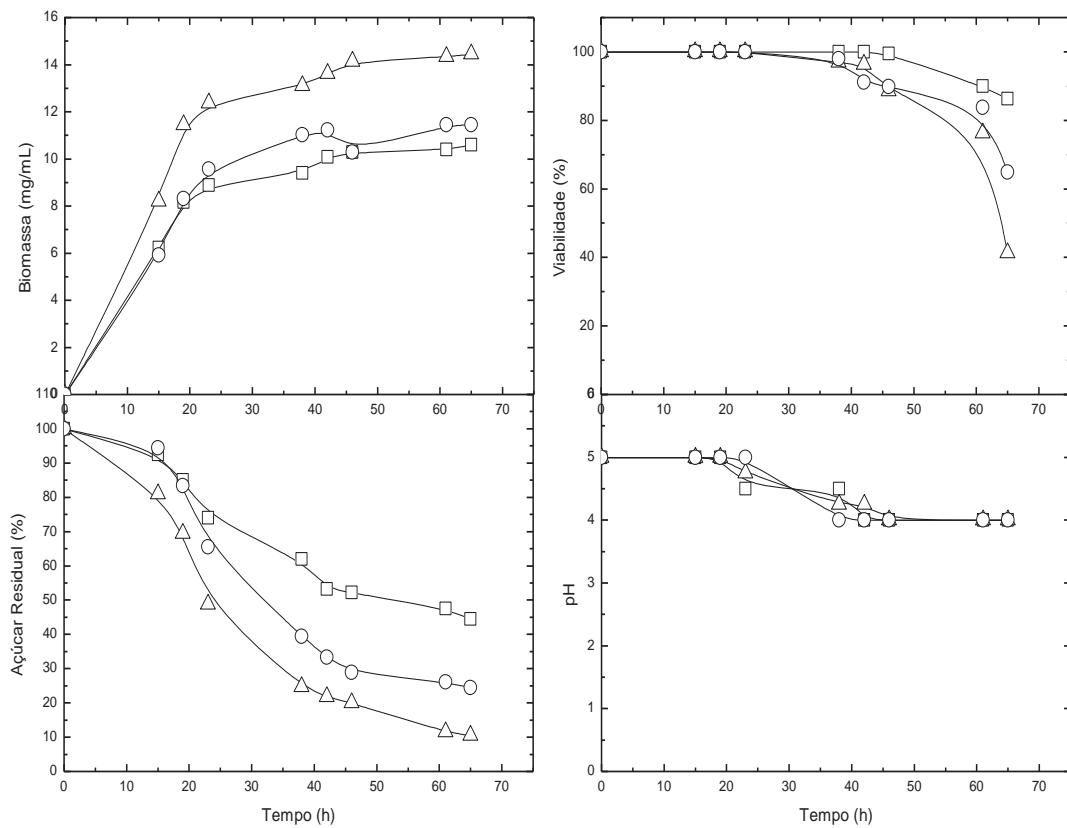
Pode-se observar uma perda considerável causada pela evaporação. A expectativa com este tipo de resultado é que concentrações mais altas de etanol podem ser obtidas no processo fermentativo. Este resultado tem importância aplicada, pois indica que leveduras industriais podem tolerar concentrações de etanol muito acima do que é atualmente praticada se utilizadas condições de fermentação que permitam as linhagens fermentar próximas do seu limite de tolerância ao etanol.



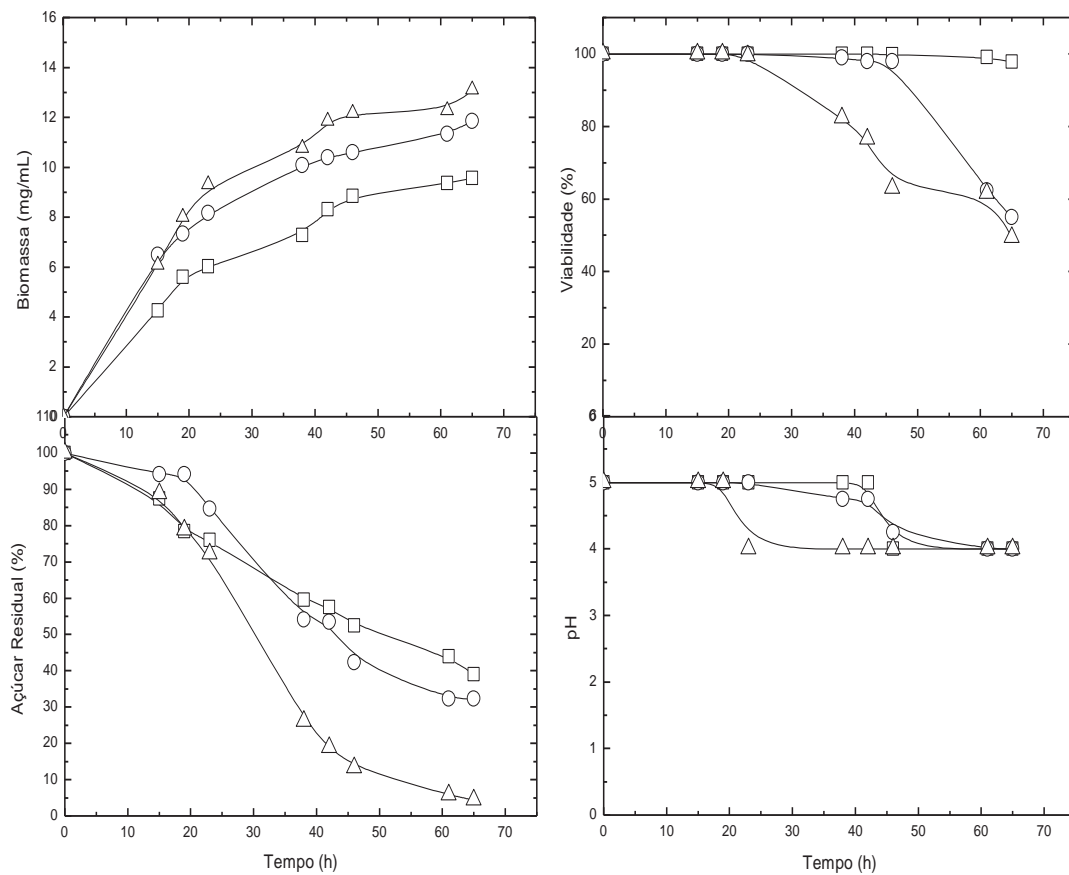
**Figura 20:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante **crescimento aeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



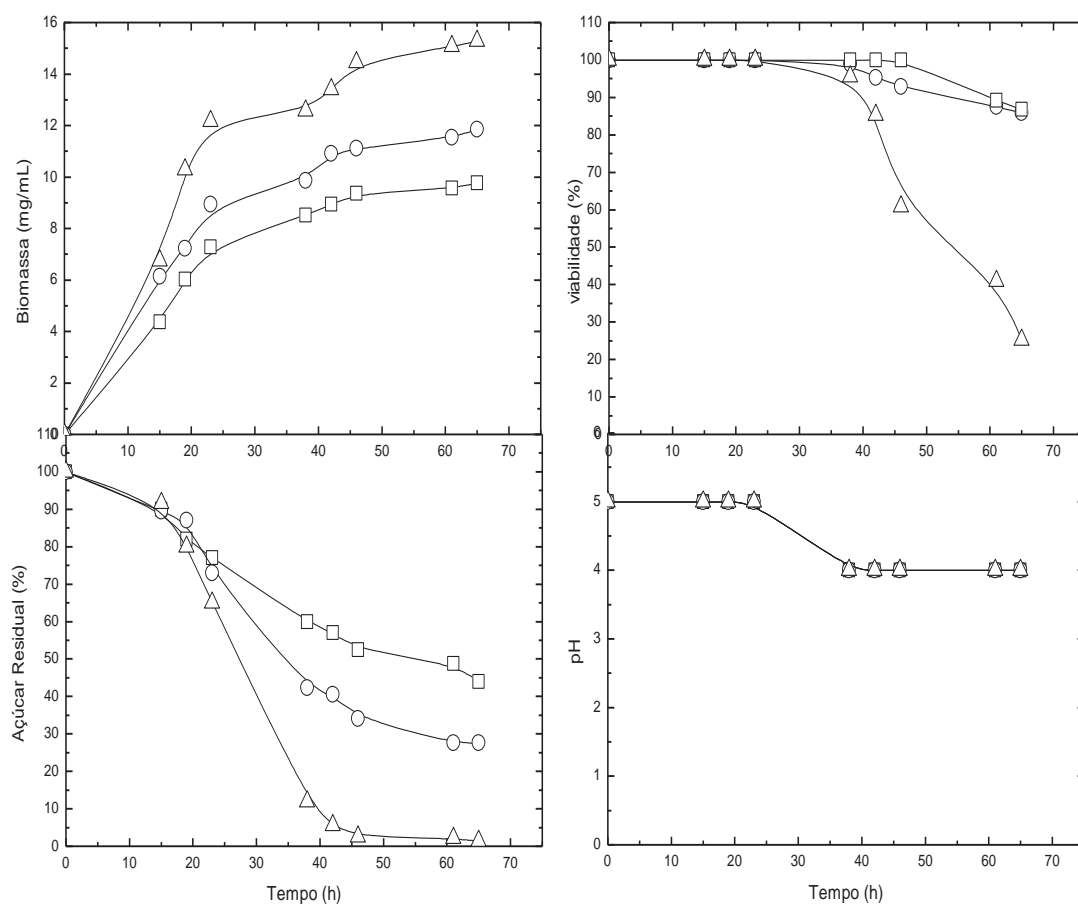
**Figura 21:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT durante **crescimento aeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio ( $\circ$ ), peptona ( $\Delta$ ), sem fonte de nitrogênio ( $\square$ ). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



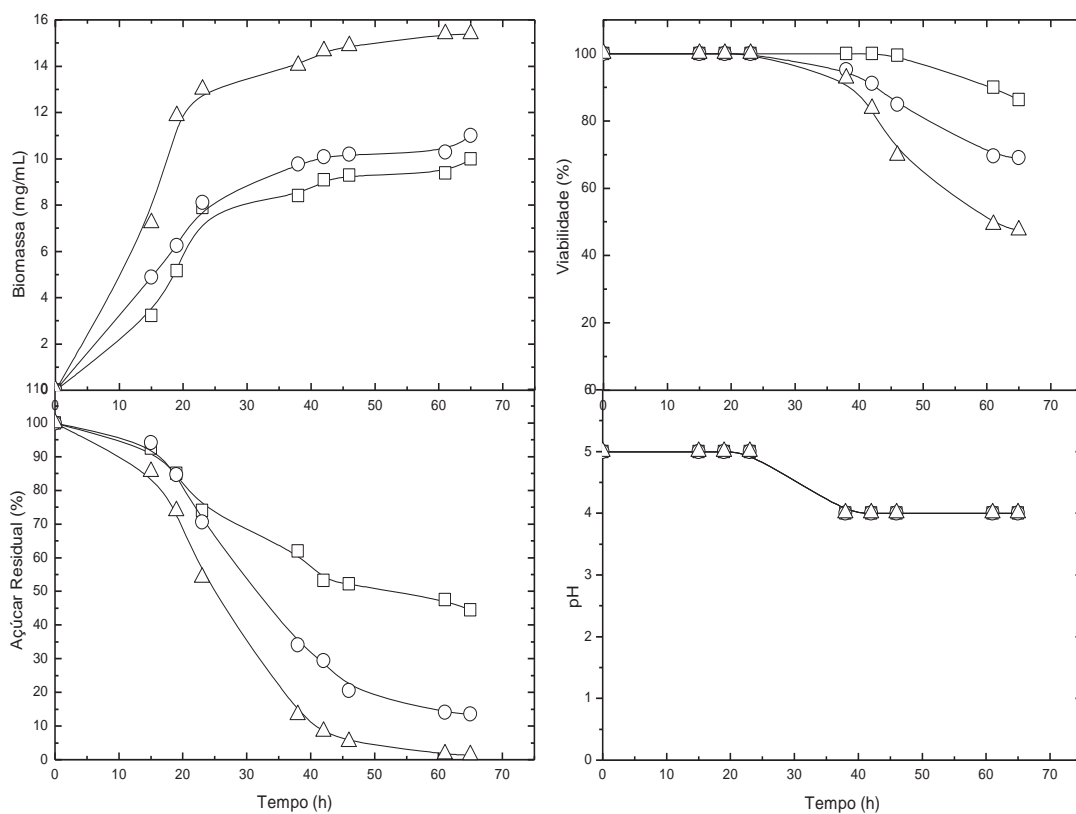
**Figura 22:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA durante **crescimento aeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



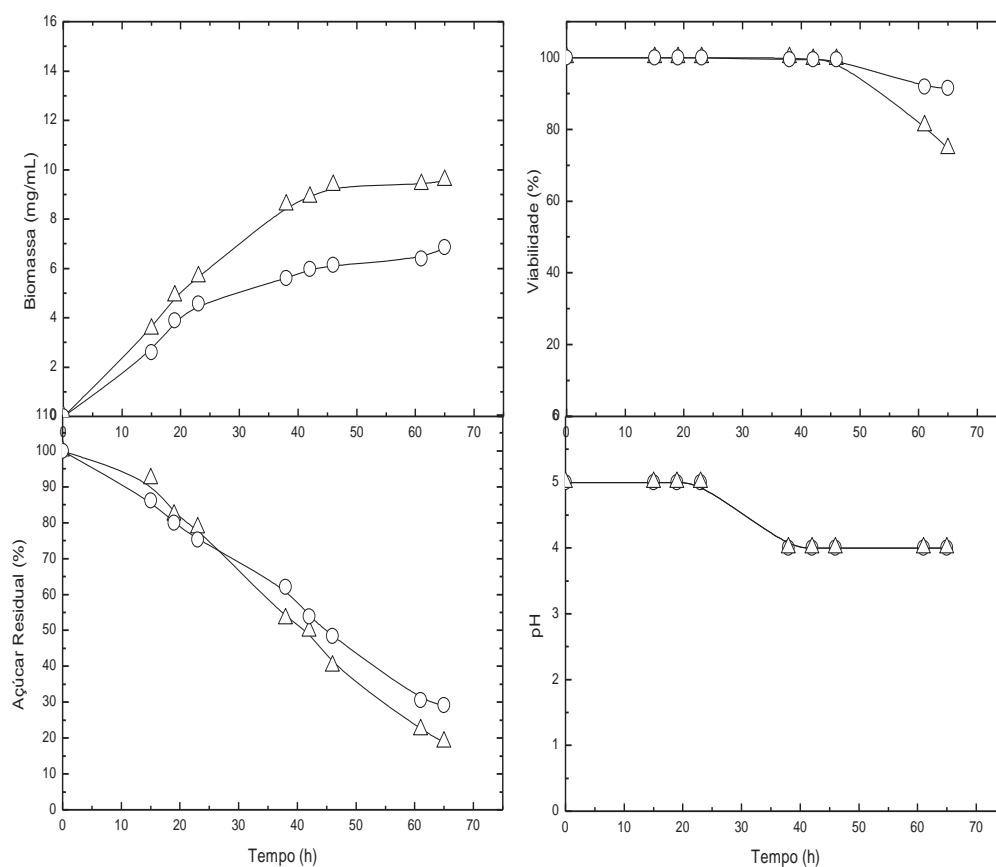
**Figura 23:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE durante **crescimento aeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo **2% (p/v) de fonte de nitrogênio**: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 24:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT durante crescimento aeróbico em mosto com 35% (p/v) de sacarose, contendo 2% (p/v) de fonte de nitrogênio: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

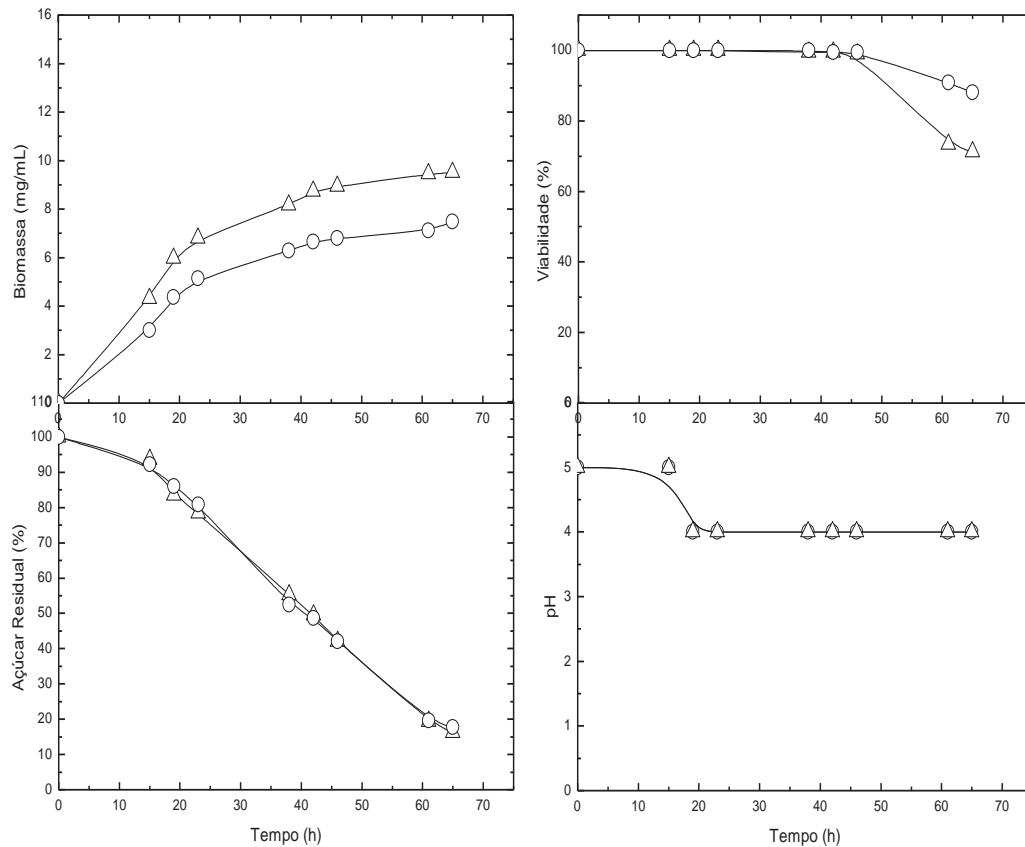


**Figura 25:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA durante **crescimento aeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo **2% (p/v) de fonte de nitrogênio**: sulfato de amônio (○), peptona (Δ), sem fonte de nitrogênio (□). Condições de cultivo: 30°C, 200 rpm e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

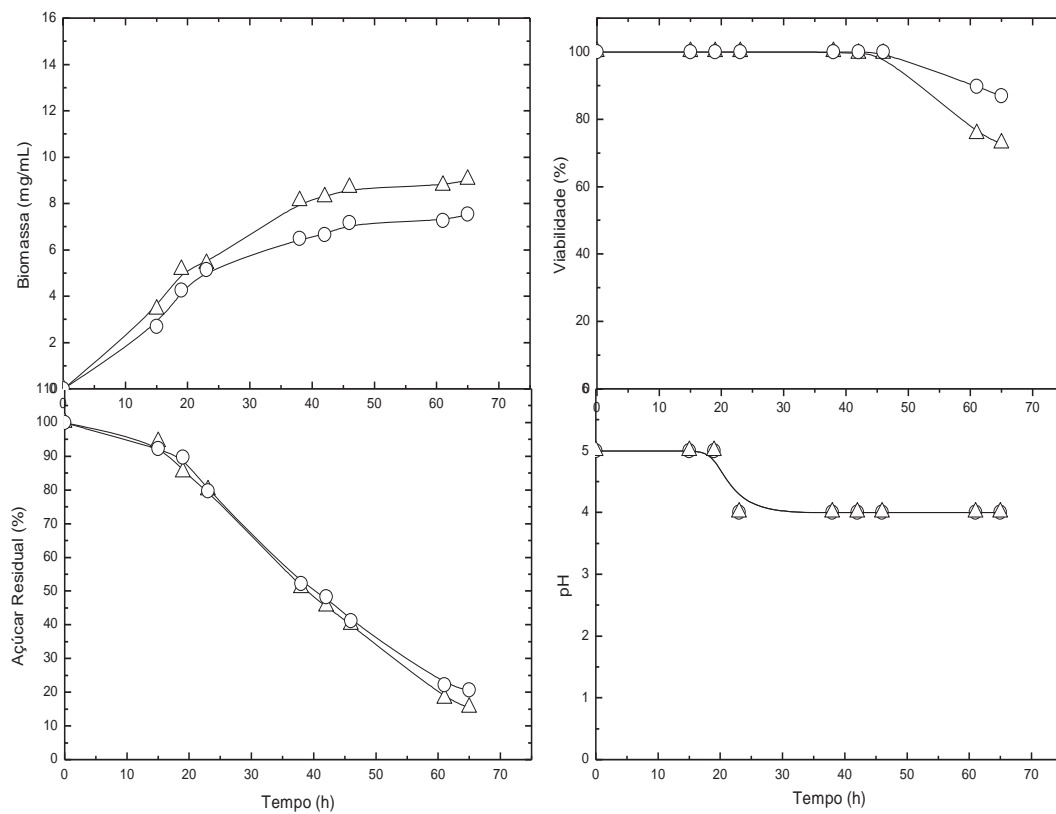


**Figura 26:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo **2% (p/v) de fonte de nitrogênio**: sulfato de amônio (○), peptona (Δ). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

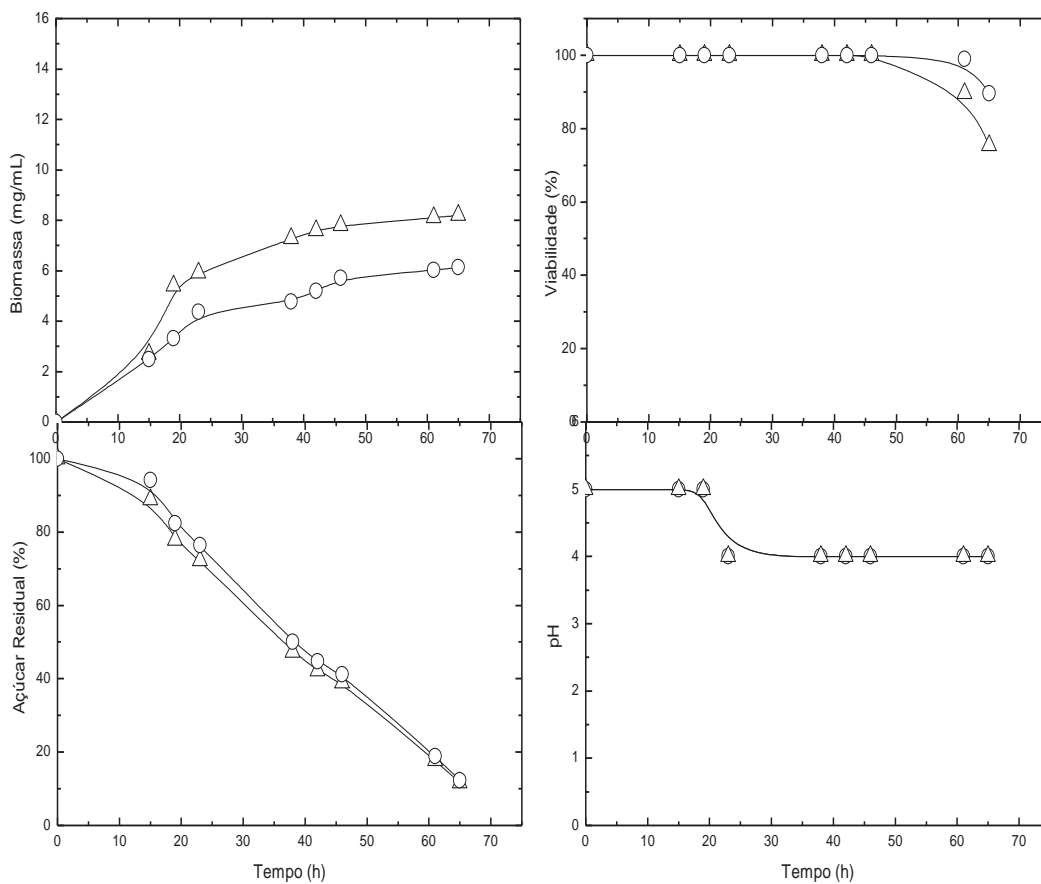




**Figura 27:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* CAT durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo **2% (p/v) de fonte de nitrogênio**: sulfato de amônio (○), peptona (Δ). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 28:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo **2% (p/v) de fonte de nitrogênio**: sulfato de amônio (○), peptona (Δ). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 29:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* RED durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **35% (p/v) de sacarose**, contendo **2% (p/v) de fonte de nitrogênio**: sulfato de amônio (○), peptona (Δ). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 5:** Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE, CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo **35% (p/v) de sacarose** sem fontes de nitrogênio, 1% de peptona ou 2% de peptona, **com agitação**.

Linhagens	Tempo (h)	Sacarose			1% Peptona			2% Peptona		
		Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)
PE	38	10	100	60	10,5	88	30	10,7	82,4	26
	65	11,9	97,9	39	13	53,4	11,7	13	49,5	4,4
CAT	38	9,8	100	60	12,7	99	21,3	12,6	95,5	12
	65	11,9	86,8	44	14,6	46,7	1,3	15,3	25	1,4
SA	38	9,4	100	62	13	97	24,8	14	92,5	13,3
	65	10,6	86,2	44,5	14,5	41,3	10,5	15,4	47,5	1,4

Condições de fermentação: 30°C, a 200 rpm, pH inicial 5,0.

**Tabela 6:** Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens PE CAT e SA após 65 h de cultivo em mosto contendo **35% (p/v) de sacarose** sem fontes de nitrogênio, 1% de Sulfato de amônio ou 2% de Sulfato de amônio, **com agitação**.

Linhagens	Tempo (h)	Sacarose			1% Sulfato de Amônio			2% Sulfato de Amônio		
		Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)
PE	38	10	100	60	10,3	97	44	7,2	99	54
	65	11,9	97,9	39	10,8	57,5	25,5	9,5	55	32
CAT	38	9,8	100	60	8,8	99	33	8,5	99	42,4
	65	11,9	86,8	44	10,3	63	16	9,7	87,6	27,6
SA	38	9,4	100	62	11	98	39	9,8	95	34
	65	10,6	86,2	44,5	11,4	64,9	24,4	10,6	69	13,5
RED	38	-	-	-	8,8	93	44	7,7	95	50
	65	-	-	-	10	70	25,5	8,3	82	25

Condições de fermentação: 30°C, a 200 rpm, pH inicial 5,0.

**Tabela 7:** Produção de biomassa (mg/mL), viabilidade (%) e consumo de açúcar (%) pelas linhagens, após 65 h de cultivo em mosto contendo **35% (p/v) de sacarose**, suplementado com 2% de peptona ou 2% de sulfato de amônio, **sem agitação**.

Linhagem	Tempo (h)	2% Peptona			2% Sulfato Amônio		
		Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)
PE	38	8,6	100	53	5,6	99	62
	65	9,5	74,5	18,8	6,8	91,5	29
CAT	38	8,0	99	52,5	6,3	100	55
	65	9,5	71	17,8	7,4	88	16
SA	38	8,0	100	52	6,5	100	51
	65	9,0	72,8	20,6	7,5	86,9	15,5
LS	38	7,2	99	50	6,4	99	58
	65	9,7	70,7	12,9	8,7	97,7	15,5
RG	38	1,9	100	79	2,0	100	65
	65	3,6	99	20,5	2,8	99	21,7
RED	38	7,3	100	47	4,8	100	50
	65	8,2	75,3	11,6	6,0	89,6	12

Condições de fermentação: 30°C, sendo o meio contendo sulfato de amônio reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 8:** Produção de etanol (v/v) pelas linhagens, após 65 h de cultivo em mosto contendo **35% (p/v) de sacarose**, sem fontes de nitrogênio, 1 e 2% de peptona e sulfato de amônio, com agitação

Linhagem	Sem Suplementação	1% Peptona	2% Peptona	1% Sulfato	2% Sulfato
PE	6,8	11,6	11,5	6,8	6,6
CAT	8,4	13,4	13,4	12,6	8,4
SA	8,2	12	12,2	8,2	9,8
RED				8	7,8
LS		15,2	13,6		
RG		14,6	13,9		

Condições de fermentação: 30°C, a 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 9:** Produção de etanol (v/v) pelas linhagens, após 65 h de cultivo em mosto contendo **35% (p/v) de sacarose**, sem fontes de nitrogênio, 2% de peptona ou 2% de sulfato de amônio, **sem agitação**.

Linhagem	2% Peptona	2% sulfato
PE	14,2	11
CAT	13	12,8
SA	13,6	13,2
LS	14,8	12,8

Condições de fermentação: 30°C, pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 10:** Efeito da condição de cultivo na perda de etanol causada pela evaporação.

Tempo (h)	% Etanol (v/v)	
	Com Agitação	Sem Agitação
0	10,2	10,2
38	7,4	8,6
65	5,4	8,0

Condições de fermentação: temperatura de cultivo 30°C, frasco agitado (200rpm).

### 5.3. Determinação da Trealose

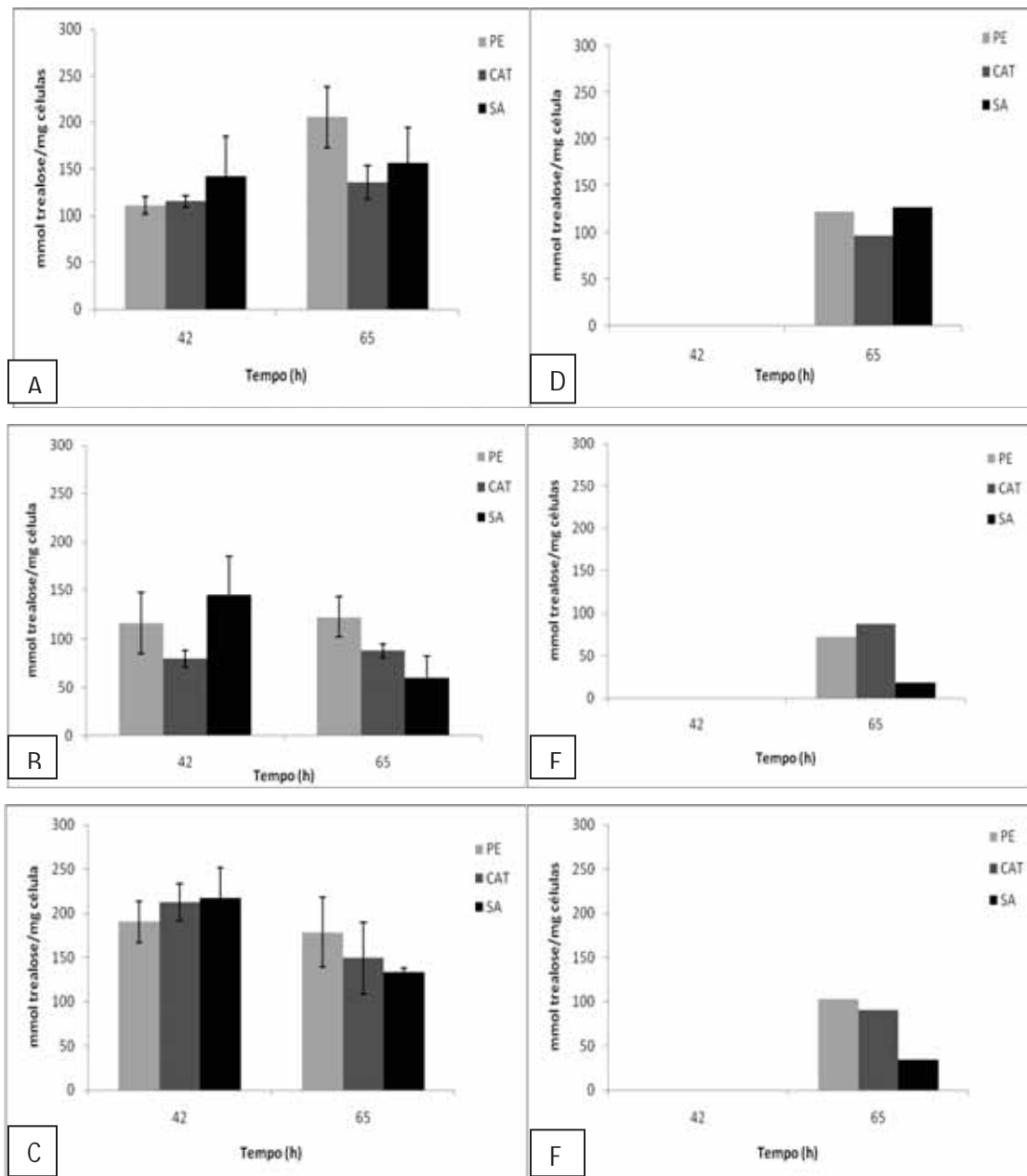
As Figuras de 30 a 34 mostram a produção de trealose pelas linhagens industriais PE, CAT, SA em cultivos agitados e não agitados, com e sem suplementação, nos meios contendo sacarose 22%, 30% e 35% (p/v).

Observamos que as linhagens cultivadas em meios contendo sacarose 30% e 35% (p/v) e com agitação a viabilidade diminuiu depois de 42 horas de fermentação quando suplementado com fontes de nutrientes, tempo em que ocorre a exaustão do açúcar no meio, neste período a produção de trealose foi maior para algumas linhagens enquanto que em 65 horas foi inferior. Nestes experimentos nos meios suplementados com peptona, a produção de trealose pelas linhagens foi maior que em meios suplementados com sulfato de amônio e sem suplementação, neste caso a linhagem PE a produção de trealose foi diferente comparado com SA e CAT (Figura 31 e 33). Segundo Miranda *et.al.* (2009) a presença de oxigênio no meio diminui a produção de trealose pelas linhagens, talvez por propiciar condições menos estressante, do ponto de vista fermentativo.

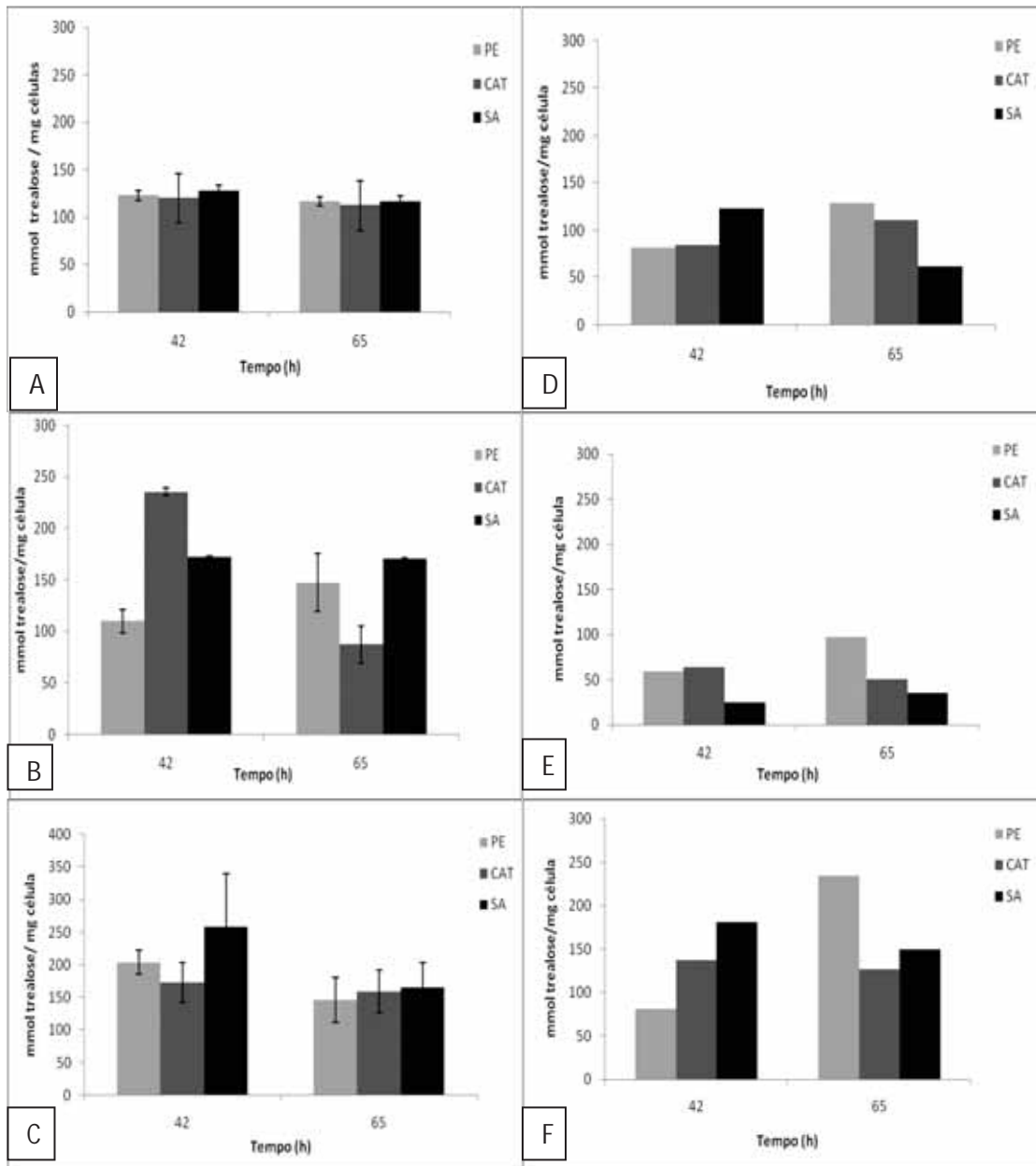
Em estudos realizados sem agitação observou-se que a produção de trealose foi maior que nos experimentos agitados (Figuras 30, 31, 32 e 34). Este comportamento também foi observado por Miranda *et. al.* (2009), e a maior produção de trealose em meio não agitado foi associado ao melhor desempenho de linhagens industriais na fermentação da sacarose.

As Figuras de 31 a 33 mostram a quantidade de trealose produzida pelas linhagens industriais em cultivos agitados e não agitados, com e sem suplementação, nos meios contendo sacarose 22%, 30% e 35% (p/v). Como amplamente descrito na literatura, a trealose é um dissacarídeo envolvido com mecanismos de estresse celular. Durante o processo fermentativo a levedura é submetida a vários tipos de estresse: osmótico, etanólico, térmico e outros. Estes fatores estressantes podem ser relacionados com a concentração de trealose produzida e o desempenho fermentativo das linhagens. No geral, observou-se que nos cultivos não agitados as linhagens apresentaram maiores quantidades de trealose, e que a produção do dissacarídeo variou entre as linhagens e com a fonte de nitrogênio. Os dados com trealose ainda não permitem conclusões detalhadas, sendo necessária a realização de mais experimentos para obterem-se melhores resultados.

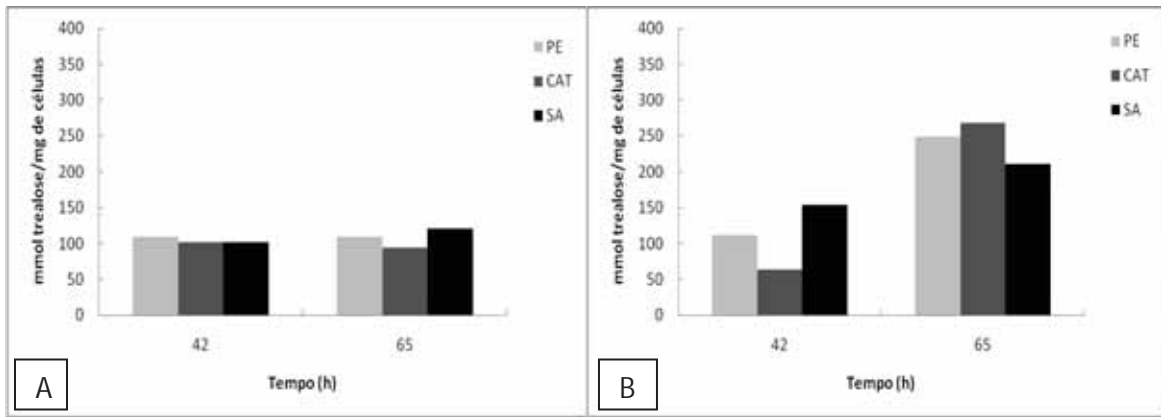




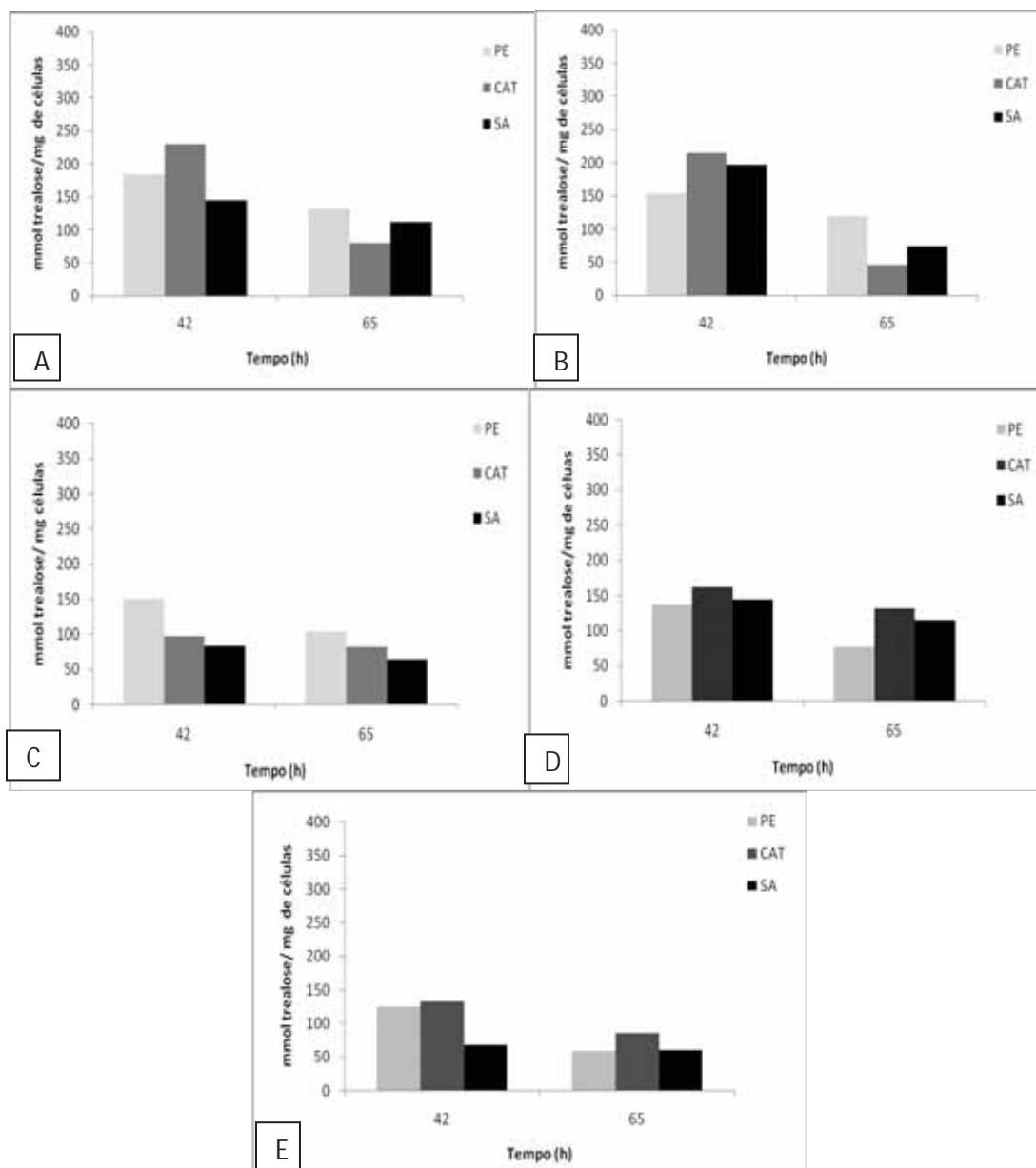
**Figura 30:** Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT e SA, cultivadas sem agitação (A, B e C) e com agitação (D, E e F) em mosto com **sacarose 22% (p/v)**, contendo 1% de fonte de nitrogênio: sem suplementação de nutriente (A e D), sulfato de amônio (B e E) peptona (C e F). O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M.



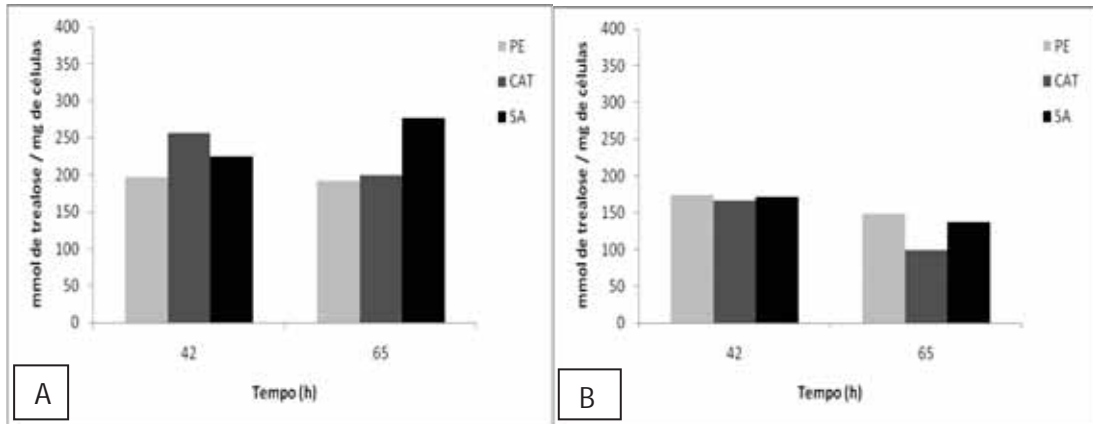
**Figura 31:** Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT e SA, cultivadas sem agitação (A, B e C) e com agitação (D, E e F) em mosto com **sacarose 30% (p/v)**, contendo 1% de fonte de nitrogênio: sem suplementação de nutriente (A e D), sulfato de amônio (B e E) peptona (C e F). O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 32:** Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT e SA, cultivadas sem agitação em mosto com **sacarose 30% (p/v)**, contendo 1% de fonte de nitrogênio: sem suplementação de nutriente (A), casaminoácidos (B).



**Figura 33:** Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT, SA, cultivadas com agitação, em mosto com **sacarose 35% (p/v)**, contendo fontes de nitrogênio: 1% de peptona (A), 2% peptona (B), 1% de sulfato de amônio (C), 2% de sulfato de amônio (D) sem suplementação de nutriente (E). O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 34:** Produção de trealose por *S. cerevisiae* pelas cepas PE, CAT, SA cultivadas sem agitação, em mosto com **sacarose 35% (p/v)**, contendo fontes de nitrogênio: 2% de peptona (A), 2% de sulfato de amônio (B). O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M.

#### 5.4. Determinação da Invertase

Os resultados da atividade da invertase das linhagens PE, CAT e SA utilizando sacarose 35% (p/v) e 1% e 2% de peptona ou 1% e 2% de sulfato de amônio com e sem agitação estão mostrados na Tabela 11 e 12 e Figura 35. Podemos observar que a atividade da invertase foi diferente para todas as linhagens e a SA apresentou maior atividade da enzima. Esta variação segundo Vitolo, 1989 pode ocorrer devido às intensas modificações conformacionais e químicas sofridas pela parede celular durante os processos de crescimento e multiplicação da levedura, causando posicionamentos diversos e aleatórios das moléculas da enzima no espaço periplasmático, além de mudanças na própria estrutura da proteína, tornando-a mais ou menos acessíveis à molécula de substrato. E segundo Laluece *et.al.* (1991) a atividade da invertase é dependente da linhagem de cada levedura.

Segundo PAPArazi 2006, a etapa de lavagem das células em tampão acetato permitiu a eliminação da possível presença de invertase livre presente no meio de cultura; e assim, ao adicionar a solução de sacarose para iniciar o teste, pode se dizer que toda a atividade da invertase está associada à célula, seja no espaço periplasmático, na parede celular ou liberada no meio no transcorrer da incubação. Os ensaios fermentativos da atividade da invertase são resultados da atividade da invertase extracelular, uma vez que atividade da invertase intracelular não foi quantificada.

Nos cultivos realizados sem agitação, para a maioria das linhagens, foram observadas maiores atividades da invertase que os cultivos com agitação, mesmo com agitação consumindo mais açúcar, conseqüentemente a presença de oxigênio afeta a sua atividade. Como a fermentação de sacarose 35% (p/v) é mais eficiente nos meios agitados, este resultado pode ser devido à maior concentração de etanol; o que está de acordo com Fontana *et.al.* (1992), que mostraram que a invertase sofre influência da concentração de etanol, das características do meio e da linhagem da levedura.

Nestes experimentos foi utilizada também a linhagem RED STAR. O objetivo destas medidas foi o de tentar correlacionar a atividade invertásica com o

desempenho fermentativo. Observou-se que a atividade enzimática variou entre as linhagens e com a condição de fermentação. As linhagens SA e RED mostraram maiores atividades, pois a SA apresentou maior consumo de açúcar, mas os dados obtidos não permitem concluir sobre a importância da atividade invertásica da definição do desempenho fermentativo.

**Tabela 11:** Atividade da invertase pelas linhagens industriais, após 65 h de cultivo em mosto contendo **sacarose 35 % (p/v)**, com 1% e 2% de peptona ou 1% e 2% de sulfato de amônio e com agitação.

Fonte de Nutriente	Linhagens	Biomassa (mg/mL)	Biomassa/ Diluição	Atividade Enzimática ( $\mu\text{mol /min/mL}$ )	Atividade Específica U/mg
1% Peptona	PE	13,31	0,40	1,59	3,97
	CAT	14,56	0,44	1,37	3,11
	SA	13,1	0,39	2,40	6,15
2% Peptona	PE	11,44	0,34	1,67	4,91
	CAT	14,56	0,44	1,61	3,65
	SA	15,4	0,46	3,84	8,34
1% Sulfato	PE	10,81	0,32	1,71	5,34
	CAT	10,29	0,31	1,39	4,48
	SA	11,44	0,34	3,20	9,41
	RED	10,08	0,30	6,05	20,16
2% Sulfato	PE	9,56	0,29	1,58	5,45
	CAT	9,77	0,29	1,73	5,96
	SA	10,61	0,32	2,08	6,50
	RED	8,32	0,25	4,01	16,04

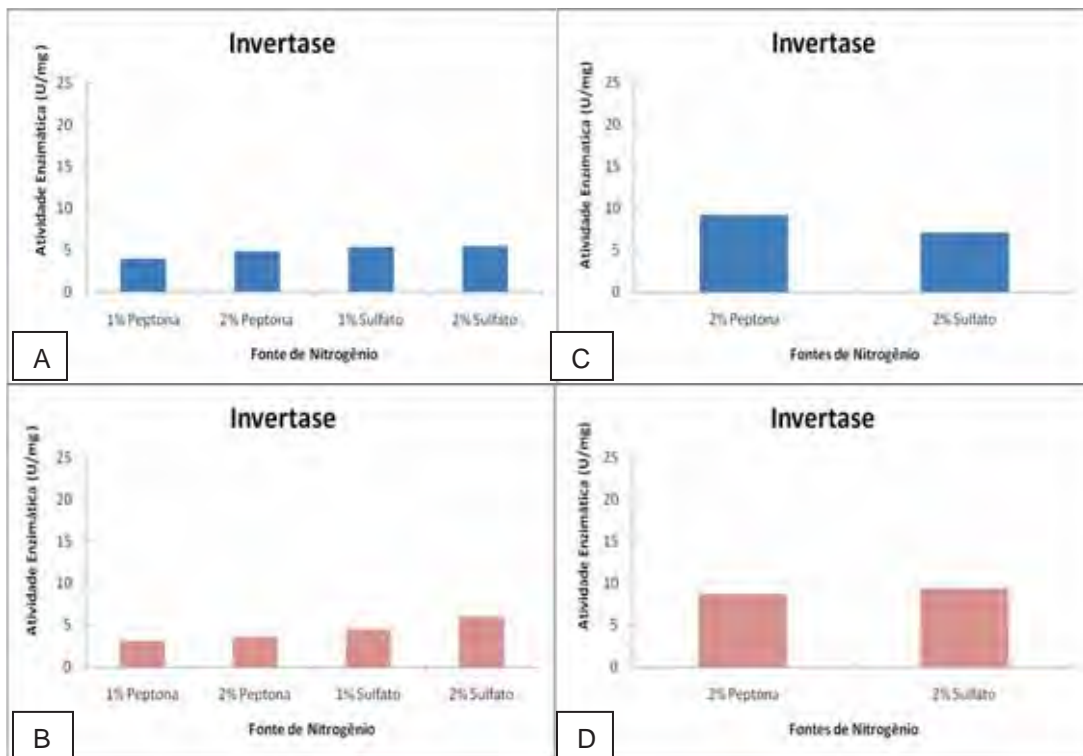
Condições de fermentação: 30°C, a 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 12:** Atividade da invertase pelas linhagens industriais, após 65 h de cultivo em mosto contendo **sacarose 35 % (p/v)**, com 2% de peptona ou 2% de sulfato de amônio, **sem agitação**.

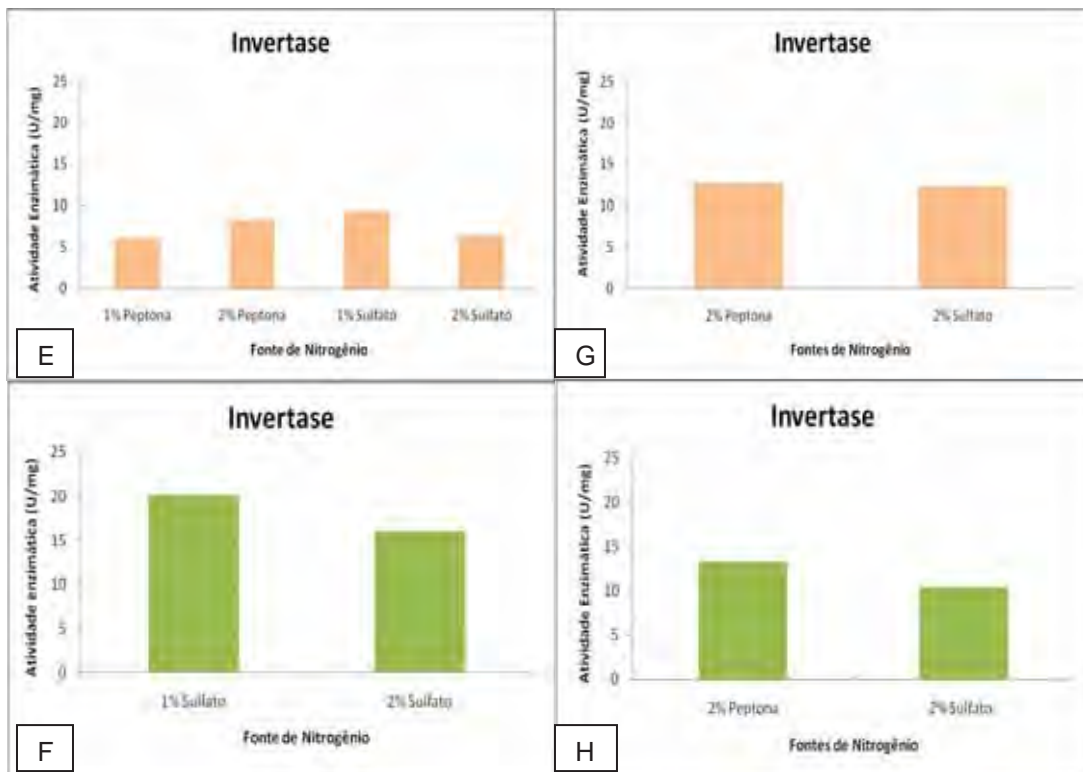
Fonte de Nutriente	Linhagens	Biomassa (mg/mL)	Biomassa/Diluição	Atividade Enzimática ( $\mu\text{mol /min/mL}$ )	Atividade Específica U/mg
2% Peptona	PE	9,67	0,29	3,47	9,24
	CAT	9,36	0,28	3,44	8,72
	SA	9,04	0,27	5,35	12,7
	RED	8,21	0,25	3,31	13,24
2% Sulfato	PE	6,86	0,2	2,11	7,1
	CAT	7,48	0,22	2,0	9,43
	SA	7,69	0,23	3,44	12,36
	RED	6,13	0,18	1,87	10,38

Condições de fermentação: 30°C, pH inicial 5,0, sendo o meio contendo sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.





**Figura 35:** Atividade da invertase por *S. cerevisiae* pelas linhagens PE (A e C), CAT (B e D), cultivadas **com agitação** (A, B) e **sem agitação** (C e D), em mosto com **sacarose 35% (p/v)**, contendo fontes de nitrogênio: 1% de peptona ou 2% de peptona ou 1% de sulfato de amônio ou 2% de sulfato de amônio. O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M.

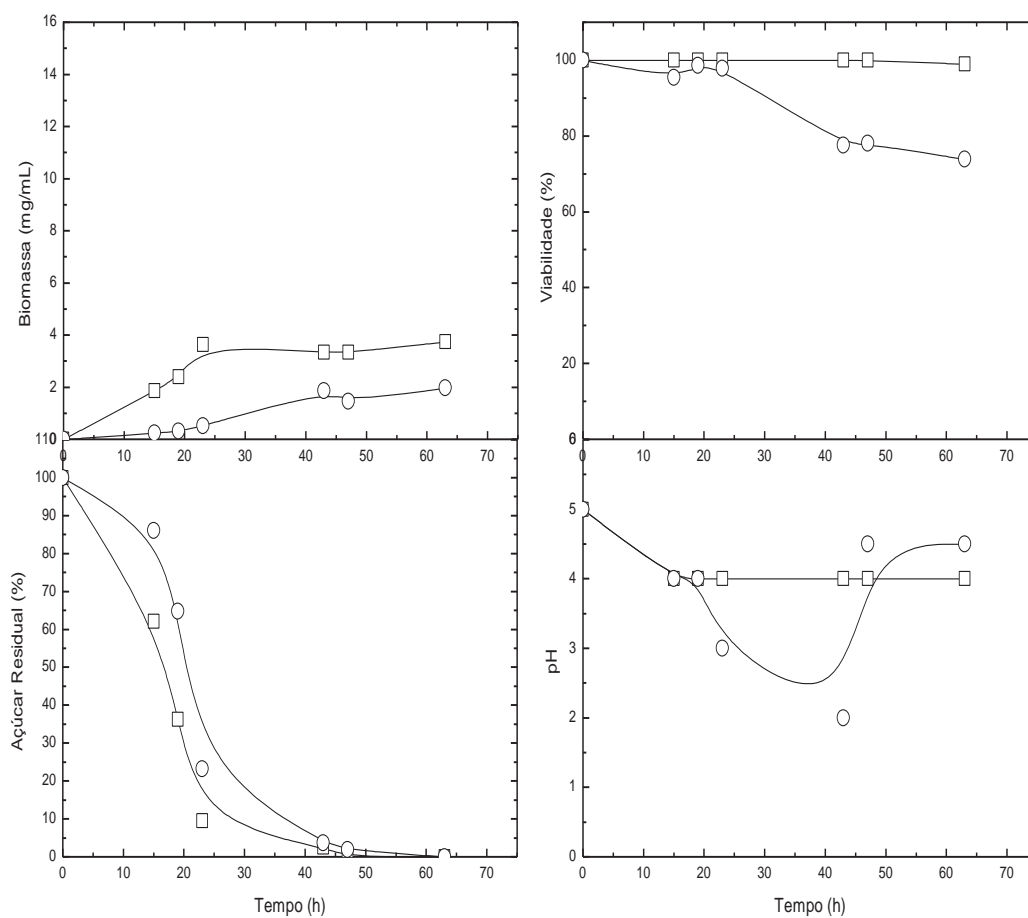


**Figura 36:** Atividade da invertase por *S. cerevisiae* pelas linhagens, SA (E e G) e RED (F e H), cultivadas **com agitação** (E e F) e **sem agitação** (G e H), em mosto com **sacarose 35% (p/v)**, contendo fontes de nitrogênio: 1% de peptona ou 2% de peptona ou 1% de sulfato de amônio ou 2% de sulfato de amônio. O meio suplementado com sulfato de amônio o pH foi reajustado para 5,0 com NaOH 1M.

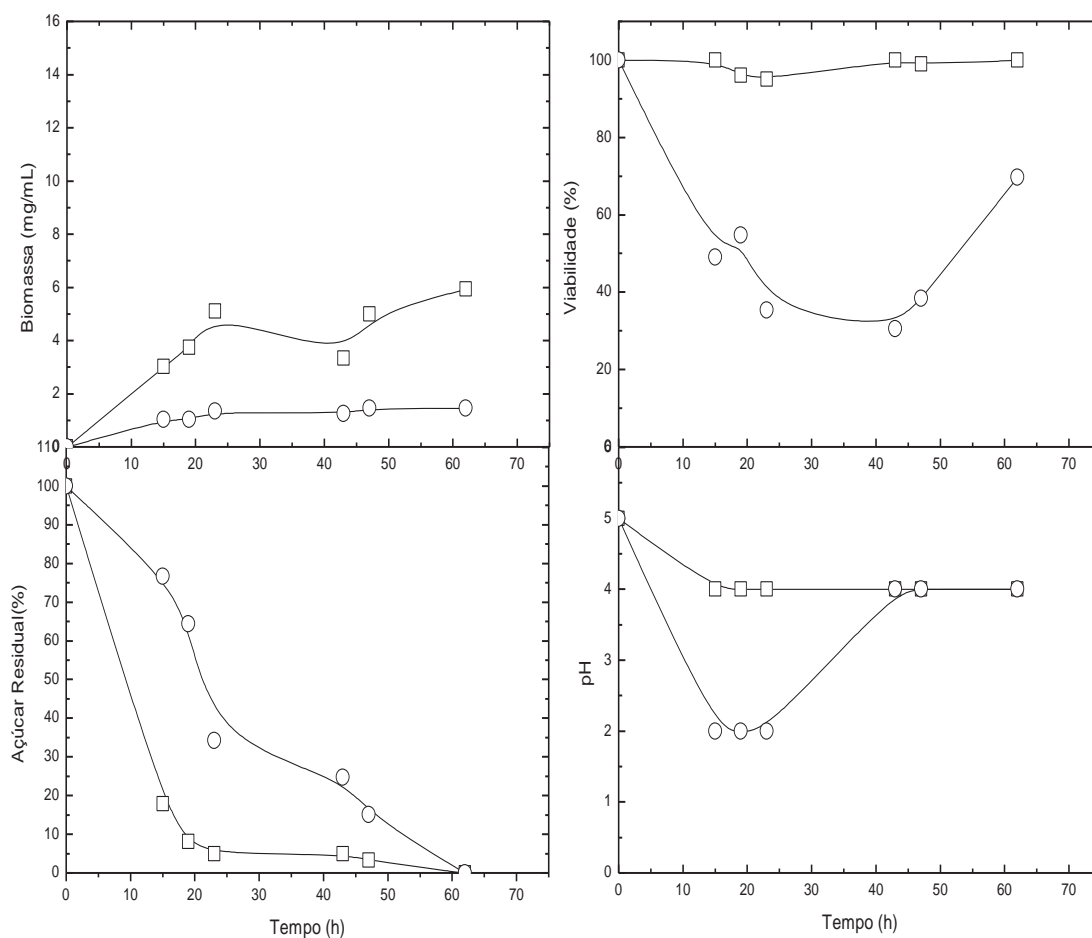
### **5.5. Estudos com meio YNB contendo 5 % (p/v) de sacarose com diferentes fontes de nitrogênio**

Os experimentos com o meio YNB continham sacarose 5 % (p/v), esta concentração foi usada para verificar o comportamento fermentativo das linhagens em concentrações baixa de sacarose e foram realizados com o objetivo de verificar a capacidade de crescimento dos isolados. Este meio foi suplementado com sulfato de amônio ou peptona, duas fontes de nitrogênio com características estruturais distintas.

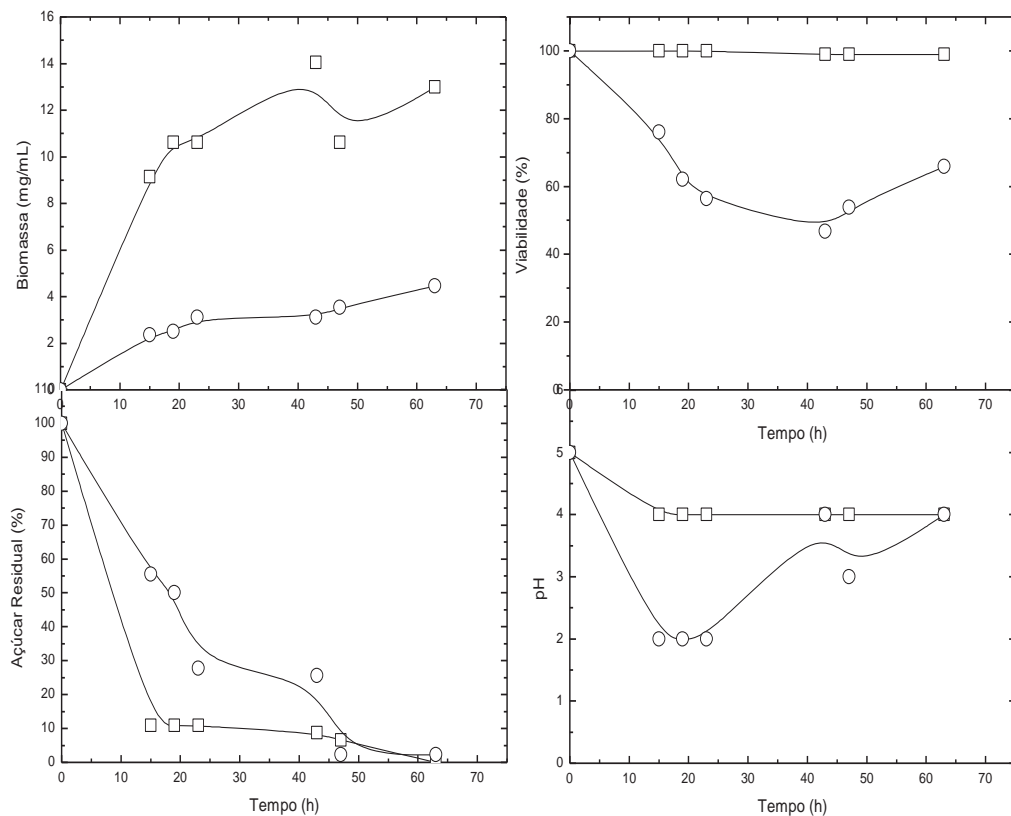
As Figuras 37 a 40 ilustram a variação do acúmulo de biomassa, viabilidade celular, monitoramento do pH e consumo de açúcar ao longo do cultivo das linhagens SC, RG, LS e SA. Estas linhagens foram estudas nesta concentração para verificar se as linhagens isoladas eram boas fermentadoras de sacarose em meio YNB contendo sacarose 5% (p/v) e a Tabela 13 compara os dados obtidos nos tempos de 15 e 63 horas. A linhagem SA foi utilizada para efeito de comparação dos isolados com uma linhagem industrial, por ser uma linhagem utilizada pelas usinas na produção de etanol. Observou-se que o melhor desempenho fermentativo das linhagens ocorreu em meios suplementados com peptona, uma fonte nitrogenada onde predomina nitrogênio na forma de peptídeos, com maior produção de biomassa, consumo mais eficiente de açúcar e na manutenção da viabilidade celular. As linhagens LS e SA apresentam bom desempenho fermentativo e se deve ao fato de, provavelmente, a linhagem LS ser também uma linhagem industrial, com desempenho fermentativo próximo daquele obtido para a linhagem SA. A linhagem LS foi a que obteve melhor desempenho fermentativo comparado com as outras linhagens isoladas. A comparação de desempenho aparece de forma mais clara na Tabela 13. O desempenho fermentativo no meio suplementado com sulfato de amônio foi inferior, porém a linhagem RG mostrou ser mais eficiente que a SC para os parâmetros analisados e estes sugerem que estas duas linhagens apresentam diferentes exigências com relação às fontes de nitrogênio.



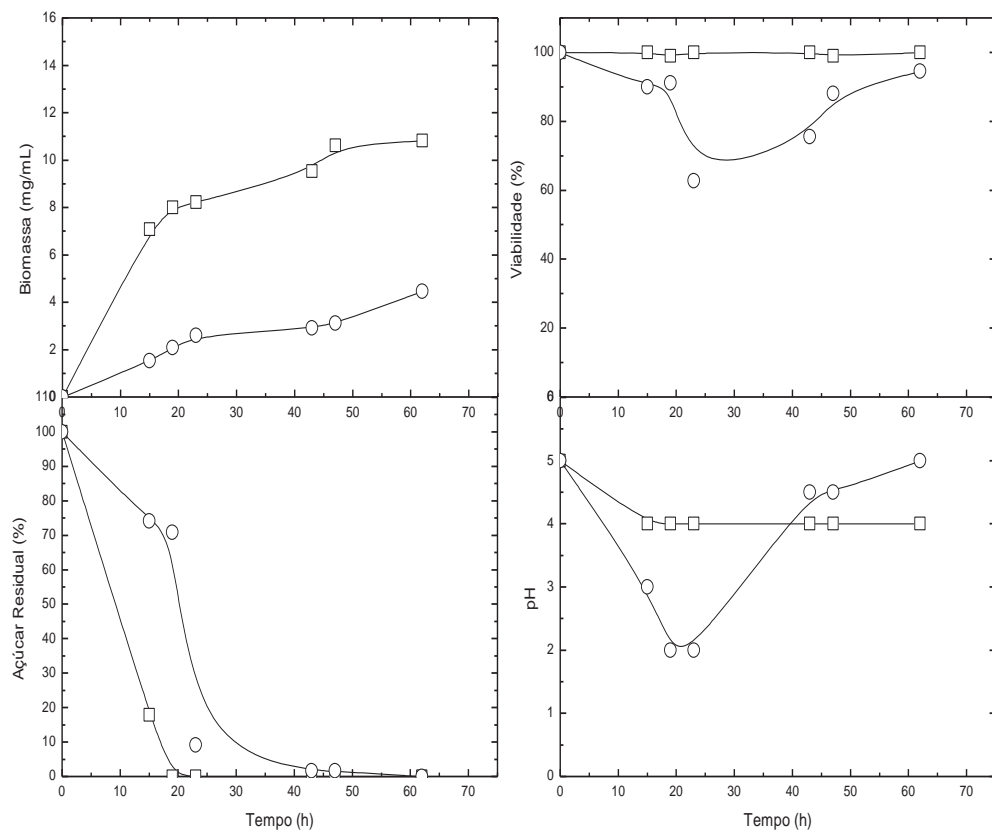
**Figura 37:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* **SC**, durante **crescimento aeróbico** em meio **YNB com sacarose 5% (p/v)**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 38:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* RG, durante **crescimento aeróbico** em **meio YNB com sacarose 5% (p/v)**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 39:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* LS, durante **crescimento aeróbico** em meio YNB com 5% (p/v) de sacarose, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 40:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante **crescimento aeróbico** em meio YNB com **sacarose 5% (p/v)**, contendo 1% (p/v) de fonte de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 13:** Produção de biomassa, viabilidade celular e consumo de açúcar pelas linhagens, cultivadas em meio **YNB** contendo **sacarose 5 % (p/v)** e 1% de peptona ou 1% de sulfato de amônio, **com agitação**.

Linhagens	Tempo (h)	1% Peptona			1% Sulfato de Amônio		
		Biomassa (MG/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (MG/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)
SC	15	0,09	100	62	0,24	96	86
	63	0,18	99	0	1,98	74	0
RG	15	3,02	100	18	1,04	69	74
	63	5,93	95	0	1,56	49	0
LS	15	9,15	100	11	2,36	76	56
	63	13,0	99	0	4,47	36	2,0
SA	15	7,07	100	18	1,53	90	77
	63	10,82	99	0	4,47	76	0

Condições de fermentação: 30°C, a 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

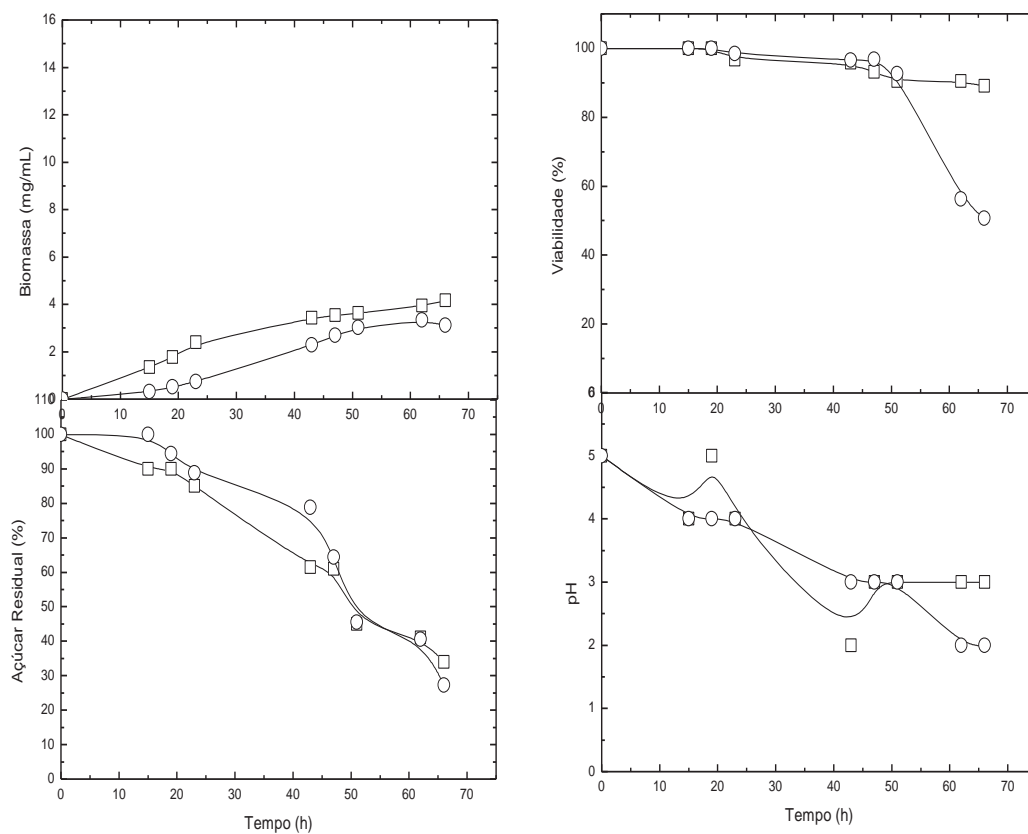
### 5.6. Estudos com meio YNB contendo 22% (p/v) de sacarose e diferentes fontes de nitrogênio

Estudo semelhante foi realizado em meio YNB contendo sacarose 22% (p/v) e 1% (p/v) de peptona e sulfato de amônio, neste caso a análise foi ampliada, incluindo duas outras linhagens industriais, as linhagens CAT e PE, também largamente utilizadas por usinas brasileiras. As Figuras 41 a 46 mostram a variação do acúmulo de biomassa, viabilidade celular, monitoramento do pH e consumo de açúcar ao longo do cultivo das linhagens SC, RG, LS e SA, em meio YNB contendo sacarose 22% (p/v) e a Tabela 14 compara os dados obtidos nos tempos de 15 e 65 horas. Os isolados SC e RG apresentaram desempenho inferior aos observados pelas linhagens industriais e também pelo isolado LS. Os resultados obtidos com estes estudos refletem as diferenças metabólicas das linhagens de leveduras, mostrando o efeito de fontes nitrogenadas estruturalmente complexas no fluxo metabólico do carbono. Como já citado, a suplementação com peptona é que propiciou melhor desempenho fermentativo, para as condições estudadas, e que

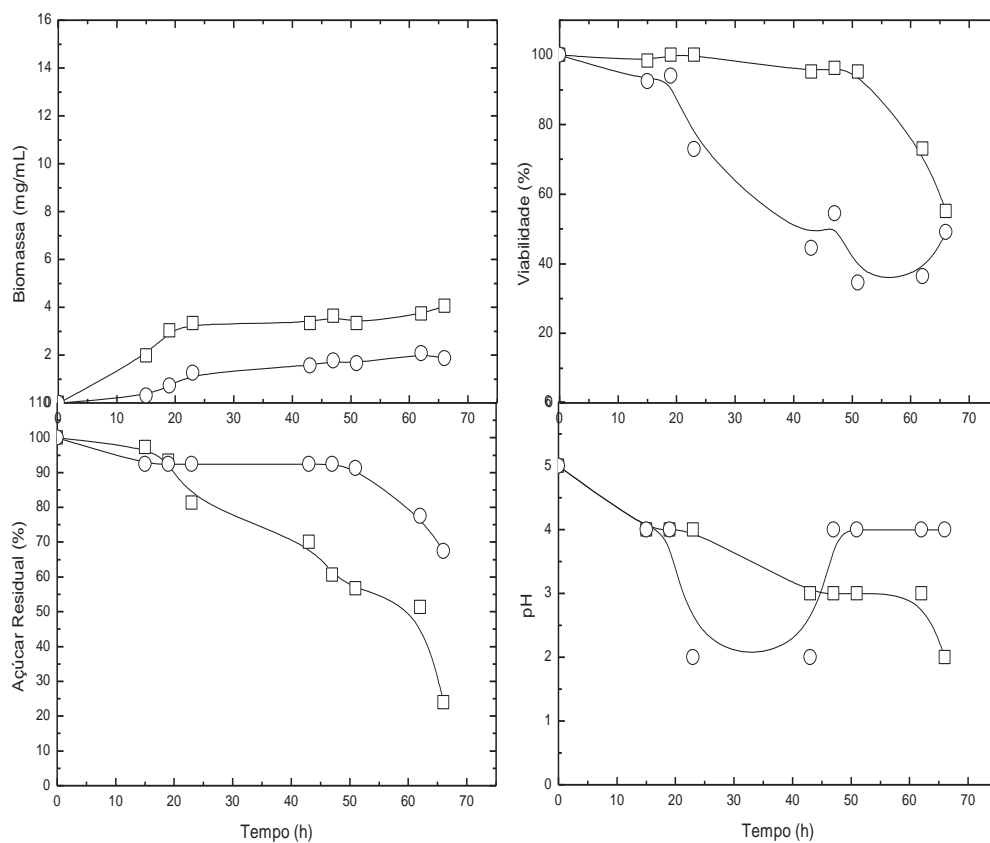


houve diferenças nos parâmetros para as diferentes linhagens. Na suplementação com sulfato de amônio, quando há consumo eficiente da fonte de carbono, há um impacto maior sobre a viabilidade celular.

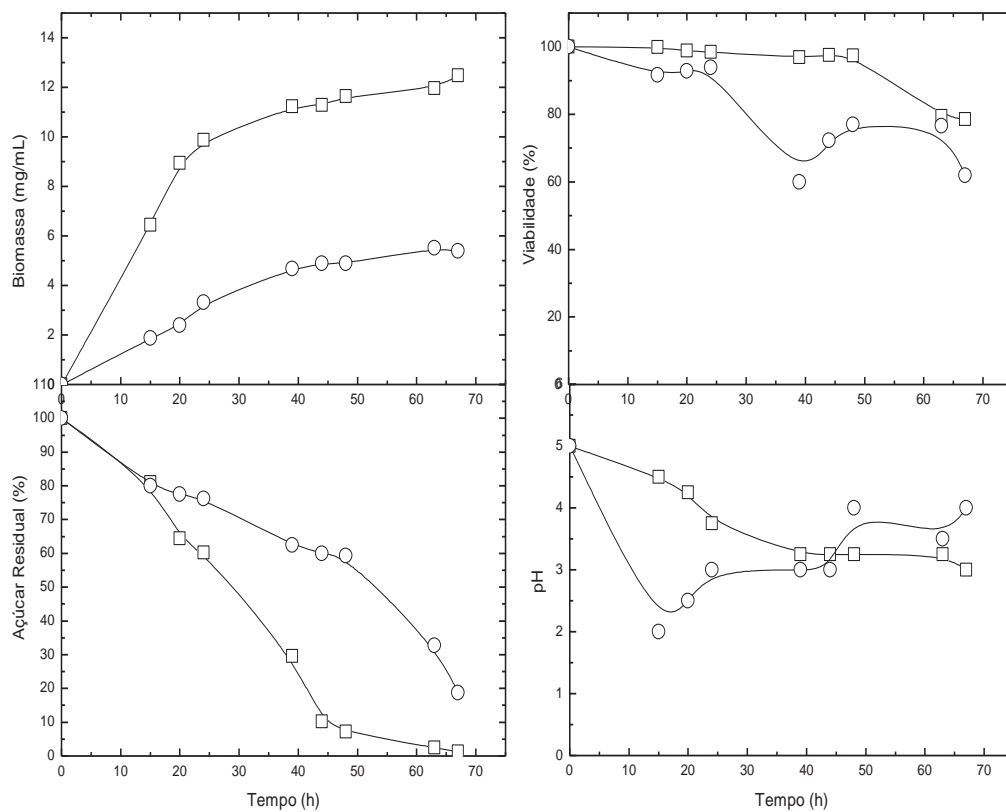
Em alguns dos experimentos o casaminoácidos foi utilizado como fonte de nitrogênio, os dados estão mostrados nas Figuras 44 a 46. O desempenho fermentativo das linhagens foi inferior no meio com casaminoácidos, quando comparado com os meios contendo peptona e sulfato de amônio. Estudos anteriores mostraram que as linhagens produtoras de etanol combustível não têm desempenho satisfatório em meios YNB, suplementado com casaminoácidos (MIRANDA, *et. al.*, 2009).



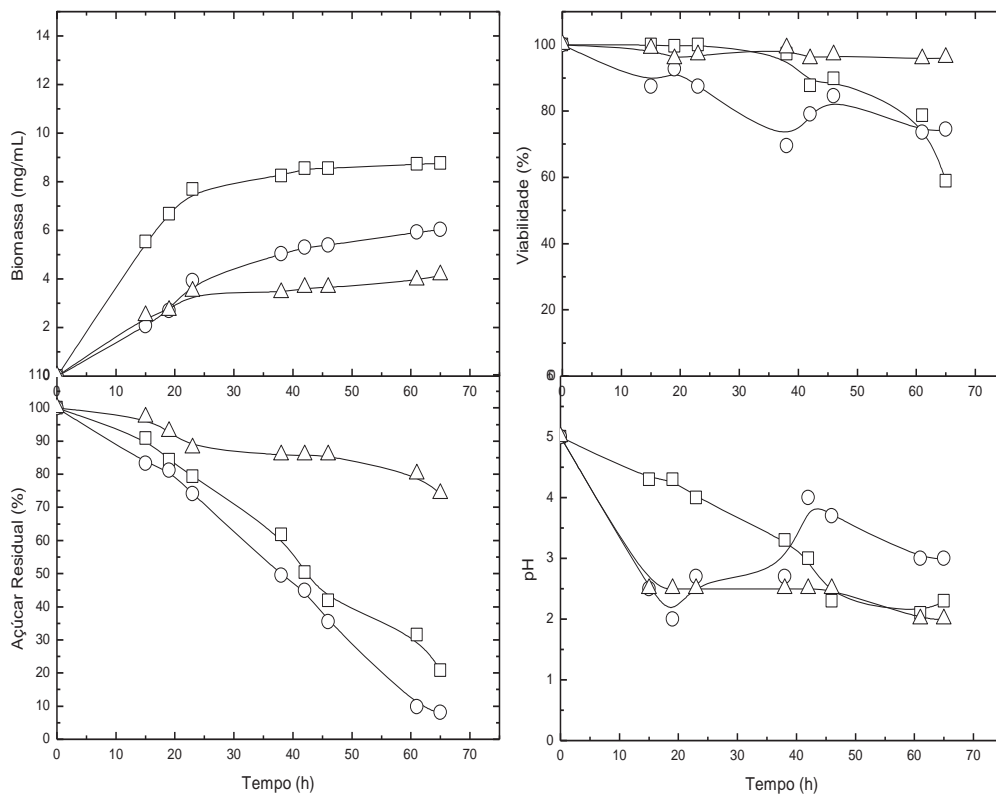
**Figura 41:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* **SC**, durante **crescimento aeróbico** em meio **YNB com sacarose 22% (p/v)**, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



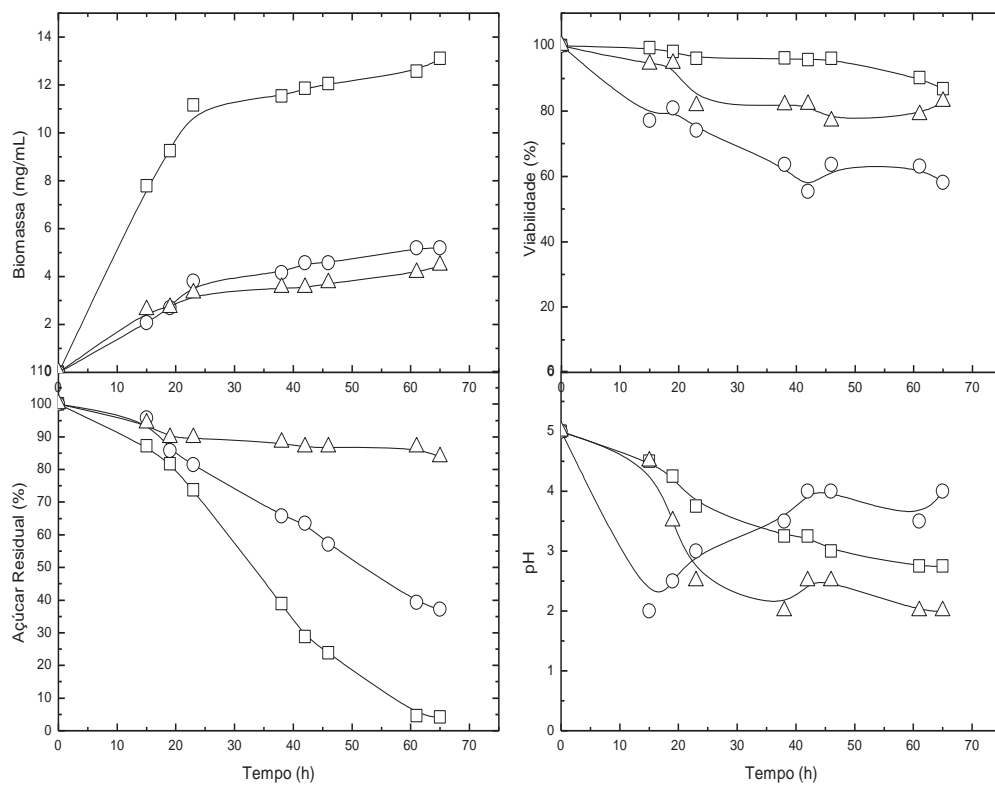
**Figura 42:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* RG, durante **crescimento aeróbico** em meio YNB com sacarose 22% (p/v), contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



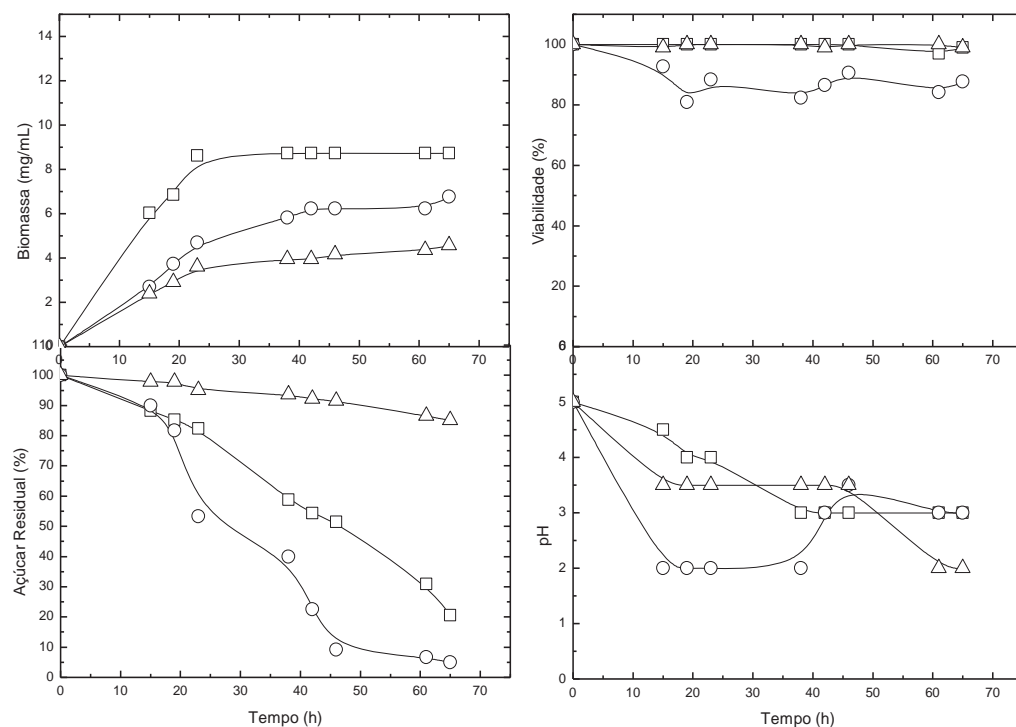
**Figura 43:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* LS, durante **crescimento aeróbico em meio YNB com sacarose 22% (p/v)**, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 44:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* SA, durante **crescimento aeróbico em meio YNB com sacarose 22% (p/v)**, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○), casaminoácidos (Δ). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 45:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* **CAT**, durante **crescimento aeróbico** em meio **YNB com sacarose 22% (p/v)**, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○), casaminoácidos (Δ). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 46:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* PE, durante **crescimento aeróbico em meio YNB com sacarose 22% (p/v)**, contendo 1% (p/v) de fontes de nitrogênio: peptona (□), sulfato de amônio (○), casaminoácidos (Δ). Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio foi reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

**Tabela 14:** Produção de biomassa, viabilidade celular, monitoramento do pH e consumo de açúcar pelas linhagens SC, RG, LS, SA, CAT e PE, cultivadas em meio YNB, contendo **sacarose 22% (p/v)**, 1% de peptona ou 1% sulfato de amônio ou 1% de casaminoácidos, **com agitação**.

Linhagens	Tempo (h)	1% Peptona			1% Sulfato de amônio			1% Casaminoácidos		
		Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)	Biomassa (mg/mL)	Viabilidade (%)	Açúcar Residual (%)
SC	15	1,35	100	90	0,31	100	100	-	-	-
	65	4,16	51	34	3,33	89	27	-	-	-
RG	15	1,98	100	97	0,312	92	93	-	-	-
	65	4,06	55	24	2,08	35	67	-	-	-
LS	15	6,44	99	81	1,87	94	80	-	-	-
	65	12,48	79	1,25	5,4	62	19	-	-	-
SA	15	5,54	99	91	2,08	88	83	2,49	99	97
	65	8,73	59	21	6,03	75	8,0	4,16	96	74
CAT	15	7,79	99	88	2,08	81	96	2,6	95	94
	65	13,1	87	4,20	5,2	56	37	4,47	77	84
PE	15	6,03	100	88	2,7	93	90	2,39	100	98
	65	8,73	97	21	6,76	83	5,0	4,57	99	85

Condições de fermentação: 30°C, a 200 rpm, pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

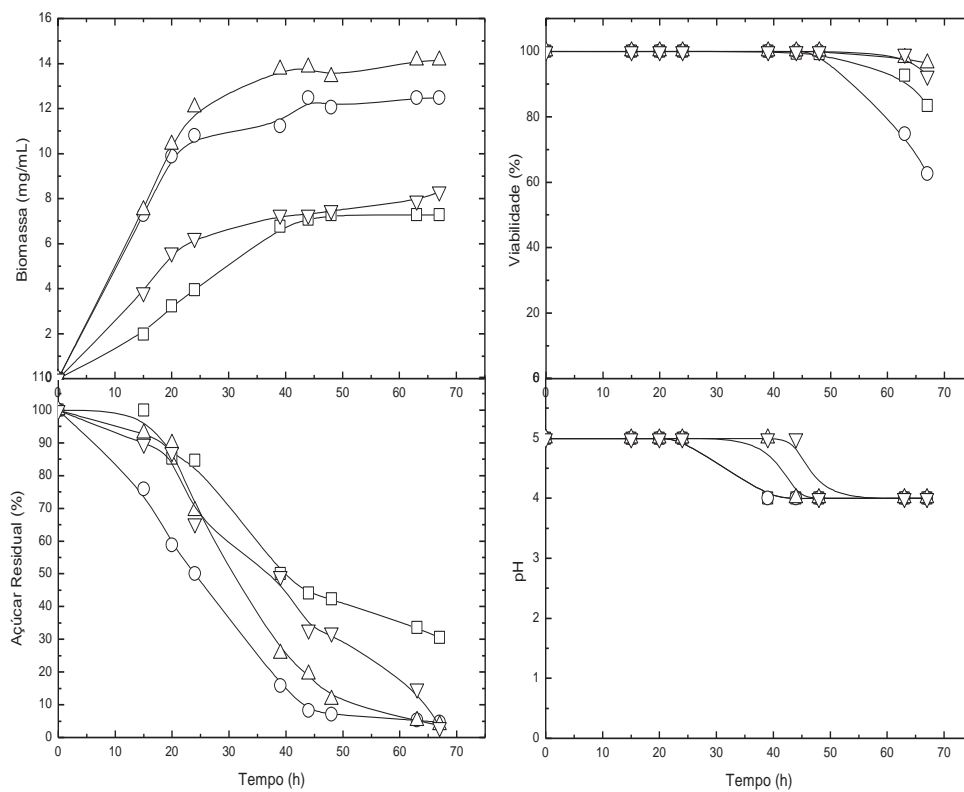


### **5.8. Estudos realizados com as linhagens isoladas utilizando mosto com 17° Brix sem suplementação e mosto com 35% (p/v) de sacarose com suplementação de fontes de nitrogênio.**

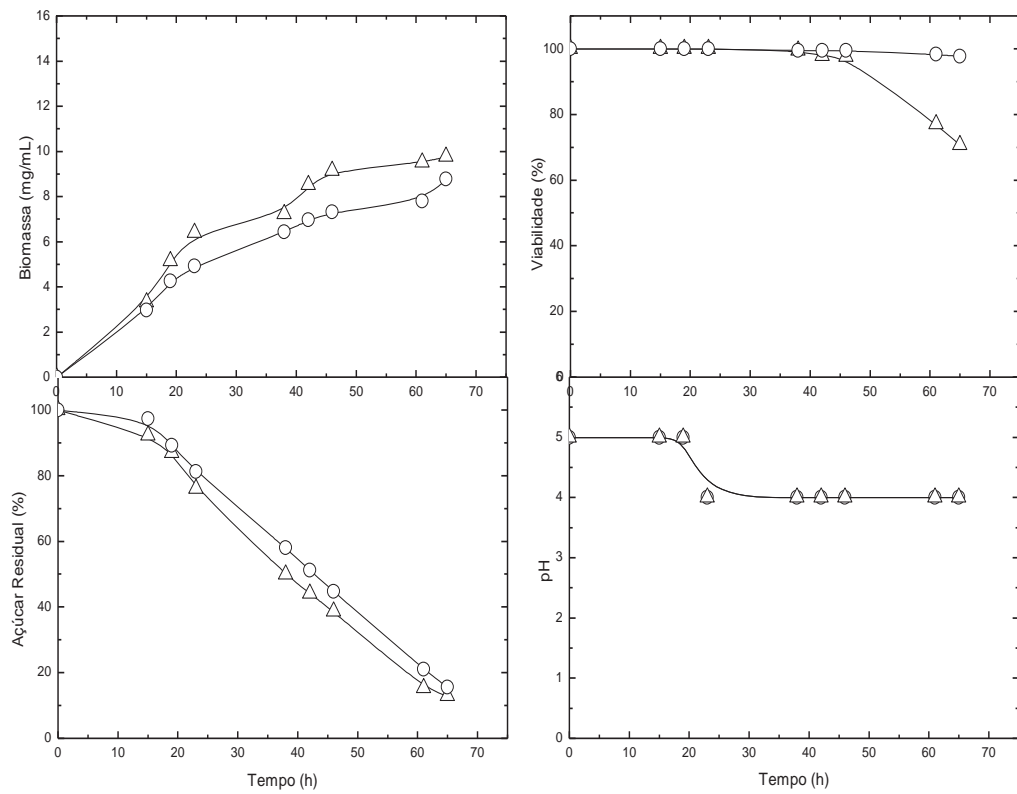
O mosto industrial foi também utilizado com os isolados da fermentação. A figura 47 mostra o desempenho fermentativo da linhagem SA e os isolados (SC, LS e RG) em mosto com 17° Brix, sem suplementação de fontes de nitrogênio, com agitação. As linhagens LS e SA tiveram um maior acúmulo de biomassa e consumo de açúcar, enquanto que as linhagens SC e RG apresentaram parâmetros fermentativos inferiores, mas com desempenho superior ao observado no meio YNB.

As linhagens LS e RG foram também avaliadas em mosto com 35% (p/v) de sacarose com suplementação de 2% de peptona e sulfato de amônio, sem agitação (Figuras 48 e 49). A linhagem LS apresentou maior produção de biomassa e consumo de açúcar que a linhagem RG em mosto suplementado com peptona, porém, com sulfato de amônio foi inferior. A manutenção da viabilidade foi inferior na linhagem LS em mosto suplementado com peptona, e esta queda se manifesta com mais intensidade após a exaustão da fonte de carbono, depois de 40h de fermentação.

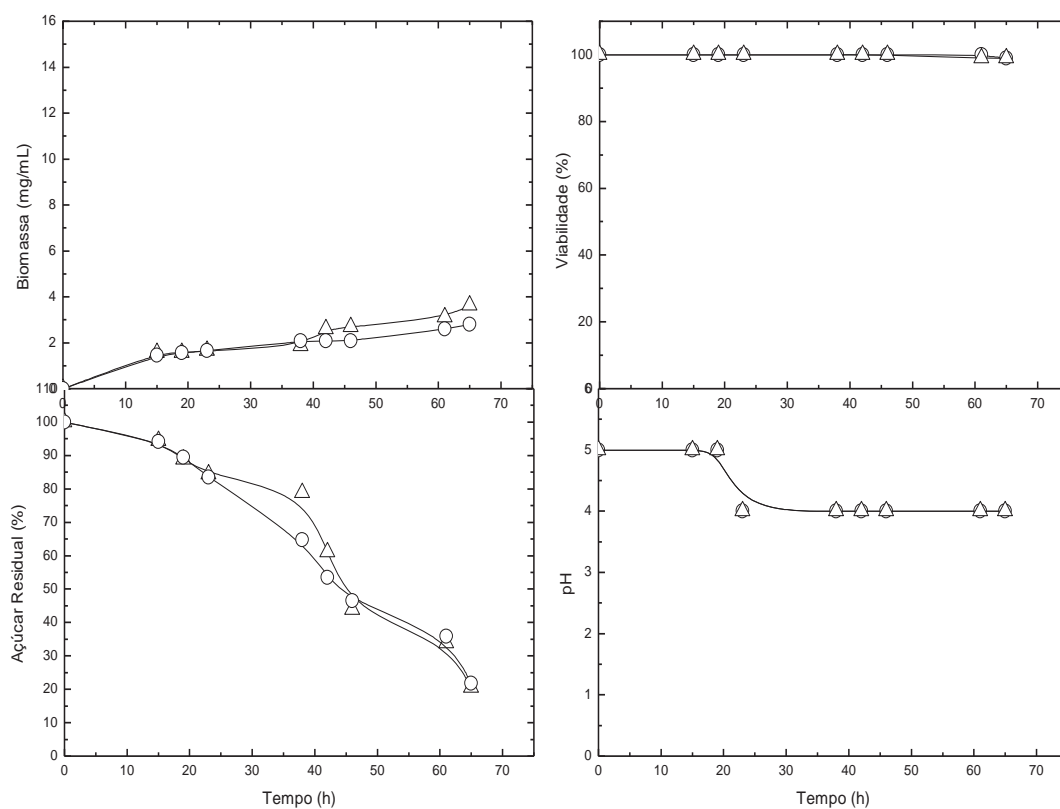
Ao comparar os dados em meio YNB com, obtidos em mosto industrial com 17° Brix, pode-se observar a melhor adequação dos isolados ao caldo de cana ('habitat natural'), com maior produção de biomassa e consumo de açúcar mais eficiente do que o observado em YNB, o que pode ser uma indicação do efeito deletério de contaminantes no processo industrial de produção de etanol. O efeito diferencial das fontes de nitrogênio sobre as leveduras industriais sugerem, juntamente com estes resultados obtidos com mosto industrial ser possível encontrar condições mais adequadas de fermentação, obtendo-se mostos com conteúdos alcoólicos mais elevados com a concomitante manutenção da viabilidade celular, permitindo assim o reciclo de células.



**Figura 47:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae*, SC (□), SA (○), LS (Δ), RG (▽), durante **crescimento aeróbico em mosto com Brix 17°**, sem suplementação de fontes de nitrogênio. Condições de cultivo: 30°C e 200 rpm, pH inicial 5,0.



**Figura 48:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* LS durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **sacarose 35% (p/v)**, contendo **2 % (p/v) de fonte de nitrogênio**: sulfato de amônio (○), peptona (Δ). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.



**Figura 49:** Produção de biomassa, viabilidade celular, pH e consumo de açúcar de *S. cerevisiae* RG durante **crescimento anaeróbico** em mosto com **sacarose 35% (p/v)**, contendo **2 % (p/v) de fonte de nitrogênio**: sulfato de amônio (○), peptona (Δ). Condições de cultivo: 30°C e pH inicial 5,0, sendo o meio suplementado com sulfato de amônio, reajustado o pH para 5,0 com NaOH 1M.

# Discussão

## 6.0. DISCUSSÃO

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 a baixo rendimento alcoólico, devido à fermentação com baixos teores de açúcar. Este trabalho tinha o objetivo inicial de estudar o efeito das leveduras contaminantes do processo fermentativo e estes resultados estão descritos nos experimentos com meios YNB, contendo sacarose 5% e 22% (p/v). Entretanto, foi constatado que uma pesquisa com contaminantes necessitaria de um tempo maior que o destinado ao Mestrado, e por isso redirecionamos trabalho experimental com o objetivo de verificar as condições de trabalho que permitissem definir um possível limite da álcool tolerância das leveduras industriais, com a produção de vinhos com altos teores de etanol.

Este trabalho foi desenvolvido realizando fermentações em meio à base de caldo de cana, ao qual foi adicionadas sacarose suplementar, para obterem-se concentrações aproximadas de 22%, 30% e 35% (p/v) de sacarose. A concentração mais baixa é a que está próxima da realidade industrial, e 35% seria uma condição para obter-se um vinho com quantidade elevada de etanol. As condições de cultivo foram com e sem agitação, pois a presença de pequena quantidade de oxigênio no processo permite maior produção de biomassa, além de a agitação permitir melhor homogeneização do meio de cultura. Adicionalmente, os meios de cultura foram suplementados com uma fonte nitrogenada, e esta suplementação foi à peptona, um hidrolisado enzimático de proteínas ou um sal inorgânico, o sulfato de amônio. Em alguns experimentos também foi utilizado casaminoácidos, um hidrolisado ácido de proteínas.

As fontes de nitrogênio utilizadas neste trabalho foram preparações comerciais de hidrolisados enzimáticos de proteínas (Peptona), hidrolisados ácidos de proteínas (casaminoácidos) e sulfato de amônio  $[(NH_4)_2SO_4]$ . Essas fontes de nitrogênio foram escolhidas por serem comumente utilizadas como constituintes no meio de cultura e por apresentarem diferentes graus de complexidade estrutural devendo interferir diretamente no fluxo metabólico das leveduras quanto à assimilação e utilização como fonte de nitrogênio e também na mutua interação que deve ocorrer com a fonte de carbono (MIRANDA *et.al.*, 2008).

Os dados mostram que, nas condições de fermentação, com baixa densidade celular, a suplementação com uma fonte de nitrogênio é essencial para obter uma fermentação eficiente. Nos meios suplementados, a adição de peptona foi a que propiciou melhores condições de fermentação: maior produção de biomassa e etanol, com a preservação da viabilidade celular. Os resultados obtidos neste estudo têm que ser analisados com a expectativa da execução de um processo industrial com controle de temperatura, mostos tratados e com qualidade sanitária adequada. Nestas condições é possível, pelos menos, encaminhar a problemática do bioetanol numa direção de obtenção de vinhos mais concentrados em etanol, que além de diminuir os custos operacionais, como os causados pela destilação, diminuiriam a quantidade de vinhaça. A proposta central deste estudo é encontrar condições otimizadas de fermentação, para que se atinja o limite máximo da álcool tolerância das linhagens industriais. Os resultados destes estudos já indicam ser necessária, pelo menos a adição de suplementos nitrogenados.

Este estudo deverá ser complementado, e um dos aspectos a serem analisados é o comportamento fermentativo das leveduras industriais, em mosto concentrados, e em processo fermentativo com alta densidade celular. Nestas condições será essencial a observação de como a pressão osmótica do mosto concentrado poderá afetar o processo fermentação, pois parece ser possível aumentar a concentração de sacarose acima de 30% (p/v). O esforço experimental será no sentido de se obter vinhos com quantidades de etanol próximas ao do rendimento teórico, atingindo concentrações acima de 17% (v/v).

# Referências



## Referências

- ALVES, D. M. G. **Fermentação alcoólica**: um processo vivo. Piracicaba: Fermentec, 1994. p. 25.
- AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica ciência & tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. v.1, p. 82-323.
- ANTONINI, S. R. C. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1151-1161, 2008.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Fermentação da trealose e glicogênio endógenos empregando-se as leveduras PE-2, VR-1, TA. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 18, p. 103-137, 1998.
- BATISTOTE, M.; CRUZ, S. H.; ERNANDES, J. R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine yeasts influenced by complexity of nitrogen source. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 2, p. 84-91, 2006.
- BERTHELS, N. J.; CORDERO OTERO, R. R.; BAUER, F. F.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 683-689, 2004.
- BERTHELS, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F. F.; PRETORIUS, I. S.; THEVELEIN, J. M. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 1083-1091, 2008.
- CARVALHO, S. C. **Interação entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica**. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***: metabolism and gene expression. New York: Cold Spring Harbor, 1982. p. 437- 458.
- 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, p. 349-355, 2003.

CRUZ, S. H.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Structural complexity of nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, p. 54-61, 2002.

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

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

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

HORÁK, J. Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 864, p. 223-256, 1986.

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

JONES, A. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Ethanol fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1242-1246, 1994.

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

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

MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. In: BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; JONES, E. W. (Ed). **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression**. New York: Cold Spring Harbor, 2002. v. 2, p. 283, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-430, 1959.

MIRANDA, M. J. **A utilização diferencial de glicose e frutose por leveduras vinícolas em meios contendo fontes de nitrogênio estruturalmente complexas.** 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

MIRANDA, M. J.; BATISTOTE, M.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Sucrose fermentation by brasilian ethanol production yeast in media containing structurally complex nitrogen sources. **The Institute of Brewing & Distilling**, v. 115, n. 3, p. 191-197, 2009.

NOLASCO, J. J. **Eficiência de processo térmico para mostos a base de caldo de cana e melão na produção de bioetanol.** 2010. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PAPARAZZI, J. O. **Metabolização de açúcar em Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase.** 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PATARO, C.; GERRA, J. B.; GOMES, F. C. O.; NEVES, M. J.; PIMENTEL, P. F.; ROSA, C. A. Trealose accumulation, invertase activity and physiological of yeast isolated from 24h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 202-208, 2002.

SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa.** 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SANTOS, A. M. **Estudo da influencia da complementação de nutriente no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada.** 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

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, 2004.

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

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

THEVELEIN, J. M. Regulation fo trehalose mobilization in fungi. **Microbiologica Reviews**, v. 48, n. 1, p. 42-59, 1984.

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

VITOLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae***. 1979. 136 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

VITOLO, M. **Efeito do pH e da aeração sobre a atividade invertásica de células intactas de leveduras obtidas por crescimento descontínuo**. 1989. 140 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.