

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Condições de propagação e revitalização para a
produção de etanol pela linhagem IQAr/45-2 da
levedura *Saccharomyces cerevisiae* em
fermentações sucessivas

LUIZ FERNANDO CATAI CORADELLO

Dissertação de Mestrado
2012



Instituto de Química

LUIZ FERNANDO C. CORADELLO

CONDIÇÕES DE PROPAGAÇÃO E
REVITALIZAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL PELA LINHAGEM IQAr/45-2 DA
LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* EM
FERMENTAÇÕES SUCESSIVAS

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

Orientadora: **Prof^a. Dra. Cecilia Laluce**

Araraquara
2012

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais:

Nome: Luiz Fernando Catai Coradello

Nome em citações bibliográficas: CORADELLO, L. F. C.

Sexo: Masculino

Endereço Profissional:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Instituto de Química (IQ)

Av. Prof. Francisco Degni, nº 55

Quitandinha – 14800-900

Araraquara-SP, Brasil.

Formação acadêmica:

Bacharelado em Ciências Biológicas (2005 – 2009). UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP. Título: Fungos associados à ascídia *Didemnum ligulum* - análises químicas, ensaios biológicos e otimização da produção de metabólitos secundários. Orientadora: Prof^a Dra Mirna Helena Regali-Seleglim.

Extensão universitária:

Estágio supervisionado em técnicas laboratoriais (2010). Laboratório de Leveduras Industriais (IQ, Unesp) – Araraquara/SP. Responsável: Prof^a Dra Cecilia Lalue.

Iniciação Científica (2007 – 2009). Realização do Projeto “Efeito do pH na produção de metabólitos secundários produzidos por linhagens de fungos isoladas da ascídia *Didemnum ligulum*”. Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Orientadora: Prof^a Dra Mirna Helena Regali-Seleglim.

Monitoria (2008 – 2009). Monitoria em aulas práticas junto à disciplina “Microbiologia” pertinente à grade do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP.

Estágio supervisionado em técnicas básicas laboratoriais (2006). LEMA - Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos (UFSCar) – São Carlos/SP. Responsável: Prof^a Dra Mirna Helena Regali-Seleglim.

Participação em eventos científicos:

2012 – XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – Foz do Iguaçu/PR. Apresentação do Trabalho “Revitalization of *Saccharomyces cerevisiae* cells when reused between successive fermentation cycles for ethanol production” – autor

2011 – 1st Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference – Campos do Jordão/SP. Apresentação do Trabalho “Revitalization of the yeast cream to improve ethanol production during a cell-recycling fermentation process” – co-autor

2011 – XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – Foz do Iguaçu/PR. Apresentação do Trabalho “Revitalization of the yeast cream to improve ethanol production during a cell-recycling fermentation process” – autor

2009 – 25º Congresso de Microbiologia – Porto de Galinhas/PE. Apresentação do Trabalho “Screening químico e biológico visando à seleção de linhagens de fungos associados à ascídia *Didemnum ligulum* com potencial farmacológico” – co-autor

2009 - V Semana da Biologia da UFSCar – São Carlos/SP. Participação do mini-curso “Microbiologia Industrial”

2008 - Programa de Formação de Recursos Humanos em Geologia e Ciências Ambientais Aplicadas ao Setor de Petróleo, Gás e Biocombustíveis – PRH 05 – PRH ANP/MCT – ênfase em Ciências Ambientais – Rio Claro/SP. Participação dos cursos “Ecossistemas Continentais e Marinhos do Brasil e Unidades de Conservação”; “Sensibilidade de Ecossistemas a Derrames de Petróleo”; “Recuperação e Remediação de Ambientes Contaminados por Petróleo e Derivados”; “Fungos Filamentosos: importância ambiental e biotecnológica no setor de P&G”

2008 - XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo – Fortaleza/CE. Apresentação do Trabalho “Produção de Metabólitos Secundários por Linhagens de Fungos Isoladas da Ascídia “*Didemnum ligulum*” - autor

2008 - XVI Congresso de Iniciação Científica - 8ª Jornada Científica da UFSCar – São Carlos/SP. Participação do mini-curso “Técnicas Cromatográficas e Espectroscopia Aplicadas a Produtos Naturais”. Apresentação do Trabalho “Análises Químicas e Biológicas de Metabólitos Secundários produzidos por Fungos de Origem Marinha - autor

2008 - IV Semana da Biologia da UFSCar – São Carlos/SP. Participação do mini-curso “Produtos Naturais”

2007 - 7ª Jornada Científica da UFSCar – São Carlos/SP. Participação do mini-curso “*Escherichia coli*: Uma bactéria de mil faces”

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos:

Laluce, C., Schenberg, A. C. G., Gallardo, J. C. M., Coradello, L. F. C., Pombeiro-Sponchiado, S. R. Advances and Developments in Strategies to Improve Strains of *Saccharomyces cerevisiae* and Processes to Obtain the Lignocellulosic Ethanol - A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* , v.166, p.1908 - 1926, 2012.

Kossuga, Miriam H., Romminger, Stelamar, Xavier, Camila, Milanetto, Marília C., Valle, Milene Z. do, Pimenta, Eli F., Moraes, Raquel P., Carvalho, Erica de, Mizuno, Carolina M., Coradello, Luiz Fernando C., Barroso, Vinícius de M., Vacondio, Bruna, Javaroti, Darci C. D., Seleglim, Mirna H. R., Cavalcanti, Bruno C., Pessoa, Claudia, Moraes, Manoel O., Lima, Bruna A., Gonçalves, Reginaldo, Bonugli-Santos, Rafaella C., Sette, Lara D., Berlinck, Roberto G. S. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.22, p.257 - 267, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido):

Coradello, L. F. C., Seleglim, M. H. R., Berlinck, R. G. S. Produção de Metabólitos Secundários por Linhagens de Fungos Isoladas da Ascídia “*Didemnum ligulum*” In: XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Anais do XI Encontro de Microbiologia Ambiental., 2008.

Capítulos de livro sob revisão:

Laluce, C.; Longo, E.; Sponchiado, S. R. P.; Cilli, E. M.; Gallardo, J. C. M.; Coradello, L. F. C. “A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais”, submetido para publicação em: N. R. Stradiotto; E. G. M. Lemos, “Desenvolvimento e Inovação em Bioenergia”, editora UNESP em Junho de 2011.

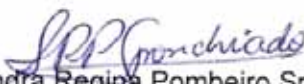
LUIZ FERNANDO CATAI CORADDELLO

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

Araraquara, 13 de setembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Cecília Lalue (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Sandra Regina Pombeiro Sponchiado
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Sandra Regina Ceccato Antonini
Centro de Ciências Agrárias – UFSCar – São Carlos

A Deus, por permitir que eu
concluísse mais esta etapa

...

Agradeço.

À minha família , em
especial minha madrinha
Rosa, por todo o
incentivo e apoio
incondicionais...

Ofereço.

Aos meus pais, Ana Luíza e
Sebastião Luiz, pela
oportunidade de estudo, por
acreditarem nas minhas
decisões e me apoiarem
sempre, pelo amor e confiança
que me dedicaram, os quais
agora e sempre retribuirei...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sabedoria e força, sem as quais não seria capaz de concluir este trabalho.

À minha família por toda a confiança depositada nesses anos de estudos e por toda a compreensão e amor, o que certamente fez com que esse trabalho pudesse ser realizado por completo.

À minha orientadora, Prof^a Cecilia Laluce, por me aceitar como seu aluno e pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa. Por todo o aprendizado durante esses anos, pelo carinho, confiança e pelo exemplo de dedicação com o trabalho.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Ismael, Jéssica, Maria Olívia e Meline pelo convívio harmonioso, por toda a ajuda, pelas brincadeiras e risadas e por me acolherem não só como colega de trabalho mas também como amigo.

Às amizades que fiz em Araraquara.

Ao técnico do laboratório Fernando Delfino, pela paciência, amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca, pelas críticas e conselhos para enriquecer este trabalho.

A todos os meus amigos que, apesar da distância, sempre se fizeram presentes e estiveram dispostos a ajudar de alguma forma.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e a todos os funcionários da seção de pós-graduação pela paciência e colaboração.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Resumo

RESUMO

As destilarias brasileiras produzem etanol utilizando o processo fermentativo contínuo ou por batelada alimentada. Nas fermentações sucessivas, as células são recicladas e usadas continuamente durante toda a safra. No final de cada ciclo de fermentação as células são concentradas e tratadas com ácido para redução dos contaminantes antes da utilização como *starter* da fermentação seguinte. Alterações no estado fisiológico das células podem ocorrer dependendo das condições que ocorrem antes e durante o processo e também durante o tratamento ácido, bem como a concentração de subprodutos formados. Tais alterações podem afetar a produtividade e a eficiência do processo fermentativo. As variações no estado fisiológico podem ser avaliadas através da medida de alguns indicadores, tais como níveis de trealose e seu grau de mobilização, proteínas e glicerol. Além disso, são necessários estudos para selecionar e utilizar os parâmetros fisiológicos como ferramentas de diagnóstico do desempenho do processo. O objetivo do presente trabalho foi o de expor as células a tratamentos adequados entre os ciclos de fermentação, a fim de restaurar ou melhorar o seu estado fisiológico, evitando perdas na viabilidade, na atividade de crescimento e de fermentação. Dois métodos para a propagação da linhagem IQAr/45-2 foram estabelecidos e ambos mostraram ser eficientes no acúmulo de células. No entanto, maiores aumentos foram obtidos quando o lisado celular de levedura (LC) foi adicionado ao meio, o qual levou a um crescimento semelhante a linhagem PE-2. A obtenção LC consiste em um método rápido, fácil e de menor custo do que o uso do extrato de levedura comercial. Dois tipos de meio (meios MR1 e MR2) foram utilizados para manter as células entre os ciclos de fermentação. O meio de MR1 continha sais de zinco, amônio e magnésio e o meio MR2 era constituído por LC e sais. O meio MR2 beneficiou tanto o crescimento celular quanto a produção de etanol (82-83% de rendimento fermentativo) nas fermentações a 34°C e 37°C. A mobilização de trealose foi atribuída às células metabolicamente ativas, enquanto que o seu aumento ou menor mobilização parece estar correlacionado com as condições de estresse. Aumentos no glicerol foram associados com o estresse osmótico e baixos níveis de proteínas foram correlacionados com a proteólise e morte celular, mas sem haver um padrão de comportamento bem definido. A revitalização portanto mostrou resultados benéficos no aumento do rendimento fermentativo, porém o longo tempo de armazenamento das células poderia ser prejudicial ao longo dos ciclos, mostrado por uma curva descendente de viabilidade. O tratamento ácido das linhagens IQAr/45-2 e PE-2 não afetou o crescimento celular nem a viabilidade, no entanto, afetou a cultivabilidade celular (crescimento de colônias) da linhagem PE-2, observado por plaqueamento em meio YPD e WLN. A cultivabilidade da linhagem IQAr/45-2 não foi afetada em nenhuma das condições de tratamento, mas o corante do meio WLN teve um efeito inibitório. O limite de tolerância da levedura IQAr/45-2 quanto a acidez láctica (CIM $\geq$ 3%, p/v) pareceu ser beneficiado quando adicionou-se sais e LC ao melaço 10% (ART) solidificado com agar. O limite de acidez acética não pareceu ser beneficiado pela adição de sais ou LC (CIM $\geq$ 0,4 % p/v).

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Indicadores fisiológicos. Revitalização celular. Ciclos de fermentação. Tratamento ácido. Acidez láctica e acética.

Abstract

ABSTRACT

Brazilian distilleries produce ethanol using continuous or fed-batch fermentations. In repeated fed-batch fermentations, cells are sequentially transferred from one fermentation cycle to the next. At the end of each fermentation, the yeast cells are harvested and acid-treated in order to kill contaminants prior to its use as starter of the next fermentation. Depending on stresses conditions occurring before and during the fermentation process, as well as the concentration of the by-products and acid treatment, changes in the physiological state of the cells can occur. Such changes can affect the productivity and fermentation efficiency of the process. The variations in physiological state can be evaluated by measuring indicators such as levels of trehalose, proteins and glycerol and their degree of mobilization. In addition, studies are required for selection and use of the physiological parameters as diagnostic tools of the process performance. The aim of present work was to improve and/or avoid losses in viability, growth and fermentation activities by exposing the cells to appropriate treatments between fermentation cycles, particularly in order to restore or improve their properties. Two methods for the propagation of the strain IQAr/45-2 were established and both showed efficiency on cell accumulation. However, greater biomass and viability were obtained for IQAr/45-2 strain when yeast cell lysate (LC) was added to the medium, having a similar growth when compared to the PE-2 strain. The procedure to LC obtention is a faster, easier and lower cost method than the commercial yeast extract. Two kinds of medium (MR1 and MR2 media) were used to store the cells between the fermentation cycles. The MR1 medium was supplemented with ammonium, zinc and magnesium salts and MR2 medium was supplemented with LC. The MR2 medium benefits both cell growth and ethanol production (82-83% theoretical ethanol yield) at 34°C and 37°C fermentations. Regarding the physiological parameters, the trehalose mobilization was associated with metabolic active cells but its increase or smaller mobilization seems to be correlated with stress conditions. Glycerol increases were associated with osmotic stress and low levels of proteins were correlated with proteolysis and cellular death, but a clear correlation was not observed. The revitalization therefore showed beneficial results in increased fermentation yield, but the long-time storage of the cells could be harmful over the cycles, shown by a descending curve of viability. The acid treatment for IQAr/45-2 and PE-2 strains did not affect both cell growth neither viability, nevertheless it affected cell cultivability (colonies growth) of PE-2 strain, observed by plating cells on YPD and WLN media. IQAr/45-2 strain cultivability was not affected by acid treatment of the cells at any conditions but sensitivity to dye was observed. The limit of lactic acid tolerance for IQAr/45-2 strain ($\text{MIC} \geq 3\%$, p/v) seems to benefit when salts and LC was added to medium. The limit of acetic acid was not improved with salts and LC addition ($\text{MIC} \geq 0,4\%$ p/v).

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Physiological indicators. Cell revitalization. Fermentation cycles. Acid treatment. Lactic and acetic tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da produção de etanol de cana-de-açúcar (BANCO..., 2009).....	27
Figura 2 -	Esquema simplificado da regeneração de NAD^+ em células de levedura (NORDSTRÖM <i>et al.</i> , 1966).....	31
Figura 3 -	Possíveis alvos do etanol na célula de levedura (D'AMORE <i>et al.</i> , 1990).....	34
Figura 4 -	Esquema do metabolismo da trealose em <i>S. cerevisiae</i> . G-6-P é glicose-6-fosfato, UDPG é uridina-5-difosfoglicose, T-6-P é trealose-6-fosfato, TPS é trealose-6-fosfato sintase, TPP é trealose-6-fosfato fosfatase, e HXK é hexoquinase (EASTMOND <i>et al.</i> , 2003, modificado).....	37
Figura 5 -	Propagação realizada em 4 etapas com concentrações crescentes de melaço. As concentrações finais de açúcares redutores totais e volumes finais de meio para as etapas 1, 2, 3 e 4 foram respectivamente 3%/50mL, 5%/100mL, 8%/200mL e 12%/400mL. Cada etapa teve a duração de 12h.....	50
Figura 6 -	Propagação realizada em 2 etapas utilizando melaço 12% ART. Após a primeira etapa, com duração de 9h, o meio foi separado em duas partes de 50 mL e acrescido de 50 mL de meio fresco com concentração de 24% ART. A concentração e volume final da etapa 2 foi 12% ART e 100mL, com duração de 12h.....	51
Figura 7 -	Sistema utilizado nas fermentações em batelada alimentada.....	52
Figura 8 -	Efeitos dos aditivos nutricionais sobre a curva de crescimento da levedura IQAr/45-2 a 37°C em melaço 5% ART: (-●-) $\text{LC } 1 \text{ g.L}^{-1}$, (-●-) extrato de levedura 20 g.L^{-1} , (-●-) glutamato monossódico $0,050 \text{ g.L}^{-1}$, (-●-) glutamato monossódico 5 g.L^{-1} , (-●-) solução de sais e (-●-) controle. Concentração final da solução de sais no meio: $0,87 \text{ g.L}^{-1}$	

	K ₂ HPO ₄ ; 0,66 g.L ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,3 g.L ⁻¹ Uréia; 0,49 g.L ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,03 g.L ⁻¹ ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,01 g.L ⁻¹ MnSO ₄ .H ₂ O (Basso <i>et al.</i> , 2008).....	68
Figura 9 -	Efeitos da adição de lisado celular (LC) sobre a curva de crescimento da levedura IQAr/45-2 a 37°C em melaço 5% ART: (-●-) LC 1 g.L ⁻¹ centrifugado, (-●-) LC 1 g.L ⁻¹ bruto, (-●-) LC 2 g.L ⁻¹ centrifugado, (-●-) LC 2 g.L ⁻¹ bruto, (-●-) controle.....	69
Figura 10 -	Efeito da adição de lisado celular de levedura (LC) e da elevação da temperatura de 34°C (A) para 37°C (B) sobre a curva de crescimento das linhagens de levedura: (-●-) IQAr/45-2, (-▲-) IQAr/45-2 em presença de LC (1 g.L ⁻¹) e (-■-) PE-2 durante a primeira etapa de propagação em melaço 12 %. Condições: tempo de incubação de 9h, <i>vfrasco/vmeio</i> de 5:2, agitação de 80 rpm. A viabilidade da etapa 1 não variou, ficando ao redor 100 % para ambas as condições e para as duas leveduras.....	71
Figura 11 -	Padronização do tempo de fermentação a partir das medidas de ART (%) e etanol (g.L ⁻¹) a 34°C (-●-) e 37°C (-●-), durante um único ciclo de fermentação com tempo de alimentação de 3h.....	83
Figura 12 -	Comparação da revitalização das células do fermento em meio MR1 (-●-), MR2 (-●-) e água destilada (-●-) sobre as medidas de viabilidade final (A), ART residual (B) e etanol produzido (C) em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5 com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.....	84
Figura 13 -	Comparação da revitalização das células do fermento em meio MR1 (A), MR2 (B) e água destilada (C) sobre as medidas iniciais (■) e finais (■) de biomassa em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5 com duração de 6h e tempo de	

	alimentação de 3h	84
Figura 14 -	Comparação da revitalização das células do fermento em meio MR1 (-●-), MR2 (-●-) e água destilada (-●-) sobre as medidas de viabilidade final (A), ART residual (B) e etanol produzido (C) em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 37°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5 com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.....	87
Figura 15 -	Comparação da revitalização das células do fermento em meio MR1 (A), MR2 (B) e água destilada (C) sobre as medidas iniciais (■) e finais (■) de biomassa em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 37°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5 com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.....	87
Figura 16 -	Efeito dos diferentes tratamentos sobre as células da levedura IQAr/45-2 sobre a biomassa (A) e viabilidade (B) quando mantidas em: meio MR1 (-●-), meio MR2 (-●-) e água destilada (-●-), durante 16h de revitalização e armazenamento entre ciclos sucessivos de fermentação.....	92
Figura 17 -	Efeito dos diferentes tratamentos sobre as células da levedura IQAr/45-2 sobre a trealose (A) e proteínas totais (B) quando mantidas em: meio MR1 (-●-), meio MR2 (-●-) e água destilada (-●-), durante 16h de revitalização e armazenamento entre ciclos sucessivos de fermentação.....	92
Figura 18 -	Efeito dos diferentes tratamentos sobre as células da levedura IQAr/45-2 sobre o glicerol interno (A) e externo (B) quando mantidas em: meio MR1 (-●-), meio MR2 (-●-) e água destilada (-●-), durante 16h de revitalização e armazenamento entre ciclos sucessivos de fermentação.....	93
Figura 19 -	Crescimento em meio YPD das células iniciais (247	

	$\mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$) e após 12h ($62 \mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$) de revitalização em meio MR1 sob condições de estresse térmico, osmótico (NaCl) e alcóolico.....	94
Figura 20 -	Efeitos dos diversos tratamentos ácidos com H_2SO_4 (2h em pH 2,0) sobre a estabilidade das colônias da levedura IQAr/45-2 e PE-2 no meio diferencial WLN nas condições: antes do tratamento e após tratamentos com água destilada, glicose 0,5% e melaço 1%.....	98
Figura 21 -	Concentração inibitória mínima do ácido acético sobre o crescimento da linhagem IQAr/45-2 em meio sólido de melaço 10% acrescido de solução de sais e EN $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ após 48h. Sais: $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DAP; $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100
Figura 22 -	Concentração inibitória mínima do ácido láctico sobre o crescimento da linhagem IQAr/45-2 em meio de melaço 10% acrescido de solução de sais e EN $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ após 48h. Sais: $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DAP; $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variação de mineirais no mosto (AMORIM; LEÃO, 2005)...	29
Tabela 2 -	Obtenção de biomassa após 12h de cultivo em melaço 5% a 37°C na presença de diferentes aditivos.....	67
Tabela 3 -	Efeito da concentração do melaço (3%, 5%, 8% 12%) e da temperatura (34°C e 37°C) sobre os valores iniciais e finais de biomassa sobre a propagação da levedura IQAr/45-2.....	70
Tabela 4 -	Efeito da concentração do melaço (3%, 5%, 8% 12%) e da temperatura (34°C e 37°C) sobre os valores iniciais e finais de açúcares redutores totais e produção de etanol sobre a propagação da levedura IQAr/45-2.....	70
Tabela 5 -	Efeito da adição de lisado celular de levedura (LC) e da elevação da temperatura (34°C e 37°C) sobre os valores iniciais e finais de biomassa pelas linhagens de levedura: IQAr/45-2, IQAr/45-2 com LC 1 g.L ⁻¹ e PE-2 durante as duas etapas de propagação em melaço 12 % (Apêndice B).....	72
Tabela 6 -	Efeito da adição de lisado celular de levedura (LC) e da elevação da temperatura (34°C e 37°C) sobre os valores iniciais e finais de açúcares redutores totais e produção de etanol pelas linhagens de levedura: IQAr/45-2, IQAr/45-2 com LC 1 g.L ⁻¹ e PE-2 durante as duas etapas de propagação em melaço 12 % (Apêndice B).....	73
Tabela 7 -	Comparação do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) da etapa final nos 2 métodos de propagação.....	74
Tabela 8 -	Efeito da concentração de melaço no meio de revitalização ^a sobre a formação de biomassa e parâmetros dependentes da fisiologia celular (viabilidade, proteína total, glicerol interno e trealose) durante a revitalização do fermento mantido em agitação a 30°C e	

	pH 4.5 por 16h.....	76
Tabela 9 -	Efeito da concentração de melaço no meio de revitalização ^a sobre a formação de biomassa e parâmetros dependentes da fisiologia celular (viabilidade, proteína total, glicerol interno e trealose) durante a revitalização do fermento mantido em agitação a 34°C e pH 4.5 por 16h.....	77
Tabela 10 -	Efeito do pH (4,5 e 5,5) no meio de revitalização ^a sobre as variações em biomassa e as características fisiológicas (viabilidade, proteína total, glicerol interno e trealose) das células da levedura IQAr/45-2 durante o revitalização a 30°C por 16h.....	78
Tabela 11 -	Efeito da quantidade de sais presentes no meio MR ^a sobre as células da levedura IQAr/45-2.....	80
Tabela 12 -	Efeito da adição de lisado celular de levedura (LC), presente ao meio MR ^a sobre as células da levedura IQAr/45-2.....	81
Tabela 13 -	Variações em biomassa e parâmetros fisiológicos (viabilidade, proteína total, glicerol interno e trealose) durante a estocagem das células da levedura IQAr/45-2 por 16h em água destilada à temperatura ambiente e sua comparação com o meio MR.....	82
Tabela 14 -	Comparação da revitalização das células do fermento em meio MR1, MR2 e água destilada sobre as medidas de biomassa em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5....	85
Tabela 15 -	Comparação da revitalização das células do fermento em meio MR1, MR2 e água destilada sobre as medidas de etanol produzido em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5....	85
Tabela 16 -	Comparação da revitalização das células do fermento em meio MR1, MR2 e água destilada sobre as medidas de biomassa em cada um dos ciclos de fermentação	

	sucessivos a 37°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5....	87
Tabela 17 -	Comparação da revitalização das células do fermento em meio MR1, MR2 e água destilada sobre as medidas de etanol produzido em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 37°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5....	89
Tabela 18 -	Parâmetros fisiológicos trealose e proteínas totais ao final das fermentações intercaladas pelos tratamentos em meio MR2 e água destilada.....	90
Tabela 19 -	Parâmetros fisiológicos glicerol interno e externo ao final das fermentações intercaladas pelos tratamentos em meio MR2 e água destilada.....	90
Tabela 20 -	Efeito do tratamento ácido das linhagens de levedura IQAr/45-2 e PE-2, resultante de um ciclo de fermentação a 37°C, sobre a biomassa e viabilidade celular.....	95
Tabela 21 -	Efeito do tratamento ácido após 1 ciclo de fermentação sobre a sobrevivência das leveduras IQAr/45-2 e PE-2 no meio YPD.....	96
Tabela 22 -	Efeito do tratamento ácido após 1 ciclo de fermentação sobre a sobrevivência das leveduras IQAr/45-2 e PE-2 no meio diferencial WLN.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
μL	microlitro
μg.mg ⁻¹	micrograma por miligrama
μg.mL ⁻¹	micrograma por mililitro
mg.mL ⁻¹	miligrama por mililitro
ART	açúcar redutor total
DAP	diamônio fosfato
LC	lisado celular de levedura
g	gramas
g.L ⁻¹	gramas por litro
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HCl	ácido clorídrico
L	litro
mol.L ⁻¹	molar
mg.L ⁻¹	miligramas por litro
mL	mililitro
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetro
Abs	absorbância
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
STREs	elementos de resposta ao estresse
v/v	volume por volume
p/v	peso por volume
Y _{P/S}	fator de conversão de substrato em produto
Y _{X/S}	fator de conversão de substrato em células
YPD	extrato de levedura, peptona e glicose
R\$/Kg	custo em reais por quilo
g _N /Kg	gramas de nitrogênio por quilo

- ↓ queda nos parâmetros fisiológicos
- ↑ acúmulo nos parâmetros fisiológicos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1. Cenário energético.....	26
1.2. Produção de etanol.....	27
1.2.1. Matéria-Prima.....	28
1.2.2. Fermentação descontínua alimentada.....	29
1.2.3. Leveduras.....	30
1.2.4. Fermentação.....	30
1.3. Fisiologia e Estresse.....	31
1.3.1. Estresse osmótico.....	32
1.3.2. Etanol.....	33
1.3.3. Acidez.....	34
1.3.4. Outros estresses.....	35
1.3.5. Respostas fisiológicas.....	36
1.3.5.1. Trealose.....	36
1.3.5.2. Proteínas.....	37
1.3.5.3. Glicerol.....	38
1.4. Exigências nutricionais.....	39
2. OBJETIVOS.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Leveduras utilizadas.....	44
3.2. Meios de cultivo.....	44
3.2.1. Melaço de cana-de-açúcar e sua clarificação.....	44
3.2.2. Meio YPD.....	45
3.2.3. Meio WL Nutrient (WLN).....	45
3.2.4. Meios sólidos para determinação de resistência ao estresse.....	46
3.2.5. Meio contendo ácido acético.....	46
3.2.6. Meio contendo ácido lático.....	46
3.3. Lisado celular de levedura (LC).....	46
3.3.1. Dosagem do nitrogênio amínico livre.....	46
3.3.2. Crescimento da levedura IQAr/45-2 em melaço acrescido de LC e outros aditivos.....	48

3.3.3. Comparação da adição de LC centrifugado e bruto sobre o crescimento da linhagem IQAr/45-2 em melaço.....	48
3.4. Propagação do inóculo.....	49
3.4.1. Propagação em concentrações crescentes de açúcar (Método 1).....	50
3.4.2. Propagação em duas etapas de concentração alta de açúcar (Método 2).....	50
3.5. Ensaio de fermentação em batelada alimentada.....	51
3.6. Condições para revitalização do leite de levedura.....	52
3.6.1. Ajuste da concentração do melaço e temperatura.....	53
3.6.2. Ajuste do pH do melaço.....	53
3.6.3. Ajuste na quantidade do coquetel de sais adicionado ao melaço.....	53
3.6.4. Ajuste na quantidade de lisado celular de levedura (LC) adicionado ao melaço.....	53
3.6.5. Armazenamento em água em substituição ao meio de revitalização.....	54
3.7. Teste qualitativo de resistência aos fatores de estresse durante a curva de revitalização.....	54
3.8. Resistência do leite de levedura ao tratamento ácido.....	54
3.9. Limites da acidez láctica e acética da linhagem IQAr/45-2.....	55
3.10. Ensaio das variáveis dependentes do processo.....	55
3.10.1. Viabilidade celular.....	55
3.10.2. Açúcares redutores totais.....	56
3.10.3. Etanol.....	57
3.10.4. Biomassa celular.....	57
3.11. Ensaio dos parâmetros fisiológicos.....	58
3.11.1. Trealose.....	58
3.11.2. Proteínas totais.....	59
3.11.3. Glicerol interno e externo.....	61
3.12. Cálculo do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e rendimento fermentativo.....	62
3.13. Tratamento estatístico.....	62

3.13.1. Comparação entre médias: test t.....	62
3.13.2. Comparação entre proporções: teste qui-quadrado (X^2).....	63
3.13.3. Análise de variância (ANOVA).....	63
3.13.4. Teste de Tukey.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1. Rendimento do nitrogênio amínico no lisado celular de levedura.....	66
4.2. Efeitos dos diferentes aditivos sobre o crescimento das leveduras durante a propagação em melaço 5%.....	66
4.2.1. Comparação da adição de sobrenadante de lisado celular centrifugado e não centrifugado sobre a curva de crescimento...	68
4.3. Otimização das condições de propagação do fermento.....	69
4.3.1. Propagação1: propagação em 4 etapas em concentrações crescentes de melaço.....	69
4.3.2. Propagação 2: propagação em duas etapas em melaço 12% e na presença de LC.....	70
4.4. Padronização de um meio para revitalização do leite de levedura entre ciclos de fermentação e sua comparação com o armazenamento em água sem revitalização.....	74
4.4.1. Efeito da concentração do melaço e da temperatura sobre a produção de biomassa na solução de revitalização.....	74
4.4.2. Efeito do pH da solução de revitalização.....	77
4.4.3. Efeito de variações na quantidade do coquetel de sais adicionado ao meio de revitalização resultano no meio de MR1.	80
4.4.4. Efeito do aumento da quantidade de lisado de levedura adicionado ao meio de revitalização resultando no meio MR2....	80
4.4.5. Efeito do armazenamento da levedura IQAr45-2 em água sem revitalização.....	81
4.5. Efeitos das revitalizações em meio MR1 e MR2 sobre o desempenho fermentativo da levedura a 34°C e 37°C	82
4.5.1. Comparação entre a revitalização em solução MR1, MR2 e água destilada (controle) entre fermentações sucessivas a 34°C.....	83
4.5.2. Comparação entre a revitalização em solução MR1, MR2 e	

água destilada (controle) entre fermentações sucessivas a 37°C.....	86
4.5.3. Variações dos parâmetros fisiológicos ao final dos ciclos de fermentação a 34°C e 37°C.....	89
4.6. Variações em biomassa e parâmetros fisiológicos em função do tempo de revitalização nos meios MR1, MR2 e água destilada.....	90
4.7. Ensaio qualitativo da resistência conferida por teores diferentes de trealose dos inóculos sobre o crescimento da levedura em condições de estresse osmótico, alcoólico e térmico.....	93
4.8. Efeito do tratamento ácido do fermento sobre a viabilidade e fenótipo das colônias em meios diferenciais.....	94
4.9. Limites da acidez láctica e acética para o crescimento da linhagem IQAr/45-2.....	99
CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS.....	106
APÊNDICE.....	114

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cenário energético

O acúmulo de CO₂ na atmosfera é considerado como um dos principais contribuintes para o aquecimento global e alterações climáticas que vem ocorrendo ao longo dos anos (WARD; SINGH, 2002). A crescente preocupação com as mudanças ambientais do planeta e uma possível crise energética fez com que formas de energias limpas e/ou renováveis recebessem mais atenção e investimento. Dentre essas formas alternativas de energia estão: energia eólica, solar, hidráulica, biomassa e biocombustíveis (biodiesel e etanol).

O etanol não era usado em quantidades significativas até meados dos anos 1970. O aumento do preço do petróleo durante a primeira crise do petróleo impôs graves encargos cambiais para os países dependentes de sua importação, incluindo o Brasil. Como um dos principais produtores de açúcar de cana, o Brasil encontrava-se bem situado para explorar a produção de etanol como uma alternativa à gasolina, sendo que seu uso reduz as emissões de CO₂ veicular em 90% (WARD; SINGH, 2002). O Brasil tem uma longa história de produção de biocombustíveis datando de 1975 quando o Programa Nacional do Álcool Combustível (Proálcool) foi iniciado. O programa foi destinado a aumentar a produção de bioetanol como um substituto para a gasolina, redirecionando parte da produção de cana para a geração de etanol, reduzindo as importações de petróleo (BALAT; BALAT, 2009; GOLDEMBERG, 2008).

Desde então, a agroindústria canavieira brasileira tem se expandido, consolidando-se economicamente com indicadores positivos de sustentabilidade ambiental. A partir do Proálcool deu-se vida nova ao setor, com investimentos em equipamentos, serviços e desenvolvimento de novas tecnologias, tanto na parte agrícola quanto para a industrial (BANCO..., 2009). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar (569 milhões de toneladas em 2009) processando 45% da produção mundial e destinando aproximadamente 50% desse material bruto para a produção de etanol, resultando em cerca de 27 bilhões de litros na safra de 2008/2009 (UNICA, 2011).

1.2. Produção de etanol

O etanol pode ser fabricado por via química ou fermentativa. A primeira é aplicada esporadicamente no Brasil, e efetuada a partir de hidrocarbonetos não-saturados (eteno e etino), de gases do petróleo e de hulha. É uma forma competitiva, que apresenta bom potencial de expansão nos próximos anos. A via fermentativa, no entanto, é a mais importante no Brasil. Essa forma sempre terá importância tanto na produção de combustível como também de aguardente. A fabricação do etanol compreende três etapas distintas: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação (Figura 1) (AMORIM; LEÃO, 2005).

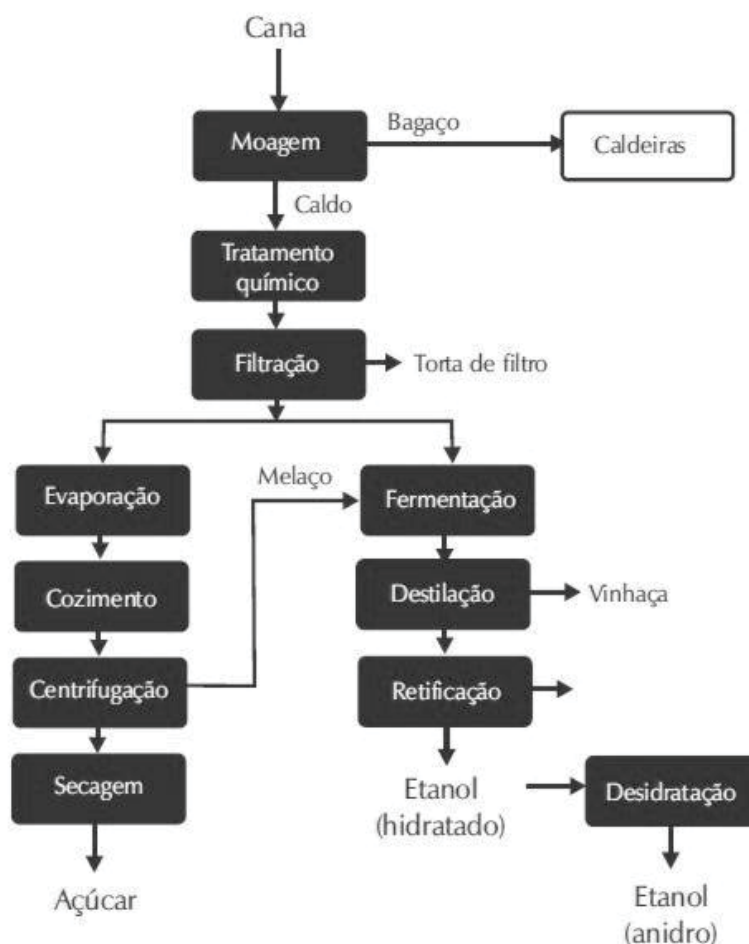


Figura 1 – Esquema da produção de etanol de cana-de-açúcar (BANCO..., 2009)

1.2.1. Matéria-Prima

O etanol pode ser obtido por uma grande variedade de matérias-primas renováveis, que são classificadas em três grupos principais: (1) aqueles que contêm grandes quantidades de açúcar prontamente fermentescíveis (cana-de-açúcar, beterraba), (2) amido e frutanas (milho, batata, arroz, agave, trigo) e (3) material celulósico (forragem, madeira, bagaço de cana-de-açúcar) (INGLEDEW *et al.*, 2009).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma cultura tropical e subtropical pluri-anual, com colheita anual. Admite-se que, em grandes culturas e condições normais, a média do rendimento agrícola atinge entre 85 e 100 toneladas por hectare por ano. O caldo obtido da moagem da cana-de-açúcar pode conter: 78 a 86% de água, 10 a 20% de sacarose, 0,1 a 2% de açúcares redutores, 0,3 a 0,5% de cinzas e 0,5 a 1,0% de compostos nitrogenados (LIMA *et al.*, 2001; WHEALS *et al.*, 1999).

O caldo de cana-de-açúcar é usado para a produção de açúcar, e parte do mesmo pode ser usado diretamente como substrato para a fermentação. Da cristalização e centrifugação do açúcar resulta um produto secundário conhecido como melaço. Em fermentações, o melaço pode ser misturado ao caldo em diferentes proporções. A composição mineral dos substratos de cana podem variar (Tabela 1), dependendo da proporção de melaço usado no meio, variedade e maturidade da cana-de-açúcar, solo, clima e processamento do caldo (AMORIM; LEÃO, 2005). O melaço ainda pode ser usado só, como já ocorre em certas destilarias, nesse caso ele pode ser diluído com água e tratado com ácido sulfúrico (pH 4,5). O melaço contém carboidratos que podem ser prontamente utilizados pelas leveduras produtoras de álcool sem nenhum pré-tratamento (MURTAGH, 1999).

Tabela 1 – Variação de mineirais presentes no mosto
(AMORIM; LEÃO, 2005)

Mineral	Variação no mosto (mg.L⁻¹)
N assimilável	7 – 350
Fósforo	20 – 200
Potássio	300 – 12000
Magnésio	80 – 3900
Enxofre	80 – 3900
Cálcio	150 – 2000
Zinco	0,45 – 9
Cobre	0,20 – 8
Manganês	2 – 8
Alumínio	5 – 240

1.2.2. Fermentação descontínua alimentada

Nesse tipo de processo, também conhecido por batelada alimentada, o mosto e/ou nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e seus produtos só são retirados no final do processo. A vazão de alimentação pode variar com o tempo ou ser constante, e a adição de mosto pode ser contínua ou intermitente (SCHMIDELL, 2001).

Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de alimentação é possível controlar a concentração de substrato de modo que o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (SCHMIDELL, 2001).

Esse tipo de operação apresenta as seguintes aplicações: 1) Minimizar os efeitos do controle do metabolismo celular, aplicação na qual a concentração de glicose é mantida em baixa concentração, restringindo o crescimento em detrimento do aumento do produto via desrepressão enzimática; 2) Minimizar a formação de produtos tóxicos do metabolismo (e.g. ácido acético); 3) Superar os problemas frequentes de instabilidade em processo contínuo, como por exemplo contaminação e mutação; 4) Adequar o processo a condições operacionais, como por exemplo a menor formação de espuma através de vazões decrescentes de alimentação (ZHANG, 2009). Ao fim do processo, as células são separadas do meio fermentado por centrifugação e reusadas em subseqüentes fermentações depois de tratamento em ácido sulfúrico para reduzir a contaminação bacteriana. Tempos curtos de

fermentação (6 a 10h) permitem que a levedura seja reciclada até três vezes por dia, por um período de 200 dias (WHEALS *et al.*, 1999).

1.2.3. Leveduras

As leveduras são organismos eucarióticos unicelulares e seu tamanho varia de 1 a 5 μm em largura e 5 a 30 μm ou mais em comprimento, não apresentando flagelos ou outros meios de locomoção. Apresentam parede celular rígida formada por manana, um polímero de manose. Elas apresentam-se sob formas variadas, de esférica a ovóide, de elipsóide a filamentosa (PELCZAR, 1997). As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são tradicionalmente usadas nas indústrias de panificação, produção de cervejas e vinhos, além de serem extensivamente estudadas para a produção de etanol combustível, processo no qual as células estão sujeitas a variedade de condições adversas (ZHAO; BAI, 2009). O estudo da revitalização do fermento é de vital importância quando se considera os teores de compostos tóxicos à fermentação, visto que, se eles são produzidos durante a fermentação podem acumular-se no inóculo, promovendo perdas em viabilidade, alterando seu estado fisiológico, abaixando a eficiência e diminuindo a produtividade (MARQUES; SERRA, 2004).

1.2.4. Fermentação

Organismos quimiotróficos usam compostos químicos como fonte de energia. São aqueles que obtêm energia de nutrientes orgânicos e que devem, inicialmente, decompô-los em compostos mais simples que possam ser utilizados para a produção de ATP. Isto é feito por uma série de reações químicas consecutivas, catalisadas por enzimas, chamada catabolismo. Muitos organismos heteroquimiotróficos podem degradar monossacarídeos, especialmente o açúcar de seis carbonos, a glicose. Embora existam diferentes vias de degradação, a glicólise é a via mais comum. Nessa via uma molécula de glicose é clivada e convertida em 2 moléculas de ácido pirúvico, com a formação de 2 moléculas de ATP e 2 moléculas de NADH_2 (Figura 2) Como as células possuem uma quantidade limitada de NAD^+ devem dispor de meio de regenerar continuamente o NAD^+ a partir de NADH_2 para que a glicólise não seja interrompida (PELCZAR, 1997; NORDSTRÖM *et al.*, 1966).

Os seres vivos usam dois métodos para realizar essa regeneração: a respiração e a fermentação. Na respiração, o NADH_2 é utilizado como doador de elétrons para um sistema de transporte de elétrons localizado nas cristas mitocondriais, tendo como principalceptor final de elétrons o oxigênio. Como resultado são formadas 38 moléculas de ATP. Já, a fermentação é um processo independente do oxigênio no qual o NADH_2 é produzido durante a glicólise ou outra via de degradação é utilizado para reduzir um aceptor orgânico de elétrons produzido pela própria célula. Na fermentação alcóolica esse aceptor é o acetaldeído, sendo reduzido a etanol e regenerando assim o NAD^+ . A fermentação é um processo pouco eficiente na produção de energia, porque os produtos finais ainda contêm grande quantidade de energia química, razão pela qual o etanol é um excelente combustível (PELCZAR, 1997).

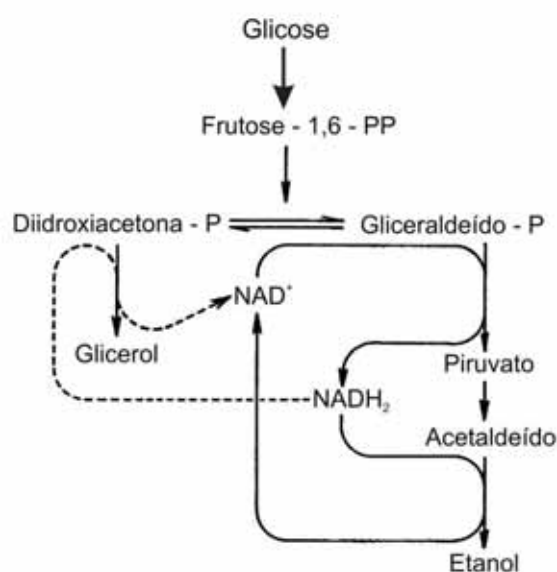


Figura 2 – Esquema simplificado da regeneração de NAD^+ em células de levedura (NORDSTRÖM *et al.*, 1966)

1.3. Fisiologia e Estresse

As linhagens industriais são submetidas a muitas condições adversas impostas pelo processo, tais como: a limitação por falta de sais minerais (fosfato, sais de amônio e minerais traço), altas temperaturas atingidas nas dornas, efeito inibitório do etanol, estresse osmótico (ZHAO; BAI, 2009), produção de ácidos

orgânicos (lático, málico, fumárico e succínico) e inibidores (aldeído e acetato), presença de contaminantes como bactérias (*Lactobacillus sp*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus sp*, *Acetobacter sp*) (GALLO; CANHOS, 1991) e leveduras selvagens (*Saccharomyces sp*, *Pichia sp*, *Candida sp*) (CABRINI; GALLO, 1999). O efeito de todos esses fatores ainda são intensificados pela prática da reciclagem de células (BASSO *et al.*, 2011).

As respostas ao estresse em leveduras são caracterizadas pela síntese de proteínas de choque térmico, aumentos nos níveis de trealose e glicerol, alterações na composição lipídica e atividade ATPase da membrana plasmática e, no caso de estresse oxidativo, produção das enzimas glutatona e superóxido dismutase (BIRCH; WALKER, 2000).

Em *S. cerevisiae*, elementos de controle transcricional, denominados elementos de resposta ao estresse (STREs) foram indentificados, sendo ativados por uma grande variedade de condições de estresse (WALKER, 1998). Segundo Amorim e Leão (2005), a presença de estresse não é totalmente prejudicial para o processo pois em condições muito favoráveis as leveduras multiplicam-se excessivamente desviando mais açúcar para a formação de seus constituintes celulares, ou seja biomassa, diminuindo a produção de etanol.

Os estudos das respostas dos micro-organismos às situações de estresse são de grande importância para entender como as células podem responder e se adaptar às várias mudanças nos ambientes em que vivem (ATTFIELD *et al.*, 2001). Segundo Brejning e Jespersen (2002), a exposição das células de levedura em um novo meio enriquecido levaria a uma resposta imediata através de mudanças nas vias bioquímicas. Como essas mudanças estão relacionadas ao estado fisiológico celular, elas poderiam refletir o desempenho das células durante o processo.

1.3.1. Estresse osmótico

Quando submetidos a alterações na osmolaridade do meio, uma série de mudanças moleculares, fisiológicas e morfológicas conhecidas como respostas ao estresse osmótico aparecem na maioria dos micro-organismos . A resposta mais pronunciada a esse tipo de estresse parece ser a produção e acúmulo intracelular de solutos osmoprotetores (osmólitos), tais como glicerol, arabitol e manitol. A capacidade de produzir, conservar ou exportar esses osmólitos é um processo bem

controlado e parece ser uma característica intrínseca de todos os organismos vivos. Os processos adaptativos à hiper-osmolaridade têm sido bastante estudados, mas o estresse hipo-osmótico tem recebido menos atenção. A exposição das células a um meio hipo-osmótico gera um rápido influxo de água e aumentando o volume das células. Por efeito da turgescência, a pressão aumenta e a célula pode romper-se. Para superar esta situação, a célula precisa ajustar os seus níveis intracelulares de soluto. Esse mecanismo é feito principalmente pela ativação de transportadores de membrana que permitem que o efluxo de solutos e íons (KAYINGO *et al.*, 2001).

Pode-se deduzir que o estresse osmótico imposto por açúcares parece ser praticamente desconsiderados durante a fermentação. Durante a produção de etanol combustível por batelada alimentada, com tempo de alimentação de 4-6 h, as concentrações totais de açúcares dificilmente excedem 5-7% (p/p) durante a alimentação. De fato, em algumas ocasiões, a taxa de consumo de açúcar pelas células de levedura é igual à própria taxa de alimentação, e níveis muito baixos de açúcares, menores que 2% (p/v), são atingidos. (BASSO *et al.*, 2011).

Por outro lado, o estresse osmótico causado por sais, que estão presentes em grandes quantidades no melaço de cana, é uma questão de preocupação. Os elevados níveis de cálcio, potássio e magnésio encontrados neste substrato, excedem os requisitos para a nutrição das leveduras. Os níveis médios de potássio (4.000 mg.L^{-1}) são suficientemente elevados para induzir respostas de estresse, aumentando a formação de glicerol, reduzindo os carboidratos de reserva e baixando a produção de etanol (BASSO *et al.*, 2011).

1.3.2. Etanol

Em vista das concentrações elevadas de etanol ao fim de cada ciclo de fermentação, entre 8 e 12% (v/v), o álcool é um dos principais fatores de estresse que agem sobre a levedura. O papel inibitório do etanol sobre *S. cerevisiae* não é totalmente compreendido até o momento. Mesmo assim, o principal alvo do etanol é considerado a membrana citoplasmática das células (Figura 3). A fluidez da membrana, a qual está relacionada com a sua composição lipídica, é profundamente alterada na presença de etanol e, como um resultado, a permeabilidade da membrana para alguns íons (especialmente íons H^+) é significativamente afetada. A entrada dos íons nas células, alteram a formação e manutenção da força motriz com

subsequente diminuição do pH intracelular. Além de afetar a composição da membrana, o etanol pode inibir o crescimento e causar inativação enzimática, levando a uma diminuição da viabilidade celular (BASSO *et al.*, 2011).

As células de levedura devem manter a viabilidade alta ao final de cada ciclo de fermentação, a fim de resistir ao reciclo. É por isso que uma determinada linhagem pode ter um bom desempenho em um ciclo de fermentação, com um teor final de etanol de 18% (v/v), mas as células de baixa viabilidade não podem ser utilizadas nos ciclos subsequentes de fermentação (BASSO *et al.*, 2011). Além disso, o estresse por etanol pode ser intensificado pela alta temperatura e acidez, e todos esses fatores estressantes são impostos simultânea ou sequencialmente para as leveduras (DORTA *et al.*, 2006). A tolerância ao etanol é um fenótipo complexo, sendo que mais de 250 genes parecem estar envolvidos com essa característica. A maioria destes genes está relacionada com o metabolismo da energia, a síntese lipídica, homeostase iônica e síntese de trealose (BASSO *et al.*, 2011).

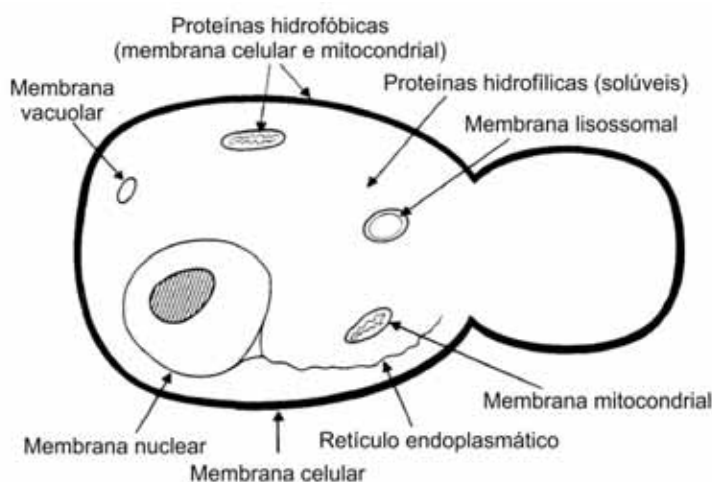


Figura 3 – Possíveis alvos do etanol na célula de levedura (D'AMORE *et al.*, 1990)

1.3.3. Acidez

Embora seja bem conhecido que as leveduras possam tolerar pH baixo, o tratamento do "creme de levedura" (pH 1,8-2,5) com ácido sulfúrico a fim de reduzir contaminação bacteriana, provoca alterações fisiológicas nas células. Isto é observado por perda celulares de minerais (N, P, K, Mg) e uma diminuição do nível de trealose celular em paralelo com a queda de viabilidade (BASSO *et al.*, 2011).

Os ácidos orgânicos fracos presentes no substrato ou produzidos por bactérias contaminantes, podem também prejudicar o processo.

1.3.4. Outros estresses

A presença de níveis tóxicos de alumínio nos substratos provenientes da moagem da cana é também responsável por prejudicar o desempenho da fermentação. Devido à condição ácida da fermentação, o alumínio (absorvido pela cana em solos ácidos) está presente principalmente em sua forma tóxica (Al^{3+}), levando a sérios problemas durante a fermentação. Esse íon afeta negativamente a viabilidade, os níveis celulares de trealose, a taxa de fermentação e produção de etanol. Os efeitos tóxicos do alumínio podem ser parcialmente reduzidos por íons de magnésio e completamente neutralizados em um meio rico como o melaço, sugerindo a presença de compostos quelantes neste substrato (BASSO *et al.*, 2011).

A temperatura também é conhecida como um agente estressante, intensificando os estresses ácidos e por etanol sobre as leveduras, afetando o metabolismo e resultando na formação de metabólitos secundários como glicerol, ácido acético e succínico (TORIJA *et al.*, 2002). Apesar disso várias tentativas foram feitas a fim de selecionar cepas termo-tolerantes para a fermentação industrial. Como a contaminação bacteriana é fortemente estimulada pela temperatura acima de 32°C, argumenta-se se temperaturas mais elevadas seriam viáveis (BASSO *et al.*, 2011)

O nível residual de sulfito, utilizado para clarificação do caldo de cana, apesar de ser considerado um produto tóxico para levedura a um nível de 200 mg.L⁻¹, pode ser considerado benéfico para a fermentação, uma vez que pode reduzir contaminação bacteriana. Outros agentes estressantes também podem prejudicar o processo, tais como os herbicidas usados nos campos de cana-de-açúcar, os fenóis encontrados no caldo de cana e quantidades excessivas de ferro no melaço (BASSO *et al.*, 2011).

1.3.5. Respostas fisiológicas

1.3.5.1. Trealose

De acordo com vários autores, o estado fisiológico pode ser avaliado pela medida de diferentes indicadores. As reservas de carboidrato são conhecidas por serem importantes para a sobrevivência das leveduras durante o armazenamento, sendo usadas para manter as funções metabólicas essenciais (GABIER *et al.*, 2005). A habilidade de acumular esses carboidratos de reserva é um critério importante para a seleção de linhagens industriais devido ao seu envolvimento na robustez celular e qualidade do extrato de levedura (e.g. para aplicações alimentícias), como descrito por Hazelwood *et al.*, (2009). A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas unidades de glicose através de uma ligação $\alpha 1 \leftrightarrow 1\alpha$ (LEHNINGER *et al.*, 2002). Apresenta grande ocorrência, sendo detectado em muitos procariotos, fungos e em algumas plantas e animais. O metabolismo da trealose pode incluir mais de uma enzima, como a trealose fosfatase e trealose sintase responsáveis pela biossíntese. Outra enzima importante é a trealase, que parece estar envolvida no metabolismo energético e desempenhando papel regulatório nos níveis de trealose, controlando sua concentração de acordo com os níveis de estresse. (ELBEIN, 2003).

O primeiro passo na biossíntese da trealose é a formação da trealose-6-fosfato (T-6-P), a partir da uridina-5-difosfoglicose (UDPG) e glicose-6-fosfato (G-6-P), pela ação da enzima trealose-6-fosfato sintetase (TPS). O grupo fosfato da T-6-P é removido por uma fosfatase específica, trealose-6-P-fosfatase (TPP), formando a trealose (Figura 4). A degradação da trealose é feita por duas trealases distintas, uma ácida, confinada nos vacúolos, e outra neutra, localizada no citosol, que é ativada pela fosforilação do AMP cíclico (GANCEDO; FLORES, 2004).

Segundo Lillie e Pringle (1980), também observa-se acúmulo de trealose quando ocorre diauxia e a fonte preferencial de carbono é limitante. Esses autores verificaram que a trealose pode corresponder até 20 % da massa seca da célula.

Originalmente, a trealose, juntamente com o glicogênio, eram considerados substâncias com a função primária de reserva energética para a levedura, porém, recentemente, vários autores (ELBEIN *et al.*, 2003, MAHMUD *et al.*, 2010, ERDEI *et al.*, 2011) sugerem que a trealose desempenhe também a função de proteção celular durante os processos de estresse, tais como altas temperaturas, choque

osmótico, efeitos tóxicos do etanol e desidratação, ficando o glicogênio como o principal carboidrato de reserva (ALCARDE; BASSO, 1997).

Acredita-se que a trealose mantenha a integridade da membrana plasmática, uma vez que essa integridade e suas funções são críticas para a sobrevivência da levedura (GABIER *et al.*, 2005). Esse dissacarídeo estabiliza as membranas formando pontes de hidrogênio com os grupos polares dos fosfolipídios da membrana. A presença de trealose no citosol aumenta a pressão osmótica e, portanto, reduz a mobilidade da água para fora da célula mantendo o volume celular. Ela também protege as proteínas da desnaturação substituindo a água de sua superfície (GABIER *et al.*, 2005; FRANÇOIS; PARROU, 2001).

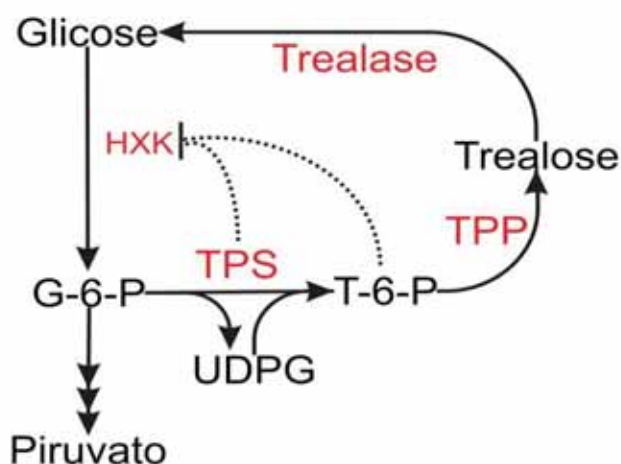


Figura 4 – Esquema do metabolismo da trealose em *S. cerevisiae*. G-6-P é glicose-6-fosfato, UDPG é uridina-5-difosfoglicose, T-6-P é treiose-6-fosfato, TPS é treiose-6-fosfato sintase, TPP é treiose-6-fosfato fosfatase, e HXK é hexoquinase (EASTMOND *et al.*, 2003, modificado)

1.3.5.2. Proteínas

Paralelamente, todos esses estresses que induzem a formação de trealose também induzem a formação de proteínas, principalmente as de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSPs) (ATTFIELD, 1987).

As HSPs são uma família conservada de proteínas cuja expressão aumenta em resposta a uma variedade de estresses diferentes. O seu papel como chaperonas facilita a síntese e enovelamento de proteínas em toda a célula. Além disso, as HSPs participam na montagem, secreção, transporte e degradação de proteínas e na regulação dos fatores de transcrição e proteínas quinases. Níveis

altos de HSPs desempenham um papel central na homeostase celular. Apesar da sua designação como HSPs ou proteínas de estresse, sabe-se que quase todas estas proteínas estão presentes na célula sob condições normais e que sua síntese aumenta após a indução por estresse. As chaperonas facilitam as etapas iniciais de montagem e enovelamento de outras proteínas celulares, funcionando como proteínas auxiliares. Elas agem através da estabilização e reorganização dos polipeptídeos e assim reduzem a probabilidade de erro durante a síntese proteica, facilitando a capacidade das células de reparar e sintetizar novas proteínas para substituir aquelas que foram danificadas após estresse (ENZO..., 2010).

Segundo Ding *et al.*, (2009), o pré tratamento com choque térmico, induzindo a síntese de HSPs, poderia resultar em um aumento significativo na tolerância ao etanol. Já, segundo Hohmann e Mager (1997), a mudança das células de levedura de 23°C para 36°C resulta na indução da expressão de uma gama de genes que codificam para as respostas celulares ao estresse, as células passam a sintetizar um número grande e diversificado de proteínas em diferentes níveis e com atividades diferentes daquelas desempenhadas antes da exposição ao estresse.

1.3.5.3. Glicerol

O glicerol é um polihidroxi álcool que pode ser consumido e utilizado pelas leveduras como um recurso de carbono e energia. Além disso, o glicerol é também produzido como um produto secundário durante a fermentação de açúcares a etanol e sua síntese tem funções fisiológicas importantes (HOHMANN; MAGER, 1997).

A síntese desse composto é umas das respostas a diversas situações de estresse. Sua síntese depende de vários fatores, tais como a linhagem selecionada, quantidades de células inoculadas, concentração de bissulfito presente no mosto, concentração de açúcares, estresse osmótico, tipo de fonte de nitrogênio e sua concentração, pH, e aeração (ALBERS *et al.*, 1996; GARDNER *et al.*, 1993; OUGH *et al.*, 1972; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2000; TORIJA *et al.*, 2002; CARRASCO *et al.*, 2001). O glicerol é o principal subproduto da fermentação, formado principalmente como resultado de reações de reoxidação para consumir o excesso de NADH₂ formado, auxiliando no balanço redox celular. Durante as fermentações industriais, 5 a 8% dos açúcares consumidos são desviados para a formação de glicerol (BASSO *et al.*, 2011). A produção elevada de glicerol está relacionada com o

aumento da expressão de duas isoenzimas (GPD1 e GPD2) da glicerol-3-fosfato desidrogenase (PIGEAU; INGLIS, 2005). O acúmulo intracelular de glicerol em *S. cerevisiae* também está relacionado ao equilíbrio osmótico, sendo controlado por um canal proteico (Fps1). Sob condições de estresse hiper-osmótico, o canal é fechado conservando o glicerol dentro da célula a fim de manter um equilíbrio osmótico com o ambiente externo. Na ausência desse estresse, o canal permanece aberto e o glicerol difunde-se livremente da célula (WANG *et al.*, 2001).

1.4. Exigências nutricionais

Os microelementos apresentam um papel importante no metabolismo celular uma vez que são requeridos como co-fatores por um grande número de enzimas. Íons de Zn, Cu e Mn têm um efeito positivo na atividade respiratória e taxa de crescimento de *S. cerevisiae* (STEHLIK-TOMAS *et al.*, 2004). O Mg, por outro lado, está envolvido em muitas funções fisiológicas, incluindo crescimento, divisão celular e atividade enzimática. Os íons de magnésio diminuem a permeabilidade da membrana plasmática aos prótons e ânions, estabilizando a bicamada lipídica da membrana, eles ainda estão associados à proteção celular em presença de etanol (BIRCH; WALKER, 2000). O zinco atua como co-fator em enzimas, como a álcool desidrogenase, aumentando o crescimento e produção de etanol na quantidade de 5-15 μM (STEHLIK-TOMAS, 2004). Walker (1998) descreveu que os limites ótimos dos cátions Mg^{2+} e Zn^{2+} para crescimento das leveduras são respectivamente 2-4 mmol.L^{-1} e 4-8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A reprodução de *S. cerevisiae* varia em função do nível de nutrientes encontrados na matéria-prima, entre eles o nitrogênio e fósforo constituem as principais exigências nutricionais para o crescimento e eficiência da produção de etanol, pois estão presentes nos ácidos nucleicos e fosfolipídios. A suplementação com DAP (Di-amônio-fosfato) tem sido usada como fontes de fosfato e nitrogênio. A necessidade de DAP apresenta um ótimo entre 32 a 54 ppm dependendo da matéria-prima (MUHKTAR *et al.*, 2010).

Segundo Amorim e Leão (2005), existem vários tipos de nitrogênio no mosto, entre eles, o nítrico resultante da adubação do solo, o amínico das proteínas e o amoniacal. Normalmente, a cana-de-açúcar traz grande quantidade do primeiro, que não é utilizado pela levedura. As formas mais utilizadas pelas leveduras para

sintetizar seus constituintes celulares são a amoniacal e amínica, requerendo quantidades adequadas de nitrogênio assimilável para um crescimento rápido (EARNEST *et al.*, 2009).

O teor de proteína e aminoácidos é o referencial mais importante no estabelecimento do valor nutricional. Esse teor tem variado, em leveduras secas comercializadas, numa faixa ampla de 28-45%. Essa variação pode ser atribuída a diversos fatores como a linhagem da levedura, composição do meio de fermentação, impurezas presentes no meio de fermentação e no leite de levedura centrifugado, métodos e cuidados na secagem da levedura, entre outros (PULZATTO, 2000).

Embora o valor nutricional das proteínas de levedura seja considerado adequado se comparável ao de outras fontes de uso convencional, é preciso lembrar que elas não se encontram em uma forma totalmente disponível nas células intactas, necessitando de procedimentos para extração de seus constituintes.

A composição química bruta da biomassa da levedura é de 7,5-9,0% de nitrogênio, 47-56% de proteína, 6-15% de ácidos nucleicos, 5,0-9,5% de cinzas e 2-6% de lipídios (PULZATTO, 2000). Dentre os aminoácidos determinados em *Saccharomyces cerevisiae* destacam-se: lisina (8,43%), leucina (8,13%), valina (6,67%), arginina (5,35%), treonina (5,20%), isoleucina (5,19%), tirosina (4,87%), fenilalanina (4,50%) e outros como histidina, cistina, metionina e triptofano (PULZATTO, 2000). Já, segundo Steckelberg (2001), os aminoácidos mais abundantes em várias linhagens de leveduras estudadas são: ácido glutâmico (11-12%), ácido aspártico (11-12%) e lisina (8-9%).

Segundo Pulzatto (2000), em termos nacionais o potencial de produção de levedura seca proveniente da fermentação alcoólica pode garantir uma ampla oferta desse produto, de modo a interessar decisivamente as empresas no desenvolvimento de produtos contendo levedura seca (por exemplo, enriquecimento de rações animais). A levedura produzida pode ser vendida na forma de levedura prensada ou levedura seca.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo principal do projeto de pesquisa consistiu na padronização de uma condição em que as células pudessem ser mantidas e/ou revitalizadas entre os ciclos de fermentação sucessivos, de forma que isso refletisse melhorias no desempenho do processo.

Objetivos específicos

- Melhorar as condições de propagação do inóculo para que se possa iniciar cada ciclo de fermentação com células fisiologicamente adaptadas ao processo;
- Padronização de condições para o armazenamento e/ou revitalização do fermento entre um ciclo de fermentação e o seguinte;
- Comparar os efeitos da revitalização sobre a fermentação com os indicadores do desempenho fisiológico para buscar uma forma de prever alterações na condução dos ciclos sucessivos de fermentação;
- Efeitos das condições de tratamento ácido da levedura sobre os fenótipos das colônias e viabilidade celular;
- Determinar os limites máximos de concentração dos ácidos láctico e acético que possam ser tolerados pela levedura sem prejuízos em variáveis do processo.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Leveduras utilizadas

As leveduras utilizadas foram: IQAr/45-2 e PE-2. A linhagem IQAr/45-2 foi obtida a partir da levedura geneticamente construída de *Saccharomyces cerevisiae* IQAr/45-2 (Protocolo N° 01808004893, INPI, Brasil) enquanto que a PE-2 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr Luiz Carlos Basso, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-USP, Piracicaba, SP.

A cultura estoque das leveduras foi mantida a 4°C em *vials* contendo meio YPD sólido.

3.2. Meios de cultivo

3.2.1. Melaço de cana-de-açúcar e sua clarificação

O meio de cultivo utilizado nos experimentos foi o melaço de cana-de-açúcar clarificado. O melaço bruto foi gentilmente doado pela Unidade São José da Usina Zilor Engenharia e Alimento, localizada em Macatuba-SP e pela Usina São Martinho, localizada na Fazenda São Martinho em Pradópolis-SP, apresentando as seguintes características: °Brix de 82 a 83%, Pol de 55 a 56% e pureza de 66 a 68%.

O melaço bruto foi diluído na proporção de 1:1 e teve o pH ajustado para 4,5 com H_2SO_4 6mol.L⁻¹. Em sequência a clarificação foi realizada através de aquecimento por vapor de autoclave a 100°C por 30 min, seguido de repouso por 48h a 4°C para a sedimentação dos sólidos suspensos e, por fim, sifonação do sobrenadante, para eliminar a presença de impurezas no meio (SGUAREZI *et al.*, 2009; CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009)¹.

O melaço clarificado permaneceu estocado a 4°C até o momento do uso. Depois de prontos, os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

¹ Trata-se de um método modificado por M. R. Morais, estudante de doutorado de nosso grupo de pesquisa. A modificação consiste no uso de H_2SO_4 em substituição ao $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e aumento no tempo de tratamento térmico de 15 min para 30 min.

3.2.2. Meio YPD

O meio YPD foi preparado segundo Sherman e Hicks (1991) e apresentou a seguinte composição (p/v):

Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%
Ágar	2%

Todos os ingredientes foram misturados em água e o meio foi esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C. Após autoclavagem o meio foi vertido em placa de Petri para solidificação.

3.2.3. Meio WL Nutrient (WLN)

Preparado segundo especificações do fabricante (Himedia Laboratories, M115-500G, lote 0000075378, Mumbai, India), contendo (p/v):

Extrato de levedura	0,4%
Caseína hidrolisada	0,5%
Glicose	5,0%
KH ₂ PO ₄	0,055%
KCl	0,0425%
CaCl ₂	0,0125%
MgSO ₄	0,0125%
FeCl ₃	0,00025%
MnSO ₄	0,00025%
Verde de bromocresol	0,0022%
Ágar	2%

Todos os ingredientes foram misturados em água e o meio foi esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C. Após autoclavagem o meio foi vertido em placa de Petri para solidificação.

3.2.4. Meios sólidos para determinação de resistência ao estresse

Etanol: Meio YPD sólido, contendo etanol na faixa de 8 a 12% (v/v). O etanol foi adicionado ao meio após a esterilização.

Temperatura: meio YPD sólido incubado na faixa de 30°C a 40°C.

NaCl: Meio YPD sólido, contendo NaCl na faixa de 4 a 10% (p/v). A solução de NaCl foi esterilizada por membranas filtrantes esterilizadas e adicionada ao meio após a esterilização do mesmo em autoclave.

3.2.5. Meio contendo ácido acético

Esse meio foi constituído por melaço 10% ART contendo ácido acético na faixa de 0,1 a 0,9% (p/v). O pH do meio foi ajustado para 4,5 e solidificado com ágar 2%. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C. A adição de ácido foi feita após a esterilização.

3.2.6. Meio contendo ácido láctico

Preparado como o anterior, porém acrescido de ácido láctico na faixa de 0,5 a 4% (p/v). A adição de ácido foi feita após a esterilização do meio por autoclave.

3.3. Lisado celular de levedura (LC)

Um lisado celular de levedura (LC) foi usado como fonte de nitrogênio orgânico e sua concentração é quantificada em termos de nitrogênio livre, usando-se glicina como padrão. Diferentes metodologias foram usadas para aumentar o teor de nitrogênio deste extrato. Os detalhes destes procedimentos estão sendo omitidos por haver na manutenção temporária de sigilo.

3.3.1. Dosagem do nitrogênio amínico livre

A dosagem do nitrogênio livre presente no LC foi feita pelo método da ninidrina segundo Abernathy *et al.*, (2009). Foi obtida uma curva padrão usando-se

uma solução de glicina (1072 mg.L^{-1}) para relacionar a absorbância com a concentração de aminoácidos livres (Figura 9 do Apêndice A).

A equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular $a = 0,040$ e coeficiente linear $b = -0,009$. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 0,040x - 0,009 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = Concentração de nitrogênio amínico livre (mg.mL^{-1})

Simplificando a equação 1, obtém-se:

$$Abs = 0,040 \cdot N_{livre} - 0,009 \quad (2)$$

$$N_{livre} = \frac{Abs + 0,009}{0,040} \times diluição \quad (3)$$

Os resultados obtidos pela equação 3 foram expressos em g.L^{-1}

Composição do reagente de Ninidrina:

Na_2HPO_4	4 g
KH_2PO_4	6 g
Ninidrina	0,5 g
Frutose	0,3 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Composição do reagente de diluição:

KIO_3	2g
Água destilada	600 mL
Etanol 96%	400 mL

Procedimento: Para a dosagem do nitrogênio amínico 2 ml do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1mL do reagente de ninidrina e os tubos foram aquecidos num banho de água a fervente durante 16 min. Os tubos foram resfriados em banho de gelo e em seguida adicionou-se 5 mL de reagente de diluição. Os tubos foram agitados e a absorbância foi medida a 575 nm.

3.3.2. Crescimento da levedura IQAr/45-2 em melaço acrescido de LC e outros aditivos

O efeito das concentrações de aditivos sobre o crescimento celular foi avaliado através de propagações agitadas com duração de 12h. As propagações foram realizadas em Erlenmeyers com 100 mL de melaço 5% ART, a 37°C. O meio foi inoculado com 1 g.L⁻¹ de células da linhagem IQAr/45-2.

Os aditivos testados foram: lisado celular de levedura (LC) na faixa de concentração de 0,3, a 2 g.L⁻¹ de nitrogênio orgânico, extrato de levedura comercial na faixa de concentração de 3 a 20 g.L⁻¹ (SHERMAN; HICKS, 1991), glutamato nas concentrações de 0,05, 0,1, 2,5 e 5,0 g.L⁻¹ (ALBERS *et al.*, 1996) sob a forma comercial de glutamato monossódico e solução mineral dos seguintes sais com suas respectivas concentrações finais no meio: 0,87 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,66 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,3 g.L⁻¹ uréia; 0,49 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,03 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,01 g.L⁻¹ MnSO₄.H₂O (BASSO *et al.*, 2008).

3.3.3. Comparação da adição de LC centrifugado e bruto sobre o crescimento da linhagem IQAr/45-2 em melaço

O efeito da adição de LC sobre o crescimento celular foi avaliado a partir de propagações agitadas com duração de 8h. As propagações foram realizadas em Erlenmeyers com 100 mL de melaço 5% ART, a 37°C. O meio foi inoculado com 1 g.L⁻¹ de células da linhagem IQAr/45-2. O teste consistiu-se na adição do sobrenadante resultante da lise com ou sem separação dos fragmentos celulares nas concentrações de 1 e 2 g.L⁻¹ de nitrogênio orgânico. A análise de crescimento foi feita a partir da contagem celular em câmara de Neubauer, uma vez que a presença de células intactas no LC acarreta em erros nas medidas de densidade ótica realizadas em espectrofotômetro. O número de células foi correlacionado com a absorbância através de uma curva padrão (Figura 1 do Apêndice A).

A equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular $a = 5,39 \times 10^{-8}$ e coeficiente linear $b = -0,023$. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 5,39 \times 10^{-8} x - 0,023 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = Número de células.mL⁻¹

Simplificando a equação 1, obtém-se:

$$Abs = 5,39 \times 10^{-8} \cdot N^{\circ} \text{ células.mL}^{-1} - 0,023 \quad (2)$$

$$N^{\circ} \text{ células.mL}^{-1} = \frac{Abs+0,023}{5,39 \times 10^{-8}} \times \text{diluição} \quad (3)$$

Posteriormente a absorbância obtida na relação anterior (3) foi correlacionada com a massa seca através de outra curva padrão (Figura 2 do Apêndice A).

A equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular a = 1,893 e coeficiente linear b = 0,026. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtem-se a seguinte relação:

$$y = 1,893 x + 0,026 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = biomassa seca (g.L⁻¹)

Simplificando a equação 1, obtém-se:

$$Abs = 1,893 \cdot \text{Biomassa g.L}^{-1} + 0,026 \quad (2)$$

$$\text{Biomassa g.L}^{-1} = \frac{Abs-0,026}{1,893} \times \text{diluição} \quad (3)$$

Dessa forma o número de células pôde ser convertido em biomassa através da equação 3.

3.4. Propagação do inóculo

O meio de propagação também foi preparado a partir de melaço clarificado e o inóculo foi propagado tanto a 34°C quanto a 37°C em pH inicial ajustado para 4,5 e agitação de 80 rpm. Foram realizados dois tipos de propagação:

3.4.1. Propagação em concentrações crescentes de açúcar (Método 1)

A primeira forma de propagação foi realizada em 4 etapas com tempo de cultivo de 12h cada (Figura 5), sendo a relação $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ de 5:2. Foram utilizadas concentrações crescentes de melaço: 3% ART (50mL de meio) na etapa 1, 10% ART (50mL de meio) na etapa 2, 16% ART (100ml de meio) na etapa 3 e 24% ART (200 ml de meio) na etapa 4. O melaço 3% foi inoculado com $0,24 \text{ g.L}^{-1}$ de células (massa seca) e após 12h de cultivo fez-se a transferência para o frasco contendo melaço 10%. Em sequência, fez-se nova transferência para o melaço 16% e por fim o meio foi transferido para o melaço 24%, de modo que a concentração final de açúcares foi 3%, 5%, 8% e 12% respectivamente para as etapas 1, 2, 3 e 4. Segundo Lima *et al.*, (2001) a propagação em concentrações e volumes crescentes de meio não deve ultrapassar 13°Brix. Essa propagação foi realizada a 34°C e a 37°C.

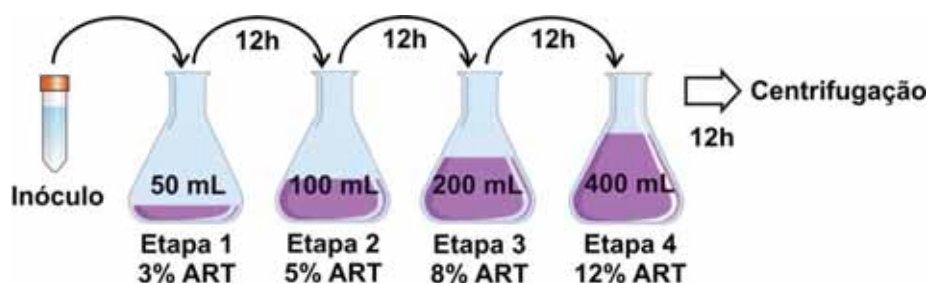


Figura 5 – Propagação realizada em 4 etapas a 34°C e 37°C com concentrações crescentes de melaço. As concentrações finais de açúcares redutores totais e volumes finais de meio para as etapas 1, 2, 3 e 4 foram respectivamente: 3%/50mL, 5%/100mL, 8%/200mL e 12%/400mL. Cada etapa teve a duração de 12h.

Após a propagação as células foram concentradas por centrifugação a 4700 rpm por 15 min, lavadas com água destilada esterilizada e suspensas em um volume pequeno de água estéril para obter-se o leite de levedura.

3.4.2. Propagação em duas etapas de concentração alta de açúcar (Método 2)

A segunda forma de propagação foi realizada em 2 etapas a 34°C e 37°C (Figura 6). A etapa 1 consistiu na inoculação de 100 mL de melaço 12% ART para uma concentração final de 1 g.L^{-1} de células (massa seca). Após 9h de cultivo o

meio foi separado em duas partes (corte) de 50 mL e cada parte foi acrescida de meio novo contendo 50mL de melaço 24% ART. A etapa 2, portanto, consistiu-se de 2 frascos com 100 mL de meio e concentração final de 12% ART em cada, tendo tempo de cultivo de 12h. Cada etapa foi realizada sob agitação (80 rpm) com o pH do meio ajustado para 4,5. Também testou-se a adição de lisado celular de levedura (LC).

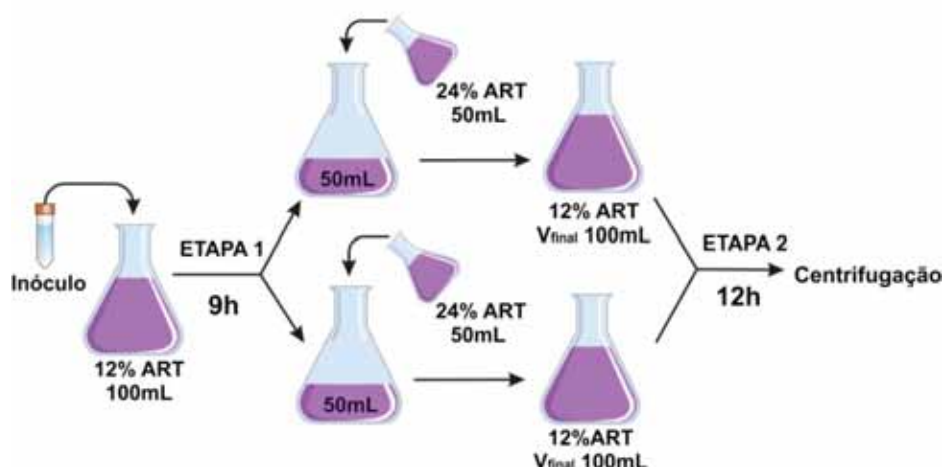


Figura 6 – Propagação realizada em 2 etapas a 34°C e 37°C utilizando melaço 12% ART. Após a primeira etapa, com duração de 9h, o meio foi separado em duas partes de 50 mL e acrescido de 50 mL de meio fresco com concentração de 24% ART. A concentração e volume final da etapa 2 foi 12% ART e 100mL, com duração de 12h.

3.5. Ensaios de fermentação em batelada alimentada

As fermentações ocorreram em modo de batelada alimentada em biorreatores de aproximadamente 250 mL de capacidade (Marconi, modelo MA505/2X4, Piracicaba, SP), como mostrado na Figura 7. A alimentação do reator teve duração de 3 horas com um fluxo contínuo de aproximadamente $0.38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ por meio de bomba peristáltica (Masterflex®, modelo 7518-00). Os reatores foram alimentados com melaço 28,5%, tal que após 3h a concentração de ART era de 20% em relação ao volume final. As temperaturas de fermentação foram de 34°C e 37°C, mantidas através de banho de água circulante, pH 4,5, inóculo inicial de $24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (9 % v/v, em relação ao volume final de trabalho). Para a padronização do tempo de fermentação foi realizado um único ciclo de fermentação em batelada alimentada, considerando-

se como tempo ideal de fermentação o momento no qual a produção de etanol tornou-se constante e o açúcar não foi mais consumido.

O melaço usado na fermentação foi suplementado com 1 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (DAP), $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como descrito na literatura (LIMA, *et al.*, 2001, STEHLIK-TOMAS *et al.*, 2004; SILVA, 2010, MUKHTAR *et al.*, 2010). Segundo Lima (2001), a adição de sais minerais é vantajosa para corrigir deficiências que o caldo e consequentemente o melaço normalmente apresentam.

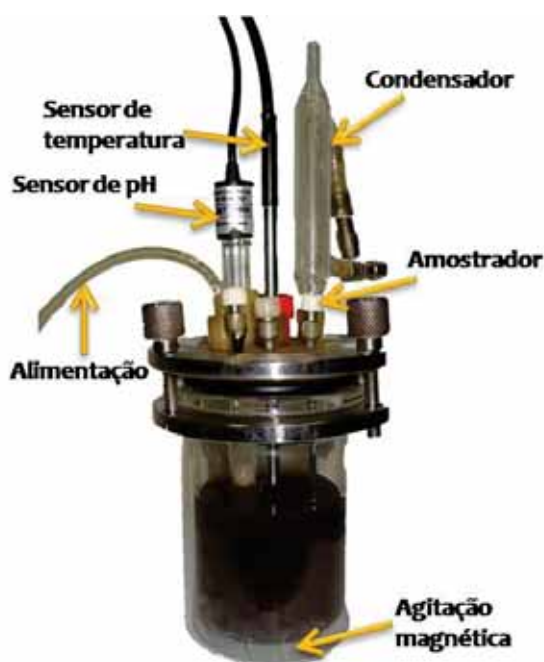


Figura 7 – Sistema utilizado nas fermentações em batelada alimentada (Marconi, modelo MA505/2X4, Piracicaba, SP)

3.6. Condições para revitalização do leite levedura

Considerou-se como revitalização a renovação da biomassa celular sem perda de viabilidade e as variações correspondentes dos indicadores do estado fisiológico das células durante a revitalização (trealose, glicerol e proteína).

A revitalização das células resultantes de um ciclo de fermentação (leite de levedura) foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de melaço na faixa de 5% a 12% (ART), temperatura de 30 e 34°C, pH 4,5 e 5,5, coquetel de sais e lisado celular de levedura (LC). A otimização da concentração do melaço e pH (itens 3.6.1 e 3.6.2 respectivamente) em presença das seguintes concentrações de

sais: 1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ ou DAP, 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O.

3.6.1. Ajuste da concentração do melaço e temperatura

A quantidade de células em suspensão na solução de revitalização variou na faixa de 19 a 29 g.L⁻¹ e com esse inóculo variou-se a concentração de melaço na faixa de 5 a 12% ART e a temperatura na faixa de 30°C a 34°C durante 16h da revitalização.

3.6.2. Ajuste do pH do melaço

Usando melaço 8% e temperatura de 30°C escolhidas como descrito anteriormente, variou-se o pH inicial do meio de revitalização na faixa de 4,5 e 5,5. O pH foi ajustado com NaOH 2,4mol.L⁻¹ ou H₂SO₄ 6mol.L⁻¹ no início do preparo do meio de revitalização.

3.6.3. Ajuste na quantidade do coquetel de sais adicionado ao melaço

O coquetel salino (1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ ou DAP, 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O) até então usado nos dois testes anteriores foi avaliado quanto à sua concentração no meio de revitalização em metade (0,5x) e o dobro (2x) de sua concentração original (1x). O meio no qual se adicionou os sais foi o melaço 8% a 30°C e com pH ajustado a 5,5. Após este ajuste o meio passou a chamar-se meio de revitalização 1 (MR1).

3.6.4. Ajuste na quantidade de lisado celular de levedura (LC) adicionado ao melaço

O LC foi adicionado ao meio de revitalização contendo melaço 8% a pH 5,5 na faixa de 0,5, a 2 g.L⁻¹ de nitrogênio orgânico.

3.6.5. Armazenamento em água em substituição ao meio de revitalização

As células coletadas ao fim de um ciclo de fermentação a 34°C e 37°C foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente até 16h. Ao final desse período, as células foram concentradas por centrifugação a 4700 rpm por 15 min, lavadas com água destilada e ensaios foram realizados no sobrenadante (glicerol, etanol, ART) e nos extratos celulares (trealose, proteínas, glicerol).

3.7. Ensaio qualitativo de resistência aos fatores de estresse durante a curva de revitalização

A fim de verificar se o alto teor de trealose poderia aumentar a resistência ao estresse, células da linhagem IQAr/45-2 foram coletadas em dois momentos distintos da curva de revitalização em meio MR1 (0h e 12h). Em 0h o teor de trealose era de 247 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$ e em 12h era de 62 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$. As células foram lavadas com água destilada estéril e inoculadas por replicação em meio YPD sólido contendo etanol 8%, 10% e 12% v/v (CARRASCO *et al.*, 2001), NaCl 4%, 6% e 10% p/v (LOGOTHETIS *et al.*, 2007) e no mesmo meio também foram submetidas a estresse térmico por crescimento a 37°C e 40 °C (HAMPSEY, 1997). A análise foi baseada na observação qualitativa do crescimento após 48h de incubação.

3.8. Resistência do leite de levedura ao tratamento ácido

Após 1 ciclo de fermentação, as células foram coletadas por centrifugação a 4700 rpm por 15 min, lavadas com água destilada estéril e suspensas em 50 mL de três meios contendo açúcares: água destilada estéril (controle), glicose 0,5% e melaço 1% (GARCIA, 2009). As células foram submetidas a um tratamento com ácido sulfúrico 6mol.L⁻¹, de modo que a verificação do pH e adição de ácido foi feita em intervalos de 30 min, mantendo-se o pH em aproximadamente 2,0 por 2h com a adição de pequenas quantidades de ácido. No início e ao final do tratamento as células foram plaqueadas em meio YPD e meio diferencial WLN.

3.9. Limites da acidez láctica e acética da linhagem IQAr/45-2

A concentração inibitória mínima (CIM) dos ácidos láctico e acético foi ensaiada por meio da replicação da linhagem IQAr/45-2 (1×10^8 células.mL⁻¹) em meio sólido de melaço 10% ART. Variou-se as concentrações de ácido láctico na faixa de 0 a 4% (p/v), ácido acético na faixa de 0 a 0,9% (p/v), como descrito por Narendranath *et al.*, (2001). Ensaiou-se também o efeito protetor de dois aditivos sobre as células, os quais foram adicionados ao meio sólido durante sua preparação: a) coquetel de sais (1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ ou DAP, 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O) e b) LC 1 g.L⁻¹.

A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração de ácido capaz de inibir o crescimento da linhagem após um período de 48 h.

3.10. Ensaio das variáveis dependentes do processo

Os ensaios foram:

3.10.1. Viabilidade celular

A viabilidade foi determinada pelo método do azul de metileno (LEE *et al.*, 1981). As células viáveis permaneceram incolores, enquanto as mortas tornaram-se azuis. A viabilidade foi expressa em valores de porcentagem e calculada pela seguinte relação:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células totais}} \times 100$$

Composição do reagente azul de metileno:

Glicose	5,0 g
KCl	0,21 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,24 g
NaHCO ₃	0,1 g
NaCl	4,5 g
Azul de metileno	0,125 g

Água destilada q.s.p. 500 mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada, sendo o reagente estocado a temperatura ambiente.

Procedimento: a suspensão de células foi diluída no reagente azul de metileno e, após 5 minutos de contato com o corante, realizou-se a contagem das células através de câmara de Neubauer e microscópio ótico comum com aumento de 40X (Microscópio Carl Zeiss, West Germany).

3.10.2. Açúcares redutores totais

O ART foi determinado usando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Foi obtida uma curva padrão usando-se uma solução de glicose 0,2%, (m/v) para relacionar a absorbância com a concentração de açúcar nos hidrolisados (Figura 3 do Apêndice A). A equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular $a = 28,74$ e coeficiente linear $b = -0,098$. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtem-se a seguinte relação:

$$y = 28,74 x - 0,098 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = Açúcares redutores totais (%)

Simplificando a equação 1, obtem-se:

$$Abs = 28,74 \cdot ART \% - 0,098 \quad (2)$$

$$ART \% = \frac{Abs + 0,098}{28,74} \times diluição \quad (3)$$

Composição do reagente DNS:

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	1,0 g
Tartarato de sódio e potássio	30,0 g
NaOH	1,6 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Os componentes foram dissolvidos em água destilada, a seguir adicionou-se o ácido dinitrosalicílico, sendo dissolvido separadamente. O reagente foi estocado a temperatura ambiente.

Procedimento: as amostras foram centrifugadas a 10400 rpm por 3 minutos a 4°C (centrífuga Sorvall, Legend Mach 1.6R, Thermo) o resíduo celular foi descartado enquanto o sobrenadante foi diluído em água destilada, hidrolisado em HCl 6mol.L⁻¹ por 7 minutos a 60°C e neutralizado com NaOH 2,4mol.L⁻¹. As medidas de absorbância foram obtidas utilizando um espectrofotômetro (marca Biospectro SP-22) a 546 nm.

3.10.3. Etanol

O etanol foi medido por cromatografia gasosa (modelo CG-37; Instrumentos Científicos, São Paulo, Brasil), operando com um detector de ionização de chama e usando uma coluna empacotada PAD/2499. A calibração foi feita com soluções padrões de concentração 0,5% e 1,0% (v/v). As concentrações de etanol foram expressas em g.L⁻¹.

Procedimento: o sobrenadante das amostras foi diluído 10 vezes em água destilada, 4µL desta solução foram injetados no cromatógrafo para obter as medidas proporcionais da concentração de etanol nas amostras em função do tempo de retenção.

3.10.4. Biomassa celular

A biomassa das leveduras IQAr/45-2 e PE-2 foram determinadas por medidas de densidade ótica a 570nm e convertidas a valores de massa seca (g.L⁻¹) através da correlação obtida por uma curva padrão (Figuras 4 e 5 do Apêndice A). A equação da reta obtida para a linhagem IQAr/45-2 mostrou um coeficiente angular a = 1,895 e coeficiente linear b = 0,0078. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtem-se a seguinte relação:

$$y = 1,895 x + 0,0078 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = Biomassa seca (g.L⁻¹)

Simplificando a equação 1, obtém-se:

$$Abs = 1,895. Biomassa \text{ g.L}^{-1} + 0,0078 \quad (2)$$

$$Biomassa \text{ g.L}^{-1} = \frac{Abs-0,0078}{1,895} \times diluição \quad (3)$$

Já, para a linhagem PE-2, a equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular a = 1,531 e coeficiente linear b = 0,073. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 1,531 x + 0,073 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = Biomassa seca (g.L⁻¹)

Simplificando a equação 1, obtém-se:

$$Abs = 1,531. Biomassa \text{ g.L}^{-1} + 0,073 \quad (2)$$

$$Biomassa \text{ g.L}^{-1} = \frac{Abs-0,073}{1,531} \times diluição \quad (3)$$

3.11. Ensaio dos parâmetros fisiológicos

3.11.1. Trealose

A trealose foi determinada usando o método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954; MAHMUD *et al.*, 2009; ROTH, 1970). Foi obtida uma curva padrão usando-se uma solução de glicose 60 µg.mL⁻¹ para relacionar a absorbância com a concentração de glicose (Figura 6 do Apêndice A). A equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular a = 0,030 e coeficiente linear b = -0,009. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtém-se a seguinte relação:

$$y = 0,030 x - 0,009 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = Glicose ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)

Simplificando a equação 1, obtém-se:

$$Abs = 0,030. \text{ glicose } \mu\text{g}.\text{mL}^{-1} - 0,009 \quad (2)$$

$$\text{glicose } \mu\text{g}.\text{mL}^{-1} = \frac{Abs+0,009}{0,030} \times \text{diluição} \quad (3)$$

Os valores de glicose obtidos pela equação 3 foram então convertidos em trealose através da correlação entre seus respectivos pesos moleculares, sendo que uma molécula de trealose (P.M. = 342,23) é formada por duas moléculas de glicose (P.M. = 180,16). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}.\text{mg}_{\text{células}}^{-1}$.

Composição do reagente de antrona:

Antrona	40 mg
H ₂ SO ₄ 95 %	20 mL
Água destilada	1mL

Foi adicionado 40 mg de antrona a 1 ml de água destilada e em seguida acrescentou-se 20 ml de ácido sulfúrico. Este reagente foi preparado sob resfriamento e na hora do uso.

Procedimento: um volume de cultura contendo 100 mg de células foi centrifugado e o *pellet* formado foi lavado 2 vezes com água destilada, sendo centrifugado novamente a cada lavagem. A extração da trealose foi feita suspendendo o *pellet* em 0,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,5 M por 40 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 10400 rpm por 3 min. A extração foi repetida para o *pellet*. Os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos e o ensaio colorimétrico foi realizado, com leituras em 620nm.

3.11.2. Proteínas totais

A proteína total foi determinada usando o método do reagente de biureto como descrito por Robyt e White (1987). Foi obtida uma curva padrão usando-se

uma solução de soroalbumina 1% para relacionar a absorbância com a concentração de proteínas (Figura 7 do Apêndice A). A equação da reta obtida mostrou um coeficiente angular $a = 0,751$ e coeficiente linear $b = -0,045$. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtem-se a seguinte relação:

$$y = 0,751 x - 0,045 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = Proteínas totais (%)

Simplificando a equação 1, obtem-se:

$$Abs = 0,751. Proteínas \% - 0,045 \quad (2)$$

$$Proteínas \% = \frac{Abs + 0,045}{0,751} \times diluição \quad (3)$$

Os resultados foram obtidos através da equação 3, sendo posteriormente expressos em $\mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1}$.

Composição do reagente de Biureto:

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,3 g
Tartarato de sódio e potássio	0,9 g
NaOH 0,2N	50 mL
KI	0,5 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Procedimento: para cada 100 mg de células foi adicionado 1mL de tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2. O rompimento celular foi realizado em agitador de tubos (Phoenix, modelo AP56), por trituração com 1 g de microesferas de vidro de diâmetro 0,4-0,6 mm (Glasperlen, BBI-8541701) por 4 vezes (por período de 30 segundos seguido de 30 segundos de intervalo, em banho de gelo). As microesferas de vidro e as células foram separadas por centrifugação em tubos Falcon a 10400 rpm por 3 min a 4°C e o sobrenadante foi separado por nova centrifugação. A reação colorimétrica para dosagem de proteínas totais foi feita em seguida, com leituras em 540nm.

3.11.3. Glicerol interno e externo

A dosagem de glicerol foi feita através de reação enzimática, utilizando-se o kit para Triglicérides GPO Trinder, Laborclin, lote: 10415006. Foi obtida uma curva padrão usando-se uma solução de glicerol $0,208 \text{ mg.mL}^{-1}$ para relacionar a absorbância com a concentração de glicerol (Figura 8 do Apêndice A). A equação da reta obtida para mostrou um coeficiente angular $a = 92,17$ e coeficiente linear $b = -0,001$. Substituindo os valores na equação da reta $y = ax + b$, obtem-se a seguinte relação:

$$y = 92,17 x - 0,001 \quad (1)$$

Onde:

y = Absorbância (nm)

x = Glicerol (mg.mL^{-1})

Simplificando a equação 1, obtém-se:

$$Abs = 92,17. \text{ Glicerol } \text{mg.mL}^{-1} - 0,001 \quad (2)$$

$$\text{Glicerol } \text{mg.mL}^{-1} = \frac{Abs+0,001}{92,17} \times \text{diluição} \quad (3)$$

Os resultados foram obtidos através da equação 3, sendo posteriormente expressos em mg.mL^{-1} e $\mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1}$.

Procedimento: para dosagem do glicerol interno a cada 100 mg de células foi adicionado 1mL de tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2. O rompimento celular foi realizado em agitador de tubos (Phoenix, modelo AP56), por trituração com 1 g de microesferas de vidro de diâmetro 0,4-0,6 mm (Glasperlen, BBI-8541701) por 4 vezes (por período de 30 segundos seguido de 30 segundos de intervalo, em banho de gelo). As microesferas de vidro e as células foram separadas por centrifugação em tubos Falcon a 10400 rpm por 3 min a 4°C . O sobrenadante foi separado por nova centrifugação em tubos Falcon a 10419 g por 5 min. a 4°C . Para a dosagem do glicerol externo as amostras foram centrifugadas a 10400 rpm por 3 minutos a 4°C , o resíduo celular foi descartado. Os sobrenadantes nos dois casos foram usados na reação colorimétrica, com leituras em 500nm.

3.12. Cálculo do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e rendimento fermentativo

O fator de conversão de substrato em células fornece a quantidade de massa celular produzida por grama de açúcar consumido (HISS, 2001). A fórmula utilizada para o cálculo foi a da Equação 1:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_t - S_r} \quad (1)$$

O rendimento fermentativo foi calculado com base na estequiometria proporcionada pela fermentação alcoólica, sendo considerado como 100% de rendimento quando ocorre a formação de 51,11 g de etanol a partir de 100 g de açúcar (PARAZZI JUNIOR, 2006). O cálculo foi feito como mostrado na Equação 2, segundo Silva *et al.*, (2008):

$$\text{Rendimento \%} = \frac{\text{Etanol}_{(g/100g)}}{ART_{g/100g} \times 0,511} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

S_r = massa de substrato residual no meio;

S_t = massa de substrato total adicionada ao meio;

X_i = massa celular seca inicial;

X_f = massa celular seca final.

3.13. Tratamento estatístico

3.13.1. Comparação entre médias: test t

O teste t *student* foi utilizado para a comparação entre as médias dos valores obtidos nos experimentos. Antes de se aplicar o teste t, verificou-se o grau das variâncias das amostras, usando o teste F. O teste t forneceu o valor da probabilidade p, calculado usando-se um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) em

todos os casos. O valor de p maior que o nível de significância ($p > 0,05$), implica o aceite da hipótese nula de que as médias comparadas são iguais e um valor de p menor que o nível de significância ($p \leq 0,05$) implica que as duas médias comparadas são diferentes. Os cálculos estatísticos foram calculados utilizando o programa Excel (Pacote Office 2010).

3.13.2. Comparação entre proporções: teste qui-quadrado (X^2)

O teste qui-quadrado (X^2) foi utilizado para a comparação entre as medidas de viabilidade. Este teste foi realizado no programa Excel (Pacote Office 2010) que forneceu o valor da probabilidade p do teste X^2 com um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). O valor de p maior que o nível de significância ($p > 0,05$) implica o aceite da hipótese nula de que as proporções comparadas são iguais e um valor de p menor que o nível de significância ($p \leq 0,05$) implica que as duas proporções comparadas são diferentes.

3.13.3. Análise de variância (ANOVA)

A análise da variância (ou ANOVA) consiste em um procedimento que decompõe, em vários componentes identificáveis, a variação total entre os valores obtidos no experimento. Cada componente atribui a variação a uma causa ou fonte de variação diferente, o número de causas de variação ou "fatores" depende do delineamento da investigação. Um valor de F significativo na ANOVA não indica quais são os tratamentos significativamente diferentes entre si quando comparados dois a dois; ele apenas mostra que existe ao menos uma diferença entre os grupos estudados. Este teste foi realizado no programa Excel (Pacote Office 2010) que forneceu o valor da probabilidade F com um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). O valor de p maior que o nível de significância ($p > 0,05$) implica o aceite da hipótese nula de que as médias comparadas são iguais e um valor de p menor que o nível de significância ($p \leq 0,05$) implica que as médias comparadas são diferentes.

3.13.4. Teste de Tukey

A identificação de diferenças particulares entre médias, tomando-as duas a duas, deve ser feita usando um dos vários testes de Comparações Múltiplas entre Médias existentes na literatura. O procedimento de Tukey é um complemento à ANOVA e visa identificar quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si. Este teste foi realizado no programa Excel (Pacote Office 2010) que forneceu o valor da probabilidade q com um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). O valor de q calculado maior que o valor crítico de q (tabelado) implica na rejeição da hipótese nula de que os pares de médias comparadas são iguais e um valor de q calculado menor implica que os pares de médias comparadas são iguais.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento do nitrogênio amínico no lisado celular de levedura

Um método de lise foi estabelecido e utilizado para obtenção do nitrogênio orgânico usado como fonte de N nos experimentos de propagação e revitalização. Para tal variou-se a concentração de células na suspensão de lise, o seu pH, efeito da agitação e alguns aditivos. Obteve-se um nitrogênio orgânico livre (expresso pela curva padrão de glicina) no sobrenadante ao redor de $7,87 \text{ g.L}^{-1}$ (dados não mostrados).

4.2. Efeitos dos diferentes aditivos sobre o crescimento das leveduras durante a propagação em melaço 5%

O uso do lisado de leveduras (LC) e de outros aditivos representou uma tentativa de solucionar o problema do crescimento limitante apresentado pela levedura IQAr/45-2. Como o crescimento celular é importante na competição entre leveduras durante o processo de fermentação, decidiu-se verificar o efeito dos aditivos sobre a atividade de crescimento da levedura IQAr/45-2. Por essa razão decidiu-se ensaiar diversos nutrientes a fim de estimular o crescimento em melaço 5% em batelada simples. Esses aditivos foram os seguintes: a) extrato de levedura comercial, b) glutamato monossódico, c) autolisado de levedura e d) mistura de sais e uréia.

A Tabela 2 e a Figura 8 permitem comparar a eficiência dos aditivos e de suas concentrações. A adição de extrato de levedura nas concentrações de 10 e 20 g.L^{-1} promoveu o maior crescimento da linhagem da ordem de $5,2 - 5,4 \text{ g.L}^{-1}$ (Tabela 3). O uso desse aditivo nutricional na elaboração de meios de cultivo microbiológicos e seu efeito no crescimento dos micro-organismos é bem conhecido, podendo ainda aumentar a taxa de utilização de açúcar e reduzir o tempo de uma fermentação (JONES; INGLEDEW, 1994). Como esperado, a adição do extrato de levedura levou a um crescimento expressivo da biomassa em todas as concentrações. Porém, seu uso rotineiro em grandes quantidades, como por exemplo, em grandes dornas de fermentação tornaria sua aplicação desvantajosa devido ao alto custo (JONES; INGLEDEW, 1994).

Comparado ao controle, a adição de LC promoveu um maior crescimento em todas as concentrações testadas, principalmente nas concentrações de 1 e 2 g.L⁻¹, nas quais o crescimento foi 3,77 e 4 vezes maior, sendo este um resultado semelhante ao obtido com o extrato de levedura. Segundo Jones e Ingledew (1994), as células de levedura já esgotadas quando em fase estacionária podem ser uma fonte de nutrientes relativamente barata e prontamente disponível.

Apesar de o ácido glutâmico apresentar um papel central na biossíntese dos aminoácidos e ser, portanto, uma escolha apropriada para servir como fonte de nitrogênio, a adição de glutamato monossódico apresentou um desempenho inferior aos demais nutrientes (ALBERS *et al.*, 1996). Talvez a adição de aminoácidos que sejam mais abundantes na constituição celular da levedura apresentasse um resultado mais positivo, como o ácido aspártico por exemplo (STECKELBERG, 2001).

A simples solução de minerais (ausência de outros aditivos) aumentou o crescimento em 1,15 vezes em relação ao controle. A literatura descreve que altos teores de nitrogênio prontamente utilizável (uréia, 46% em relação ao nitrogênio utilizável e sulfato de amônio 21%) não foram assimilados instantaneamente (MALTA, 2006).

Tabela 2 – Obtenção de biomassa após 12h de cultivo em melaço 5% a 37°C na presença de diferentes aditivos

Aditivos		Biomassa	
Produto	g.L ⁻¹ no meio	Após 12h (g.L ⁻¹)	Final/Inicial
Controle	-	1,3 ± 0,0	1,4
Extrato de levedura	3,0	3,6 ± 0,0	4,0
	5,0	4,8 ± 0,0	5,3
	10,0	5,4 ± 0,0	6,0
	20,0	5,2 ± 0,0	5,8
LC	0,3	2,7 ± 0,0	3,0
	0,5	3,6 ± 0,0	4,0
	1,0	4,9 ± 0,0	5,4
	2,0	5,2 ± 0,1	5,8
Glutamato monossódico	0,05	1,7 ± 0,0	1,7
	0,10	1,7 ± 0,0	1,7
	2,5	1,8 ± 0,0	1,6
	5,0	1,8 ± 0,0	1,6
Uréia ^(a) :	0,30	1,5 ± 0,2	1,7
K ₂ HPO ₄	0,87		
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,66		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,03		
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01		

^(a) Basso *et al.*, (2008)

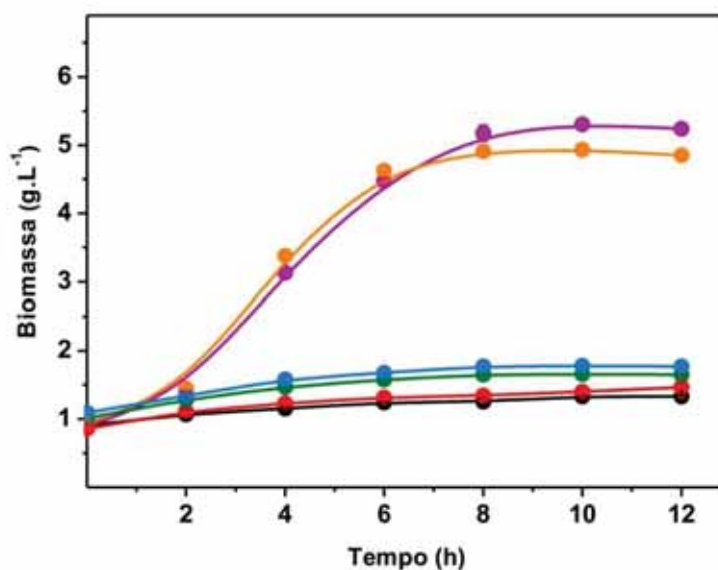


Figura 8 – Efeitos dos aditivos nutricionais sobre a curva de crescimento da levedura IQAr/45-2 a 37°C em melão 5% ART: (-●-) LC 1 g.L⁻¹, (-●-) extrato de levedura 20 g.L⁻¹, (-●-) glutamato monossódico 0,050 g.L⁻¹, (-●-) glutamato monossódico 5 g.L⁻¹, (-●-) solução de sais e uréia e (-●-) controle. Concentração final da solução de sais no meio: 0,87 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,66 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,3 g.L⁻¹ Uréia; 0,49 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,03 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 0,01 g.L⁻¹ MnSO₄.H₂O (Basso *et al.*, 2008)

4.2.1. Comparação da adição de sobrenadante de lisado celular centrifugado e não centrifugado sobre a curva de crescimento

Como ilustrado pela Figura 9, a adição de LC bruto e centrifugado na concentração de 1 g.L⁻¹ não apresentou diferença quanto ao crescimento celular. Já na concentração de 2 g.L⁻¹, a utilização do lisado bruto apresentou um pequeno estímulo no crescimento celular na ordem de 1,7 vezes.

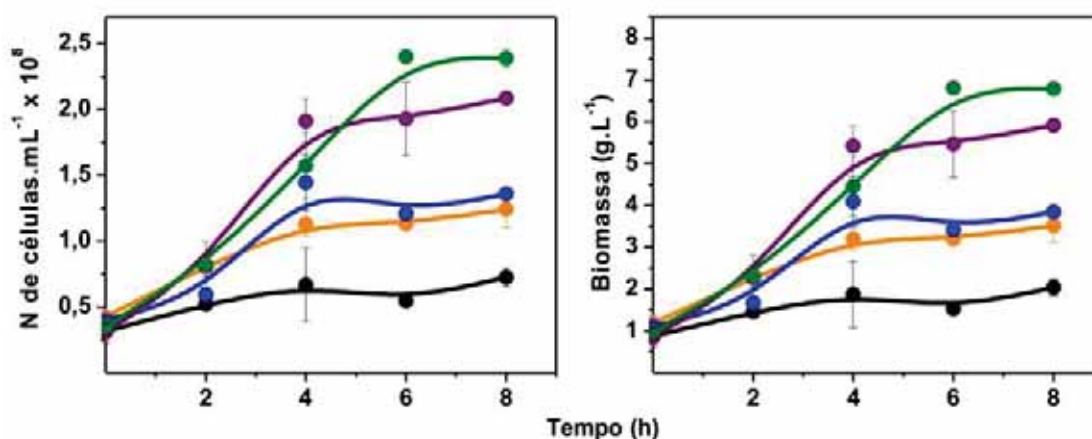


Figura 9 – Efeitos da adição de lisado celular (LC) sobre a curva de crescimento da levedura IQAr/45-2 a 37°C, em melão 5% ART: (●) sobrenadante do LC 1 g.L⁻¹ centrifugado, (●) sobrenadante do LC 1 g.L⁻¹ não centrifugado, (●) sobrenadante do LC 2 g.L⁻¹ centrifugado, (●) sobrenadante do LC 2 g.L⁻¹ não centrifugado e (●) controle.

4.3. Otimização das condições de propagação do fermento

Os resultados referentes aos dois métodos de propagação a 34°C e 37°C estão discutidos abaixo.

4.3.1. Propagação1: propagação em 4 etapas em concentrações crescentes de melão

A utilização deste procedimento de quatro etapas deve permitir uma maior adaptação ao estresse osmótico. A elevação da temperatura de 34°C para 37°C durante a propagação resultou em aumentos semelhantes no acúmulo final de biomassa, consumo de ART e produção de etanol. A viabilidade média foi pouco afetada nas duas temperaturas, variando de aproximadamente 95,5% a 34°C para 96,3% a 37°C no final da 4ª etapa de propagação. O rendimento da biomassa foi inibido por concentrações crescentes de açúcar até 8%, e partir dessa concentração a levedura tornou-se adaptada à pressão osmótica de 12% de açúcar.

Uma vez que os parâmetros foram praticamente os mesmos, optou-se pela propagação a 37°C, priorizando-se assim a adaptação celular às altas temperaturas. As medidas (biomassa, ART e etanol) referentes a todas as etapas estão descritas nas Tabelas 3 e 4 abaixo.

Tabela 3 – Efeito da concentração do melaço (3%, 5%, 8% 12%) e da temperatura (34°C e 37°C) sobre os valores iniciais e finais de biomassa, sobre a propagação da levedura IQAr/45-2

Condições			Biomassa (g.L ⁻¹)		
Etapas	Melaço (%)	T (°C)	Início	Final	Relativa (final/inicial)
1 (50 ml)	3	34	0,24 ± 0,01	0,50 ± 0,01	2,08
2 (100 mL)	5		0,25 ± 0,02	0,62 ± 0,02	2,48
3 (200 mL)	8		0,31 ± 0,01	0,39 ± 0,02	1,25
4 (400 mL)	12		0,18 ± 0,02	2,40 ± 0,01	13,33
1 (50 ml)	3	37	0,24 ± 0,02	0,48 ± 0,01	2
2 (100 mL)	5		0,25 ± 0,01	0,64 ± 0,02	2,56
3 (200 mL)	8		0,30 ± 0,02	0,35 ± 0,03	1,16
4 (400 mL)	12		0,15 ± 0,01	2,35 ± 0,02	15,66

Condições: tempo de incubação de 12h para cada concentração de melaço, *vfrasco/vmeio* de 5:2, agitação de 80 rpm em batelada simples. A viabilidade ao final da etapa 4 foi de 95,5% ± 1,40 para 34°C e de 96,3% ± 1,45 para 37°C

Tabela 4 – Efeito da concentração do melaço (3%, 5%, 8% 12%) e da temperatura (34°C e 37°C) sobre os valores iniciais e finais de açúcares redutores totais e produção de etanol sobre a propagação da levedura IQAr/45-2

Condições			Etanol (g.L ⁻¹)		ART
Etapas	Melaço (%)	T (°C)	Início	Final	Residual (%)
1 (50 ml)	3	34	0,00 ± 0,00	0,65 ± 0,00	2,4 ± 0,07
2 (100 mL)	5		0,72 ± 0,10	3,00 ± 0,16	4,9 ± 0,12
3 (200 mL)	8		3,80 ± 0,19	7,20 ± 0,20	7,5 ± 1,04
4 (400 mL)	12		6,00 ± 0,25	31,00 ± 0,25	10,1 ± 0,60
1 (50 ml)	3	37	0,00 ± 0,00	0,70 ± 0,00	2,2 ± 0,11
2 (100 mL)	5		0,73 ± 0,15	2,70 ± 0,19	4,8 ± 0,11
3 (200 mL)	8		3,90 ± 0,20	7,00 ± 0,25	7,0 ± 0,18
4 (400 mL)	12		6,00 ± 0,25	39,00 ± 0,25	9,5 ± 0,30

Condições: tempo de incubação de 12h para cada concentração de melaço, *vfrasco/vmeio* de 5:2, agitação de 80 rpm em batelada simples. A viabilidade ao final da etapa 4 foi de 95,5% ± 1,40 para 34°C e de 96,3% ± 1,45 para 37°C

4.3.2. Propagação 2: propagação em duas etapas em melaço 12% e na presença de LC

A levedura IQAr/45-2 foi propagada em melaço contendo lisado celular enquanto que a levedura PE-2 foi propagada sem adição do lisado a 34°C e 37°C. Durante a primeira etapa de propagação foi obtida uma curva de variação de biomassa para ambas as leveduras para verificar o tempo de estabilização do crescimento (Figura 10). Na primeira etapa de propagação observou-se o início da fase estacionária após 9h e neste momento foi realizado um corte, ou seja, uma divisão do meio em duas porções com a adição de meio fresco em cada uma delas,

com o intuito de manter as células em crescimento exponencial na segunda etapa de propagação.

Conforme ilustra as Tabelas 5 e 6, a propagação da levedura IQAr/45-2 dependeu da adição de LC, com rendimento de biomassa, ao final da segunda etapa, passando de $1,37 \text{ g.L}^{-1}$ (controle) para $9,74 \text{ g.L}^{-1}$ (aumento de 7,10 vezes) a 34°C . A 37°C o rendimento da biomassa passou de $2,45 \text{ g.L}^{-1}$ (controle) para $6,71 \text{ g.L}^{-1}$ (aumento de 2,73 vezes). Assim, a elevação da temperatura prejudicou o rendimento da biomassa desta levedura mesmo na presença do LC. Isto também se repetiu com a com a levedura PE-2 (concentração final de $10,99 \text{ g.L}^{-1}$ a 34°C para $7,56 \text{ g.L}^{-1}$ a 37°C). A figura 10 mostra que a levedura PE-2 não necessita de suplementação, mas o seu rendimento em presença de LC não foi determinado. Em ausência de LC o rendimento da biomassa da levedura PE-2 foi maior em ambas as temperaturas. Isto sugere que a levedura IQAr/45-2 apresenta maior exigência nutricional.

Um teor de açúcar residual baixo foi obtido ao final da segunda etapa para a levedura IQAr/45-2 em presença de LC na faixa de 1,64 a 3,68% e PE-2 na faixa de 6,51 a 3,75%.

A viabilidade da etapa 1 não variou, sendo de aproximadamente 100% para ambas as temperaturas e linhagens. Na etapa 2, a viabilidade variou de 100% a 94,5% a 34°C e de 100% a 98,7 a 37°C .

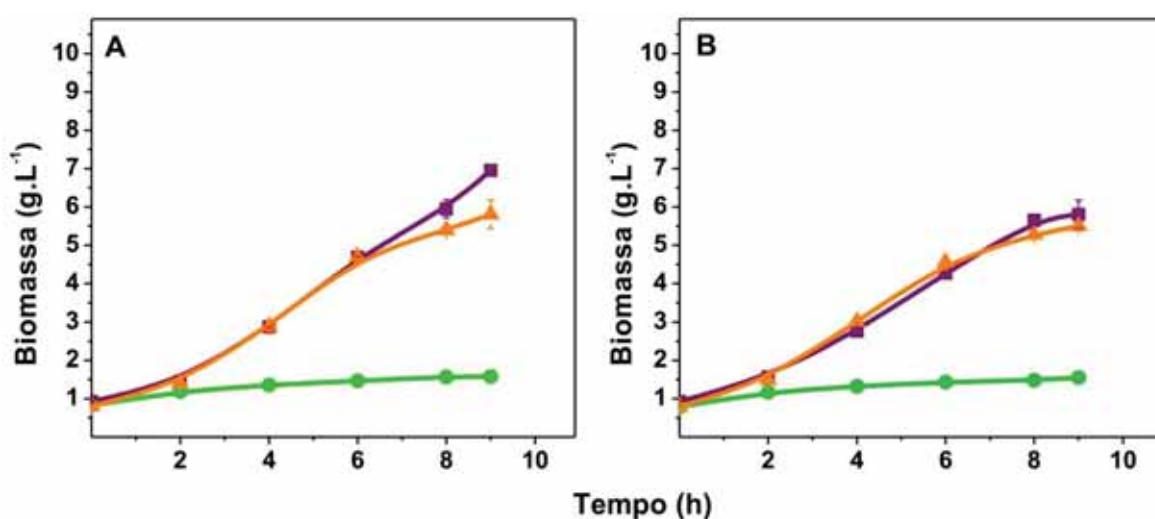


Figura 10 – Efeito da adição de lisado celular de levedura (LC) e da elevação da temperatura de 34°C (A) para 37°C (B) sobre a curva de crescimento das linhagens de levedura: (-●-) IQAr/45-2, (-▲-) IQAr/45-2 em presença de LC (1 g.L^{-1}) e (-■-) PE-2 durante a primeira etapa de propagação em melão 12 %. Condições: tempo de incubação de 9h, *vfrasco/vmeio* de 5:2, agitação de 80 rpm. A viabilidade da etapa 1 não variou, ficando ao redor 100 % para ambas as condições e para as duas leveduras

Tabela 5 – Efeito da adição de lisado celular de levedura (LC) e da elevação da temperatura (34°C e 37°C) sobre os valores iniciais e finais de biomassa produzida pela linhagens de levedura: IQAr/45-2 em ausência e presença de LC 1 g.L⁻¹ e pela levedura PE-2 em ausência de LC e durante as duas etapas de propagação em melaço 12 %

Condições			Biomassa (g.L ⁻¹)		
T (°C)	Etapas	Linhagens	Inicial	Final	Relativa Final/Inicial
34	1	PE-2	0,93 ± 0,01	6,95 ± 0,02	7,5
		IQAr/45-2	0,82 ± 0,00	1,58 ± 0,00	1,9
		IQAr/45-2 + LC	0,80 ± 0,00	5,81 ± 0,37	7,3
	2	PE-2	4,27 ± 0,04	10,99 ± 0,12	2,6
		IQAr/45-2	0,87 ± 0,16	1,37 ± 0,03	1,6
		IQAr/45-2 + LC	3,13 ± 0,18	9,74 ± 0,05	3,1
37	1	PE-2	0,93 ± 0,01	5,81 ± 0,37	6,2
		IQAr/45-2	0,79 ± 0,00	1,55 ± 0,00	2,0
		IQAr/45-2 + LC	0,80 ± 0,06	5,51 ± 0,03	6,9
	2	PE-2	3,67 ± 0,21	7,56 ± 0,02	2,1
		IQAr/45-2	0,93 ± 0,02	2,45 ± 0,08	2,6
		IQAr/45-2 + LC	3,38 ± 0,03	6,71 ± 0,08	2,0

Condições: tempo de incubação de 9h para a etapa 1 e 12h para a etapa 2, *vfrasco/vmeio* de 5:2 e agitação de 80 rpm. A viabilidade da etapa 1 não variou, sendo de 100,00% ± 1,40 para ambas as condições. A viabilidade ao final da etapa 2 foi de: PE-2 (100,00 ± 0,10), IQAr/45-2 (94,55 ± 0,10) e IQAr/45-2 + LC 1 g.L⁻¹ (100,00 ± 0,20) a 34°C e PE -2 (98,70 ± 0,20), IQAr/45-2 (100,00 ± 0,00) e IQAr/45-2 + LC 1 g.L⁻¹ (100,00 ± 0,10) a 37°C.

Tabela 6 – Efeito da adição de lisado celular de levedura (LC) e da elevação da temperatura (34°C e 37°C) sobre os valores iniciais e finais de açúcares redutores totais e produção de etanol pelas linhagens de levedura: IQAr/45-2 em ausência e presença de LC 1 g.L⁻¹ e PE-2 em ausência de LC durante as duas etapas de propagação em melaço 12 %

Condições			Etanol (g.L ⁻¹)		ART residual (%)
T (°C)	Etapas	Linhagens	Inicial	Final	
34	1	PE-2	0,00 ± 0,00	33,35 ± 0,37	6,14 ± 0,05
		IQAr/45-2	0,00 ± 0,00	3,72 ± 0,02	11,48 ± 0,41
		IQAr/45-2 + LC	0,00 ± 0,00	35,99 ± 0,26	5,76 ± 0,25
	2	PE-2	15,38 ± 0,22	78,83 ± 0,24	3,75 ± 0,32
		IQAr/45-2	1,07 ± 0,03	5,36 ± 0,42	15,27 ± 2,24
		IQAr/45-2 + LC	16,84 ± 0,00	75,98 ± 0,00	1,64 ± 1,11
37	1	PE-2	0,00 ± 0,00	32,50 ± 0,72	6,91 ± 0,55
		IQAr/45-2	0,00 ± 0,00	6,80 ± 0,03	11,69 ± 0,02
		IQAr/45-2 + LC	0,00 ± 0,00	37,46 ± 0,02	6,05 ± 0,16
	2	PE-2	15,80 ± 0,93	59,32 ± 8,13	6,51 ± 0,11
		IQAr/45-2	2,56 ± 0,29	10,02 ± 0,09	14,92 ± 1,42
		IQAr/45-2 + LC	17,63 ± 0,00	66,92 ± 0,00	3,68 ± 1,00

Condições: tempo de incubação de 9h para a etapa 1 e 12h para a etapa 2, *vfrasco/vmeio* de 5:2 e agitação de 80 rpm. A viabilidade da etapa 1 não variou, sendo de 100,00% ± 1,40 para ambas as condições. A viabilidade ao final da etapa 2 foi de: PE-2 (100,00 ± 0,10), IQAr/45-2 (94,55 ± 0,10) e IQAr/45-2 + LC 1 g.L⁻¹ (100,00 ± 0,20) a 34°C e PE -2 (98,70 ± 0,20), IQAr/45-2 (100,00 ± 0,00) e IQAr/45-2 + LC 1 g.L⁻¹ (100,00 ± 0,10) a 37°C.

A Tabela 7 ilustra as variações nos parâmetros de rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$) na etapa final da Propagação 1 e da Propagação 2. Os cálculos do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) mostraram que a levedura IQAr/45-2 apresentou valores de $Y_{X/S}$ semelhantes pela Propagação 1 tanto para 34°C ($Y_{X/S}$ de 0,04) quanto a 37°C ($Y_{X/S}$ de 0,03). Para propagação 2 foi observado $Y_{X/S}$ de 0,02 a 34°C e 0,04 a 37°C, sem a adição de LC. Quando o LC foi adicionado o $Y_{X/S}$ foi maior, sendo de 0,06 a 34°C, assim como para a linhagem PE-2. Isto mostra que a adição de LC promoveu uma maior conversão dos açúcares em biomassa.

A propagação escolhida para ser usada durante os experimentos com a linhagem IQAr/45-2 foi a do método em concentrações crescentes de melaço, uma vez que o fator de conversão de substrato em células foi maior a 34°C e foi semelhante a 37°C do que o observado para o método de duas etapas com corte. O método em 4 etapas ainda beneficia a adaptação às altas concentrações de açúcar. A linhagem PE-2 foi usada apenas como uma comparação já que é uma linhagem usada comercialmente com aplicação industrial.

Tabela 7 – Comparação do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) da etapa final nos 2 métodos de propagação: propagação 1 em concentrações crescentes de melaço e propagação 2 em cortes em melaço 12%

T (°C)	$Y_{X/S}$ ao final de cada propagação x 10^{-2}			
	Propagação 1		Propagação 2	
	IQAr/45-2	IQAr/45-2	IQAr/45-2 com LC 1 g.L ⁻¹	PE-2
34	4,00 ^a ± 0,18	2,00 ^a ± 0,14	6,00 ^a ± 0,13	6,00 ^a ± 0,14
37	3,00 ^b ± 0,12	4,00 ^b ± 0,16	4,00 ^b ± 0,18	4,00 ^b ± 0,17

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente entre si conforme indica o teste t ($\alpha = 0,05$)

4.4. Padronização de um meio para revitalização do leite de levedura entre ciclos de fermentação e sua comparação com o armazenamento em água sem revitalização

Conforme descrito em material e métodos, a revitalização consiste de um processo no qual se tem crescimento e renovação celular, sem perda de viabilidade. A atividade de fermentação do inóculo depende do seu estado fisiológico, e tal estado pode ser avaliado pela medida de alguns indicadores celulares. Neste caso as células foram adaptadas a uma fase induzida de latência caracterizada por jejum nutricional.

4.4.1. Efeito da concentração do melaço e da temperatura sobre a produção de biomassa na solução de revitalização

Variou-se a concentração de melaço (5% a 12%) na solução de revitalização contendo sais (1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ ou DAP, 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O). A Tabela 8 mostra os dados de biomassa e viabilidade e os parâmetros fisiológicos (trealose, proteína total e glicerol) a 30°C enquanto que os dados obtidos a 34°C estão descritos na Tabela 9.

Observando a Tabela 8, nota-se que o cultivo em melaço 5% não apresentou crescimento significativo durante o tratamento sob agitação, durante 16h. Quando se trabalha com fermentações sucessivas com reciclo de células é interessante que haja uma renovação celular, conseguida por meio do crescimento. Embora o aumento da biomassa (32,4%) tenha sido maior com a concentração inicial de açúcar de 12%, a concentração de glicerol apresentou um aumento de 46% após

16h, mostrando que essa concentração de açúcar causa um estresse sobre as células. O cultivo em melaço 8% apresentou um crescimento satisfatório de 14,6%, enquanto que a quantidade de glicerol foi de apenas 3,5% e uma mobilização maior de trealose. Isto indica que concentrações de açúcar maiores que 8% causou mais estresse sobre a levedura.

A Tabela 9 indica que a 34°C não houve aumento significativo de biomassa em melaço 5%. Em melaço 12% o acúmulo de biomassa foi maior após 16h (23,5%) comparado às concentrações menores de açúcar enquanto que o aumento de glicerol não foi observado como a 30°C na mesma concentração de açúcar, havendo uma redução do mesmo em melaço 5 e 8%. Já, a mobilização da trealose, diminui em todos os casos a 34°C, havendo maior trealose final em melaço 12%. Sebollela *et al.*, (2004) verificaram que o efeito inibitório da trealose sobre algumas enzimas era menor com o aumento da temperatura, essa portanto não precisaria ser tão prontamente degradada resultando em maiores teores finais. Por outro lado, a elevação da temperatura poderia inibir a mobilização da trealose como fonte de energia e atuar como um agente estressante, requerendo maiores teores de trealose destinados à proteção celular.

De acordo com Mahmud *et al.*, (2010), sob condições normais de crescimento, o conteúdo de trealose em *S. cerevisiae* é muito baixo durante a fase exponencial e seu aumento é apenas observado em uma fase estacionária tardia, que também simula condições de estresse. Dessa forma o presente trabalho permite concluir que quanto maior a adaptação maior a mobilização da trealose para crescimento, obtenção de energia de manutenção ou energia de sobrevivência.

Pelo exposto, selecionou-se o melaço 8 % (ART) como concentração inicial mais adequada para a revitalização do fermento, às temperaturas de 30°C e 34°C.

Tabela 8 – Efeito da concentração de melaço no meio de revitalização^a sobre a formação de biomassa e parâmetros dependentes da fisiologia celular (viabilidade, proteína total, glicerol interno e trealose) durante a revitalização do fermento mantido em agitação a 30°C e pH 4.5 por 16h

Determinações durante a estocagem em melaço	Melaço (% ART)		
	5	8	12
Viabilidade (%):			
Inicial	93,6 ^a ± 2,64	93,6 ^a ± 2,77	93,6 ^a ± 5,70
Final do armazenamento	91,8 ^a ± 2,65	90,2 ^a ± 2,98	91,8 ^a ± 0,07
Biomassa (g.L⁻¹):			
Inicial	27,3 ^a ± 0,19	28,4 ^a ± 0,19	26,3 ^a ± 0,19
Final do armazenamento	28,5 ^a ± 0,00	32,5 ^b ± 0,84	34,8 ^b ± 0,47
Rendimento relativo (%)	4,2%	14,6%	32,4%
Proteína total (µg.mg_{células}⁻¹ x 10²):			
Inicial	1,73 ^a ± 0,01	1,73 ^a ± 0,01	1,73 ^a ± 0,01
Final do armazenamento	1,39 ^b ± 0,02	1,48 ^b ± 0,03	1,63 ^b ± 0,03
Mobilização (%)	19,6% ↓	14,4% ↓	5,78% ↓
Trealose (µg.mg_{células}⁻¹):			
Inicial	29,01 ^a ± 0,06	29,01 ^a ± 0,06	29,01 ^a ± 0,06
Final do armazenamento	1,57 ^b ± 0,21	2,22 ^b ± 0,59	7,30 ^b ± 1,21
Mobilização (%)	94,6% ↓	92,4% ↓	75% ↓
Glicerol interno (µg.mg_{células}⁻¹):			
Inicial	2,80 ^a ± 0,08	2,80 ^a ± 0,08	2,80 ^a ± 0,08
Final do armazenamento	1,80 ^b ± 0,00	2,70 ^a ± 0,01	4,10 ^b ± 0,13
Mobilização (%)	35,7% ↓	3,5% ↓	46,4 % ↑

^aMelaço contendo 1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ (DAP), 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t e X² (α = 0,05)
Os símbolos ↓ e ↑ referem-se respectivamente à queda e acúmulo dos parâmetros fisiológicos avaliados

Tabela 9 – Efeito da concentração de melaço no meio de revitalização^a sobre a formação de biomassa e parâmetros dependentes da fisiologia celular (viabilidade, proteína total, glicerol interno e trealose) durante a revitalização do fermento mantido em agitação a 34°C e pH 4.5 por 16h

Determinações durante a estocagem em melaço	Melaço (% ART)		
	5	8	12
Viabilidade (%):			
Inicial	93,6 ^a ± 2,64	93,6 ^a ± 2,77	93,6 ^a ± 5,70
Final do armazenamento	89,6 ^b ± 0,10	93,9 ^a ± 1,75	96,0 ^a ± 3,77
Biomassa (g.L⁻¹):			
Inicial	29,0 ^a ± 0,75	26,4 ^a ± 0,75	28,8 ^a ± 1,49
Final do armazenamento	30,1 ^a ± 0,65	30,7 ^b ± 0,84	35,5 ^b ± 0,56
Rendimento relativo (%)	3,6%	16,2%	23,3%
Proteína total (µg.mg_{células}⁻¹ x 10²):			
Inicial	1,73 ^a ± 0,01	1,73 ^a ± 0,01	1,73 ^a ± 0,01
Final do armazenamento	1,40 ^b ± 0,01	1,70 ^a ± 0,02	1,39 ^b ± 0,01
Mobilização (%)	19% ↓	1,7% ↓	19,6% ↓
Trealose (µg.mg_{células}⁻¹):			
Inicial	29,01 ^a ± 0,06	29,01 ^a ± 0,06	29,01 ^a ± 0,06
Final do armazenamento	4,18 ^b ± 0,41	9,87 ^b ± 0,18	14,78 ^b ± 2,28
Mobilização (%)	85,6% ↓	66% ↓	49% ↓
Glicerol interno (µg.mg_{células}⁻¹):			
Inicial	2,80 ^a ± 0,08	2,80 ^a ± 0,08	2,80 ^a ± 0,08
Final do armazenamento	1,40 ^b ± 0,03	2,40 ^b ± 0,07	3,00 ^a ± 0,14
Mobilização (%)	50% ↓	14,3% ↓	6,6% ↑

^aMelaço contendo 1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ (DAP), 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t e X² (α = 0,05)
Os símbolos ↓ e ↑ referem-se respectivamente à queda e acúmulo dos parâmetros fisiológicos avaliados

4.4.2. Efeito do pH da solução de revitalização

Em geral, *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo acidófilo e, como tal, cresce melhor sob condições ácidas (NARENDRANATH; POWER, 2005). Segundo esses autores, a faixa de pH ótimo para o crescimento de leveduras pode variar de 4,0 a 6,0, dependendo da temperatura, presença de oxigênio e tipo de linhagem.

A Tabela 10 mostra os efeitos da elevação do pH de 4,5 para 5,5 em solução de melaço 8% contendo sais (1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ ou DAP, 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O) sobre os parâmetros fisiológicos das células a 30°C. A mudança de pH teve pouco efeito sobre a fisiologia das células durante a revitalização, uma vez que quase todos os parâmetros avaliados foram praticamente iguais nos dois pHs. Em pH 5,5 verificou-se uma queda menor (15,4%) no nível de proteínas totais após 16h (menor proteólise).

Imai e Ohno (1995) verificaram que as células que apresentavam mais brotamento, depois de 16h de cultivo a 20°C, foram as células cujo pH intracelular foi maior (pH 5,5-6,5) e brotamento celular foi menor em pH intracelular menor (pH 4,5-5,0). Quando o pH extracelular desvia do valor ótimo, a célula precisa investir energia para bombear os prótons para fora ou para dentro das células a fim de manter o pH intracelular ótimo, contudo ao aumentar o pH externo próximo ao pH intracelular desejado, há menor estresse sobre as células. (NARENDRANATH; POWER, 2005; NARENDRANATH *et al.*, 2001). Optou-se, portanto, pela escolha do pH 5,5. Como resultado da padronização, a condição escolhida como sendo adequada para a revitalização do leite de levedura foi a seguinte: uso de melaço 8% mantido a 30°C por 16h e pH 5,5. O meio que permitiu essa condição foi denominado de meio de revitalização (MR).

Tabela 10 – Efeito do pH (4,5 e 5,5) no meio de revitalização^a sobre as variações em biomassa e as características fisiológicas (viabilidade, proteína total, glicerol interno e trealose) das células da levedura IQAr/45-2 durante o revitalização a 30°C por 16h

Determinações durante a estocagem em melaço	pH	
	4,5	5,5
Viabilidade (%):		
Inicial	94,7 ^a ± 2,40	94,7 ^a ± 2,40
Final do armazenamento	92,7 ^a ± 7,55	93,7 ^a ± 2,51
Biomassa (g.L⁻¹):		
Inicial	26,8 ^a ± 0,19	27,9 ^a ± 0,93
Final do armazenamento	29,8 ^b ± 0,37	30,8 ^b ± 0,19
Rendimento relativo (%)	11,3%	10,4%
Proteína total (µg.mg células⁻¹ x 10²):		
Inicial	2,01 ^a ± 0,01	2,01 ^a ± 0,01
Final do armazenamento	1,37 ^b ± 0,00	1,70 ^b ± 0,01
Mobilização (%)	31,8% ↓	15,4% ↓
Trealose (µg.mg células⁻¹):		
Inicial	47,26 ^a ± 4,43	47,26 ^a ± 4,43
Final do armazenamento	2,53 ^b ± 0,13	2,03 ^b ± 0,19
Mobilização (%)	94,6% ↓	95,7% ↓
Glicerol interno (µg.mg células⁻¹):		
Inicial	4,00 ^a ± 0,00	4,00 ^a ± 0,00
Final do armazenamento	3,00 ^b ± 0,02	2,90 ^b ± 0,08
Mobilização	25% ↓	27,5% ↓

^aMelaço 8% contendo 1 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ (DAP), 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t e X² (α = 0,05)

Os símbolos ↓ e ↑ referem-se respectivamente à queda e acúmulo dos parâmetros fisiológicos avaliados

4.4.3. Efeito de variações na quantidade do coquetel de sais adicionado ao meio de revitalização resultando no meio de revitalização MR1

A Tabela 11 ilustra os efeitos da concentração final da solução de sais no meio em 0,5, 1 e 2 vezes a concentração da solução original (1 g.L⁻¹ de DAP, 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O).

A adição do coquetel de sais equivalente a 1x em relação à solução estoque apresentou os melhores resultados durante a revitalização da linhagem IQAr/45-2. Essa concentração de sais proporcionou o maior rendimento em biomassa (6,5%) e aumento da síntese de proteínas (9,3%). A mobilização de trealose não foi afetada em nenhuma das condições enquanto que a diminuição de glicerol em todos os casos indicou a redução do estresse osmótico. Zhao *et al.*, (2009) também verificaram a redução do glicerol quando ZnSO₄.7H₂O foi adicionado durante a fermentação e segundo Silva (2010), as concentrações de DAP, ZnSO₄.7H₂O e MgSO₄.7H₂O que melhor apresentaram rendimento em termos de etanol foram 1 g.L⁻¹, 0,1 g.L⁻¹ e 0,1 g.L⁻¹ respectivamente. No trabalho de Stehlik-Tomas *et al.*, (2004) o uso de 0,1 g.L⁻¹ de ZnSO₄, MnSO₄ e CuSO₄ em melaço de beterraba com 9% de açúcares a pH 6,0, contendo uma densidade inicial de células de 4,5 g.L⁻¹ resultou em um aumento de biomassa de 11% após 8h, comparados com os resultados obtidos neste trabalho. Isto sugere que a beterraba é uma matéria-prima menos pobre em sais.

Como o meio de revitalização é um meio destinado ao crescimento e à renovação celular é interessante que o açúcar seja destinado ao acúmulo de biomassa e não à produção de etanol. A concentração de sais que melhor proporcionou o aumento de biomassa foi o uso do coquetel de sais equivalente a 1x em relação à solução estoque e, portanto, esta adição foi considerada adequada para a suplementação do meio MR. O meio MR acrescido de sais na concentração de 1x passou a ser denominado meio MR1.

Tabela 11 – Efeito da quantidade de sais presentes ao melaço 8% sobre as células da levedura IQAr/45-2

Determinações durante a estocagem do fermento	Variação na quantidade de sais adicionados em relação à solução estoque (1x)			
	Controle	0,5x	1x	2x
Viabilidade (%):				
Inicial	95,65 ^a ± 2,17	95,65 ^a ± 2,17	95,65 ^a ± 2,17	95,65 ^a ± 2,17
Final	92,78 ^a ± 1,57	90,26 ^a ± 5,20	92,64 ^a ± 1,45	89,86 ^a ± 1,76
Biomassa (g.L⁻¹):				
Inicial	26,14 ^a ± 0,56	24,82 ^a ± 0,93	26,27 ^a ± 0,37	23,83 ^a ± 0,47
Final	27,65 ^b ± 0,09	26,00 ^b ± 0,19	27,98 ^b ± 0,00	24,95 ^b ± 0,75
Rendimento relativo (%)	5,7%	4,7%	6,5%	4,7%
Proteína total (µg.mg_{células}⁻¹ x 10²):				
Inicial	1,82 ^a ± 0,02	1,82 ^a ± 0,02	1,82 ^a ± 0,02	1,82 ^a ± 0,02
Final	1,59 ^b ± 0,03	1,69 ^b ± 0,02	1,99 ^b ± 0,03	2,00 ^b ± 0,04
Mobilização (%)	13 % ↓	7,1 % ↓	9,3 % ↑	9,9 % ↑
Trealose (µg.mg_{células}⁻¹):				
Inicial	56,19 ^a ± 0,65	56,19 ^a ± 0,65	56,19 ^a ± 0,65	56,19 ^a ± 0,65
Final	7,29 ^b ± 0,03	4,53 ^b ± 0,06	6,99 ^b ± 1,16	5,37 ^b ± 1,07
Mobilização (%)	87 % ↓	92 % ↓	87,5 % ↓	90 % ↓
Glicerol interno (µg.mg_{células}⁻¹):				
Inicial	2,93 ^a ± 0,01	2,93 ^a ± 0,01	2,93 ^a ± 0,01	2,93 ^a ± 0,01
Final	1,80 ^b ± 0,04	1,87 ^b ± 0,03	2,21 ^b ± 0,03	1,90 ^b ± 0,02
Mobilização (%)	38,5% ↓	36,2% ↓	24,5% ↓	34,1% ↓

^aCultivo em melaço 8% a pH 5,5 por 16h a 30°C

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t e X² (α = 0,05)

Os símbolos ↓ e ↑ referem-se respectivamente à queda e acúmulo dos parâmetros fisiológicos avaliados

4.4.4. Efeito da quantidade do lisado de levedura adicionado ao meio de revitalização resultando no meio MR2

A Tabela 12 indica o efeito da adição de diferentes concentrações do lisado celular de levedura sobre o crescimento da levedura IQAr/45-2 em meio MR. A adição de LC elevou o acúmulo de biomassa (9,2 % com adição de 1 g.L⁻¹ e 25.3 % com 2 g.L⁻¹). Com relação aos parâmetros fisiológicos houve queda da proteína total em relação ao controle em todas as concentrações de LC, sendo que a menor redução foi observada com a adição de 1 g.L⁻¹. Houve aumento de mobilização de trealose característica de células metabolicamente ativas para crescimento. O glicerol interno diminuiu em todos os casos. Esse resultado parece estar em conformidade com o que foi observado por Albers *et al.*, (1996). Estes autores observaram um aumento da taxa de crescimento específico celular, aumento do

rendimento de biomassa e redução dos níveis de glicerol quando a mistura de 20 aminoácidos ($0,47 \text{ g.L}^{-1}$ de N) foi adicionada ao meio de fermentação como fonte de N orgânico.

Por apresentar um crescimento satisfatório e menor redução proteica o LC na concentração de 1 g.L^{-1} foi escolhido para ser adicionado ao meio MR1, sendo denominado de meio MR2.

Tabela 12 – Efeito da adição de lisado celular de levedura (LC) ao meio de revitalização MR sobre as células da levedura IQAr/45-2 e seus parâmetros fisiológicos 30°C em melaço 8% ^(a).

Determinações durante a estocagem do fermento	Variação na quantidade de LC adicionado (g.L^{-1})			
	Controle	0,5	1	2
Viabilidade (%):				
Inicial	$95,65^a \pm 2,17$	$95,65^a \pm 2,17$	$95,65^a \pm 2,17$	$95,65^a \pm 2,17$
Final	$92,78^a \pm 1,57$	$94,83^a \pm 1,70$	$91,70^a \pm 0,72$	$86,41^a \pm 0,58$
Biomassa (g.L^{-1}):				
Inicial	$26,14^a \pm 0,56$	$25,15^a \pm 1,03$	$24,42^a \pm 0,37$	$19,54^a \pm 0,19$
Final	$27,65^b \pm 0,09$	$26,66^b \pm 0,37$	$26,66^b \pm 0,75$	$24,49^b \pm 0,28$
Rendimento relativo (%)	5,7%	6,0%	9,2%	25,3 %
Proteína total ($\mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1} \times 10^2$):				
Inicial	$1,82^a \pm 0,02$	$1,82^a \pm 0,02$	$1,82^a \pm 0,02$	$1,82^a \pm 0,02$
Final	$1,59^b \pm 0,03$	$1,08^b \pm 0,01$	$1,80^a \pm 0,03$	$1,76^a \pm 0,01$
Mobilização (%)	13 % ↓	40,6 % ↓	1,1 % ↓	3,3 % ↓
Trealose ($\mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1}$):				
Inicial	$56,19^a \pm 0,65$	$56,19^a \pm 0,65$	$56,19^a \pm 0,65$	$56,19^a \pm 0,65$
Final	$7,29^b \pm 0,03$	$6,56^b \pm 0,42$	$4,07^b \pm 0,13$	$3,02^b \pm 0,06$
Mobilização (%)	87 % ↓	88 % ↓	92,7 % ↓	94,6 % ↓
Glicerol interno ($\mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1}$):				
Inicial	$2,93^a \pm 0,01$	$2,93^a \pm 0,01$	$2,93^a \pm 0,01$	$2,93^a \pm 0,01$
Final	$1,80^b \pm 0,04$	$2,23^b \pm 0,01$	$2,62^b \pm 0,12$	$2,04^b \pm 0,04$
Mobilização (%)	38,5 % ↓	24 % ↓	10,6 % ↓	30,3 % ↓

^aCultivo em melaço 8% a pH 5,5 por 16h a 30°C

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t e X^2 ($\alpha = 0,05$)

Os símbolos ↓ e ↑ referem-se respectivamente à queda e acúmulo dos parâmetros fisiológicos avaliados

4.4.5. Efeito do armazenamento da levedura IQAr/45-2 em água sem revitalização

O efeito da armazenagem em água (Tabela 13) não apresentou diferença significativa em biomassa celular. O armazenamento das células nessa condição não apresentou mudanças significativas nos níveis de proteína, mas sim uma redução de 86,4% no nível de trealose, indicando que houve metabolização desse

carboidrato. A metabolização da trealose foi alta e semelhante à observada nas Tabelas 11 e 12 e a diminuição do glicerol interno indicou situação de estresse hiposmótico.

Tabela 13 – Comparação das variações em biomassa e parâmetros fisiológicos (viabilidade, proteína total, glicerol interno e trealose) durante a estocagem das células da levedura IQAr/45-2 por 16h em água destilada à temperatura ambiente e meio de revitalização MR.

Comparação dos parâmetros de processo e fisiológicos entre o armazenamento em água e meio MR		
	Água	Meio MR
Viabilidade (%):		
Início	91,41 ^a ± 0,26	94,7 ^a ± 2,40
Final do armazenamento	81,75 ^b ± 0,22	93,7 ^a ± 2,51
Biomassa (g.L⁻¹):		
Inicial	26,07 ^a ± 0,46	27,9 ^a ± 0,93
Final do armazenamento	24,60 ^a ± 0,50	30,8 ^b ± 0,19
Rendimento relativo (%)	-	10,4%
Proteína total (µg.mg células⁻¹ x 10²):		
Inicial	2,85 ^a ± 0,09	2,01 ^a ± 0,01
Final do armazenamento	2,71 ^a ± 0,05	1,70 ^b ± 0,01
Mobilização (%)	4,9% ↓	15,4% ↓
Trealose (µg.mg células⁻¹):		
Inicial	85,00 ^a ± 2,84	47,26 ^a ± 4,43
Final do armazenamento	11,57 ^b ± 3,83	2,03 ^b ± 0,19
Mobilização (%)	86,4% ↓	95,7% ↓
Glicerol interno (µg.mg células⁻¹):		
Inicial	4,13 ^a ± 0,69	4,00 ^a ± 0,00
Final do armazenamento	1,72 ^b ± 0,00	2,90 ^b ± 0,08
Mobilização (%)	58,3% ↓	27,5% ↓

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t e X² (α = 0,05)

Os símbolos ↓ e ↑ referem-se respectivamente à queda e acúmulo dos parâmetros fisiológicos avaliados

4.5. Efeitos das revitalizações em meio MR1 e MR2 sobre o desempenho fermentativo da levedura a 34°C e 37°C

Com o intuito de testar a eficácia da revitalização do fermento pelo tratamento com o meio MR1 e MR2 foram realizados de 8 a 10 ciclos de fermentação sucessivos a 34°C e 37°C para verificar o desempenho da linhagem IQAr/45-2 durante o processo. Como base de comparação as células também foram armazenadas em água destilada à temperatura ambiente entre fermentações sucessivas.

O tempo de fermentação para ambas as temperaturas foi padronizado em 6h, tempo no qual a produção de etanol tornou-se constante e os açúcares residuais não foram mais consumidos, como observado na Figura 11 abaixo:

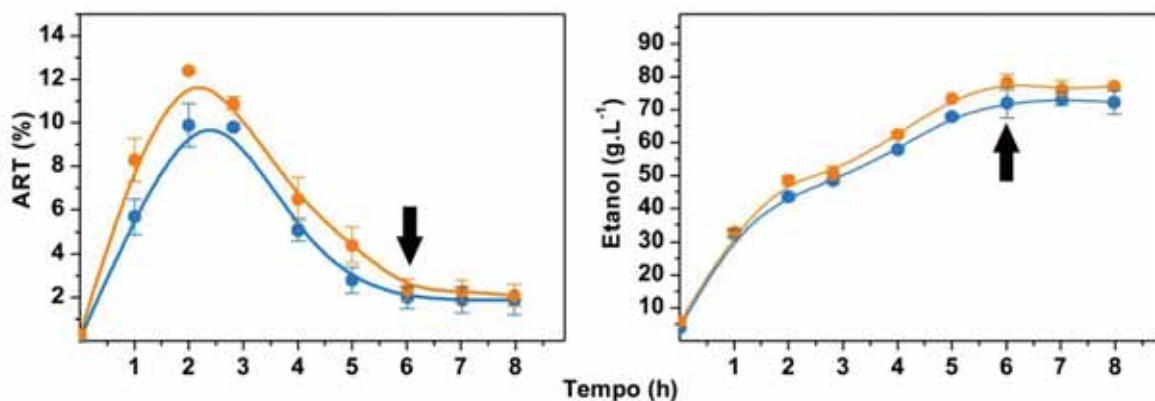


Figura 11 – Curvas tempo de fermentação das medidas de ART (%) e Etanol (g.L⁻¹) a 34°C (●) e 37°C (●), durante um único ciclo de fermentação com tempo de alimentação de 3h em melaço 20%

4.5.1. Comparação entre a revitalização em solução MR1, MR2 e água destilada (controle) entre fermentações sucessivas a 34°C

Quando revitalizadas em meio MR1 as células apresentaram uma queda na viabilidade celular de 95% para 81% até o 7º ciclo. Posteriormente observou-se uma recuperação de 86 a 89% a partir do 8º ciclo (Figura 12A). O açúcar residual apresentou um pico compreendido entre o 6º e 8º ciclo (Figura 12B). O aumento médio de biomassa celular durante os ciclos foi de 51% (Tabela 14 e Figura 13A). Por fim, a produção de etanol apresentou uma redução até o 6º ciclo e manteve-se constante na faixa de 80 g.L⁻¹ (Figura 12C), sendo o rendimento fermentativo no ultimo ciclo de 78%.

Quando o meio MR2 foi utilizado a viabilidade celular apresentou uma redução de 95% para 84% até o 4º ciclo, permanecendo constante em 85% nos demais ciclos (Figura 12A). Assim como o meio MR1, a revitalização em meio MR2 apresentou um acúmulo de açúcar residual entre o 6º e 8º ciclo, porém em menor concentração (Figura 12B). O aumento médio da biomassa foi de 47% (Tabela 14 e Figura 13B), enquanto que o etanol apresentou uma redução até o 6º ciclo, permanecendo constante em 82 g.L⁻¹ (Fig. 12C). O rendimento fermentativo ao final do 10º ciclo foi de 83%.

As células armazenadas em água destilada apresentaram uma redução na viabilidade de 95% para 72-73% até o 8º ciclo, porém com recuperação de 86% nos dois ciclos finais (Figura 12A). O açúcar residual foi máximo no 8º ciclo, sendo maior que nos meios MR1 e MR2 e coincidindo com uma redução de etanol e viabilidade celular (Figura 12B). A biomassa sofreu um aumento médio de 44% (Tabela 14 e Figura 13C) e o etanol apresentou uma queda constante até o 7º ciclo, permanecendo em média 74 g.L^{-1} (Figura 12C). O rendimento fermentativo no ultimo ciclo foi de 72,7%.

A análise estatística de comparação entre médias mostrou que existe diferença entre o tratamento em meio MR2 e os tratamentos em meio MR1 e água destilada do 6º ao 8º ciclo (Tabela 15).

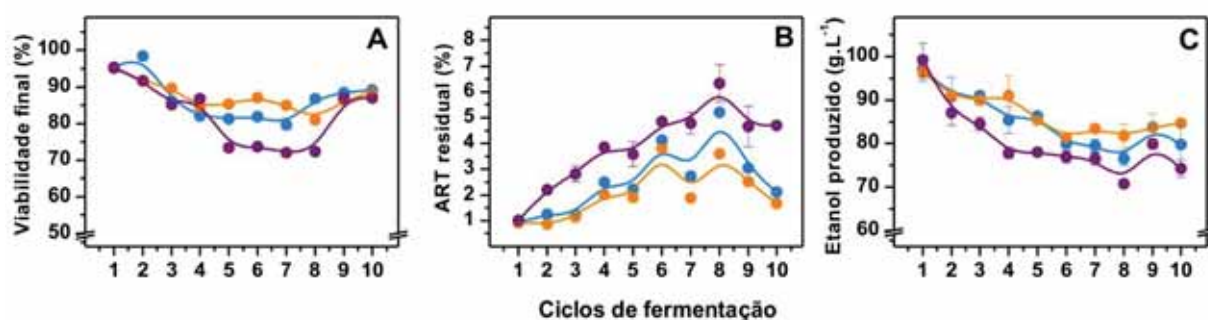


Figura 12 – Comparação da revitalização das células da linhagem IQAr/45-2 em meio MR1 (-●-), MR2 (-○-) e água destilada (-●-) sobre as medidas de viabilidade final (A), ART residual (B) e etanol produzido (C) em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C , realizados em melaço 20% a pH 4.5, com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.

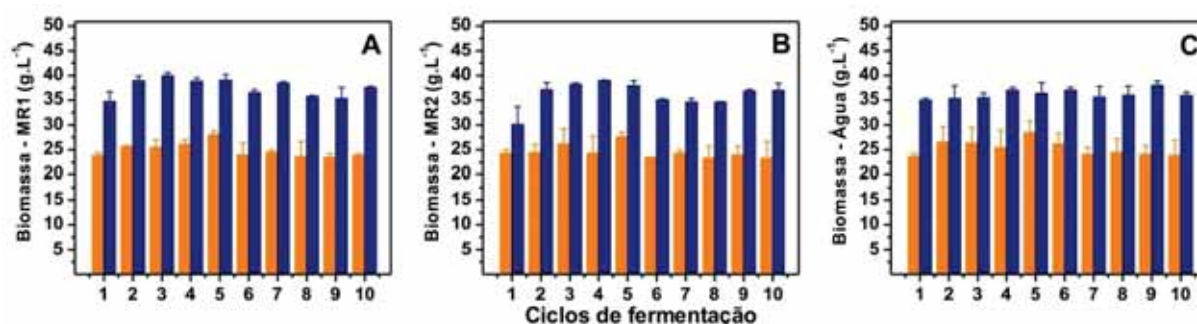


Figura 13 – Comparação da revitalização das células da linhagem IQAr/45-2 em meio MR1 (A), MR2 (B) e água destilada (C) sobre as medidas iniciais (■) e finais (■) de biomassa em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C , realizados em melaço 20% a pH 4.5, com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.

Tabela 14 – Comparação da revitalização das células da linhagem IQAr/45-2 em meio MR1, MR2 e água destilada sobre as medidas de biomassa em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5, com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.

Ciclos	Biomassa (g.L ⁻¹) (Fermentações a 34°C)					
	MR1		MR2		Água destilada	
	Final	Relativa (final/inicial)	Final	Relativa (final/inicial)	Final	Relativa (final/inicial)
1	34,78 ± 1,96	1,46	30,10 ± 4,67	1,24	35,01 ± 0,39	1,48
2	39,01 ± 0,84	1,52	37,16 ± 1,40	1,52	35,38 ± 2,59	1,34
3	39,93 ± 0,65	1,57	38,21 ± 0,28	1,46	35,48 ± 0,98	1,34
4	38,81 ± 0,75	1,49	39,01 ± 0,09	1,61	37,03 ± 0,61	1,46
5	39,07 ± 1,12	1,39	37,95 ± 1,03	1,37	36,40 ± 2,20	1,28
6	36,50 ± 0,65	1,52	35,11 ± 0,19	1,50	37,03 ± 0,60	1,42
7	38,41 ± 0,37	1,57	34,58 ± 0,75	1,43	35,64 ± 2,21	1,48
8	35,77 ± 0,19	1,51	34,58 ± 0,19	1,48	36,07 ± 1,83	1,47
9	35,38 ± 2,24	1,51	36,89 ± 0,28	1,54	38,02 ± 0,88	1,58
10	37,55 ± 0,28	1,58	37,03 ± 1,40	1,59	36,00 ± 0,66	1,51
Média	37,52 ± 1,80	1,51	36,06 ± 2,59	1,47	36,20 ± 0,92	1,44

Tabela 15 – Comparação da revitalização das células da linhagem IQAr/45-2 em meio MR1, MR2 e água destilada sobre as medidas de etanol produzido em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5, com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.

Ciclos	Etanol produzido (g.L ⁻¹) (Fermentações a 34°C)		
	MR1	MR2	Água destilada
1 ^F	97,20 ^a ± 3,01	96,42 ^a ± 1,61	99,25 ^a ± 3,91
2 ^F	91,11 ^a ± 4,11	90,90 ^a ± 1,20	87,06 ^a ± 2,89
3 ^E	90,92 ^{ad} ± 1,23	89,99 ^{cd} ± 1,14	84,60 ^{bc} ± 1,51
4 ^F	85,41 ^a ± 3,09	91,07 ^a ± 4,52	77,82 ^a ± 1,34
5 ^E	86,28 ^{ad} ± 0,21	85,38 ^{bd} ± 0,84	78,08 ^c ± 0,36
6 ^E	79,97 ^{ad} ± 0,46	81,36 ^{ab} ± 0,25	76,93 ^{cd} ± 1,33
7 ^E	79,52 ^{ad} ± 1,38	83,41 ^{ab} ± 0,94	76,53 ^{cd} ± 1,44
8 ^E	76,53 ^{ad} ± 1,44	81,77 ^{ab} ± 2,66	70,82 ^{cd} ± 0,54
9 ^F	83,82 ^a ± 0,22	83,68 ^a ± 3,21	79,93 ^a ± 1,08
10 ^F	79,75 ^a ± 4,61	84,70 ^a ± 0,78	74,26 ^a ± 1,98

a, b, c, d Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

^E Ciclos de fermentação cujos tratamentos apresentaram diferença significativa entre si pelo teste ANOVA ($\alpha = 0,05$)

^F Ciclos de fermentação cujos tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste ANOVA ($\alpha = 0,05$)

4.5.2. Comparação entre a revitalização em solução MR1, MR2 e água destilada (controle) entre fermentações sucessivas a 37°C

Na presença do meio MR1 foram verificados pequenos decréscimos de viabilidade em relação ao valor inicial (97,7%) ao longo dos ciclos, mas uma queda de viabilidade mais significativa foi observada nos dois últimos ciclos de fermentação (uma queda de 79,6%-78,5%) (Figura 14A). A produção de etanol apresentou uma pequena queda até o 4º ciclo e posteriormente manteve-se constante com um valor médio de 76,8 g.L⁻¹ (Figura 14C). O aumento de biomassa entre os ciclos foi de 31,2% que deveria ser controlado para se ter um maior rendimento de etanol (Tabela 16 e Figura 15A). Possivelmente, devido à perda de viabilidade nos últimos ciclos, o açúcar residual aumentou (Figura 14B). O rendimento fermentativo no último ciclo foi de 75%.

A revitalização em meio MR2 apresentou uma queda na viabilidade celular até o 5º ciclo, permanecendo constante em média 82% nos demais ciclos (Figura 14A). O açúcar residual apresentou um pequeno aumento até o 5º ciclo, permanecendo constante e menor que em meio MR1 e água destilada (Figura 14B). O aumento médio de biomassa foi de 33% (Tabela 16 e Figura 15B). Já o etanol, mostrou uma redução pequena até o 4º ciclo, permanecendo constante em 81 g.L⁻¹ (Figura 14C). O rendimento fermentativo do ultimo ciclo foi de 82%.

No armazenamento em água foram verificados decréscimos de viabilidade em relação ao valor inicial ao longo dos ciclos, atingindo uma média de 70% no 7º ciclo (Figura 14A). A produção de etanol também reduziu, com um valor final de 66,2 g.L⁻¹ (Figura 14C). O açúcar residual aumentou apresentando um máximo no 4º ciclo (Figura 14B). O aumento médio de biomassa foi de 35% (Tabela 16 e Figura 15C). O rendimento fermentativo ao final do 10º ciclo foi de 66,6%.

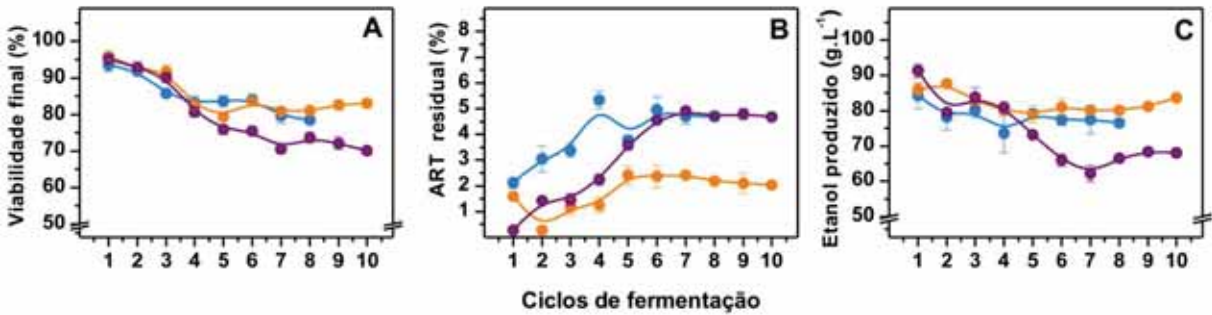


Figura 14 – Comparação da revitalização das células da linhagem IQAr/45-2 em meio MR1 (—●—), MR2 (—●—) e água destilada (—●—) sobre as medidas de viabilidade final (A), ART residual (B) e etanol produzido (C) em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 37°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5, com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.

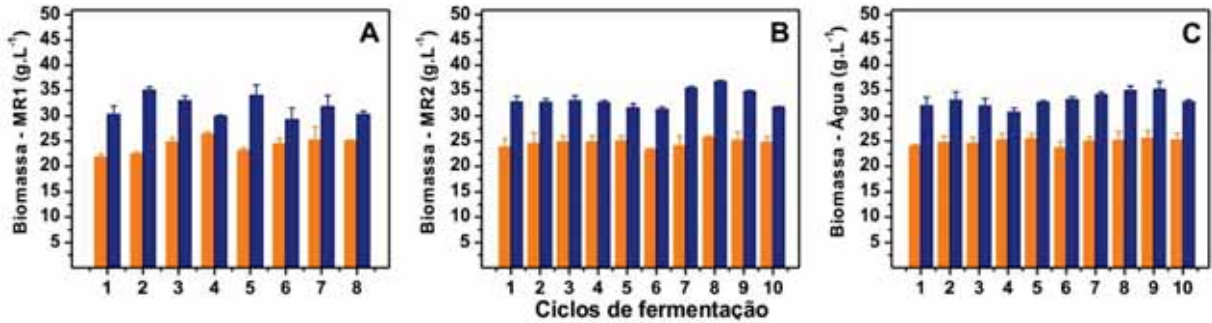


Figura 15 – Comparação da revitalização das células da linhagem IQAr/45-2 em meio MR1 (A), MR2 (B) e água destilada (C) sobre as medidas iniciais (■) e finais (■) de biomassa em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 37°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5, com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.

Tabela 16 – Comparação da revitalização das células da linhagem IQAr/45-2 em meio MR1, MR2 e água destilada sobre as medidas de biomassa em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 34°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5, com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.

Biomassa (g.L ⁻¹) (Fermentações a 37°C)						
Ciclos	MR1		MR2		Água destilada	
	Final	Relativa (final/inicial)	Final	Relativa (final/inicial)	Final	Relativa (final/inicial)
1	30,29 ± 1,68	1,25	32,04 ± 1,65	1,33	32,77 ± 1,08	1,37
2	35,11 ± 0,56	1,45	33,13 ± 1,64	1,34	32,70 ± 0,72	1,33
3	33,03 ± 0,89	1,36	31,94 ± 1,53	1,30	33,07 ± 0,95	1,33
4	29,90 ± 0,28	1,24	30,72 ± 0,59	1,21	32,67 ± 0,38	1,31
5	34,06 ± 2,05	1,41	32,74 ± 0,34	1,29	31,61 ± 0,84	1,26
6	29,30 ± 2,24	1,21	33,23 ± 0,54	1,41	31,28 ± 0,46	1,34
7	31,81 ± 2,24	1,31	34,19 ± 0,55	1,37	35,51 ± 0,30	1,47
8	30,29 ± 0,65	1,25	35,01 ± 0,90	1,39	36,83 ± 0,15	1,43
9	-	-	35,31 ± 1,47	1,38	34,85 ± 0,15	1,39
10	-	-	32,80 ± 0,35	1,30	31,75 ± 0,08	1,28
Média	31,73 ± 2,14	1,31	33,11 ± 1,42	1,33	33,30 ± 1,83	1,35

Dentre os tratamentos aquele que proporcionou um melhor rendimento em etanol foi o meio MR2 (82-83%) em ambas as temperaturas de fermentação (34°C e 37°C). Um rendimento semelhante de aproximadamente 83% foi encontrado por Parazzi Junior (2006) para as leveduras comerciais BG-1, CAT-1 e PE-2 em três ciclos seguidos de fermentação realizados a temperatura ambiente, sem tratamento entre eles. A análise estatística de comparação entre médias mostrou que não existe diferença significativa nos ciclos finais entre os tratamentos com meio MR1 e MR2, mas sim diferença entre esses tratamentos e o armazenamento em água destilada (Tabela 17).

Já em relação à biomassa, um aumento muito semelhante foi visto entre os três tratamentos, sendo de aproximadamente 47% a 34°C e 33% a 37°C. Como dito anteriormente, uma linhagem desejável deve ser uma boa produtora de etanol, porém também deve prevalecer sobre as demais linhagens até o final do processo por meio de um crescimento satisfatório.

Um tratamento de revitalização que melhore o estado fisiológico das células certamente será uma garantia da robustez das células revitalizadas frente aos estresses do processo. A revitalização da levedura IQAr/45-2, portanto, mostrou-se eficiente e favoreceu o processo de produção de etanol (principalmente em meio MR2) e um aumento constante de biomassa. Uma levedura que mostra indicadores de estresse superiores terá chance maior de manter o seu crescimento nos ciclos de fermentação.

Observa-se que do 1° ao 5° ciclo das fermentações a 34°C e 37°C as curvas de viabilidade e etanol produzido seguem um perfil descendente. Isso poderia estar associado ao longo tempo de revitalização aliado a falta de nutrientes, uma vez que o açúcar é totalmente consumido em 6h (dados não mostrados). Nas fermentações a 37°C a curva de etanol produzido mostrou-se mais constante ao longo dos ciclos, sugerindo que a revitalização seja mais benéfica para fermentações em temperaturas maiores.

Tabela 17 – Comparação da revitalização das células da linhagem IQAr/45-2 em meio MR1, MR2 e água destilada sobre as medidas de etanol produzido em cada um dos ciclos de fermentação sucessivos a 37°C, realizados em melaço 20% a pH 4.5, com duração de 6h e tempo de alimentação de 3h.

Ciclos	Etanol produzido (g.L ⁻¹) (Fermentações a 37°C)		
	MR1	MR2	Água destilada
1 ^F	84,26 ^a ± 3,63	85,98 ^a ± 1,92	91,33 ^a ± 1,92
2 ^E	78,29 ^{ad} ± 3,79	87,74 ^{bc} ± 0,16	79,50 ^{cd} ± 0,85
3 ^F	80,05 ^a ± 2,02	82,78 ^a ± 1,13	83,87 ^a ± 2,73
4 ^F	73,64 ^a ± 5,49	80,14 ^a ± 1,60	81,09 ^a ± 0,60
5 ^E	79,27 ^{ad} ± 1,09	79,03 ^{bd} ± 2,44	73,18 ^c ± 0,05
6 ^E	77,39 ^{ad} ± 1,51	81,12 ^{bd} ± 2,40	66,11 ^c ± 1,72
7 ^E	77,50 ^{ad} ± 4,03	80,10 ^{bd} ± 0,22	62,25 ^c ± 2,29
8 ^E	76,50 ^{ad} ± 1,21	80,14 ^{bd} ± 0,59	66,46 ^c ± 0,93
9 ^E	-	81,23 ^a ± 0,42	68,45 ^b ± 0,09
10 ^E	-	83,69 ^a ± 0,06	68,04 ^b ± 1,15

a, b, c, d Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

^E Ciclos de fermentação cujos tratamentos apresentaram diferença significativa entre si pelo teste ANOVA ($\alpha = 0,05$)

^F Ciclos de fermentação cujos tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste ANOVA ($\alpha = 0,05$)

4.5.3. Variações dos parâmetros fisiológicos ao final dos ciclos de fermentação a 34°C e 37°C

Os parâmetros fisiológicos avaliados ao final do 1°, 5° e 10° ciclos de fermentação a 34°C e 37°C não apresentaram diferença aparente quando as células foram submetidas ao tratamento em meio MR2 e água destilada, com exceção do glicerol para as fermentações a 34°C e 37°C (Tabelas 18 e 19). Os níveis de glicerol interno foram, aproximadamente, 4,6 vezes maior nas fermentações a 34°C e o glicerol externo foi 2,6 vezes maior para fermentações a 37°C, para ambos os tratamentos (meio MR2 e água destilada).

Os parâmetros das fermentações intercaladas por revitalização em meio MR1 não foram determinados.

Tabela 18 – Parâmetros fisiológicos (trealose e proteínas totais) determinados ao final das fermentações intercaladas pelos tratamentos do fermento em meio de revitalização MR2 e água destilada

Tratamentos	Ciclos de fermentação	Parâmetros fisiológicos ao final das fermentações intercaladas pelos tratamentos			
		Trealose ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$)		Proteína total ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$)	
		34°C	37°C	34°C	37°C
Meio MR2	1°	117,16 $\pm$ 2,24	112,75 $\pm$ 1,07	564,33 $\pm$ 2,31	297,01 $\pm$ 2,31
	5°	118,36 $\pm$ 2,51	116,77 $\pm$ 2,01	490,53 $\pm$ 0,61	321,00 $\pm$ 1,29
	10°	93,36 $\pm$ 4,03	118,23 $\pm$ 1,11	515,54 $\pm$ 1,08	329,00 $\pm$ 1,47
Água destilada	1°	124,06 $\pm$ 2,93	109,24 $\pm$ 2,08	427,98 $\pm$ 1,09	327,60 $\pm$ 0,86
	5°	102,73 $\pm$ 1,61	108,56 $\pm$ 1,57	473,01 $\pm$ 2,30	332,76 $\pm$ 1,35
	10°	113,81 $\pm$ 0,10	113,05 $\pm$ 0,44	513,04 $\pm$ 0,61	351,01 $\pm$ 2,01

Tabela 19 – Parâmetros fisiológicos glicerol interno e externo ao final das fermentações intercaladas pelos tratamentos em meio MR2 e água destilada

Tratamentos	Ciclos de fermentação	Parâmetros fisiológicos ao final das fermentações intercaladas pelos tratamentos			
		Glicerol interno ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$)		Glicerol externo ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
		34°C	37°C	34°C	37°C
Meio MR2	1°	11,35 $\pm$ 0,20	2,56 $\pm$ 0,10	8,10 $\pm$ 0,02	18,96 $\pm$ 0,00
	5°	10,44 $\pm$ 0,07	2,09 $\pm$ 0,06	7,19 $\pm$ 0,08	18,30 $\pm$ 0,01
	10°	8,46 $\pm$ 0,05	2,85 $\pm$ 0,08	6,93 $\pm$ 0,11	20,41 $\pm$ 0,01
Água destilada	1°	7,69 $\pm$ 0,25	1,78 $\pm$ 0,11	7,50 $\pm$ 0,14	18,01 $\pm$ 0,01
	5°	10,47 $\pm$ 0,10	1,42 $\pm$ 0,06	7,83 $\pm$ 0,05	19,84 $\pm$ 0,00
	10°	7,11 $\pm$ 0,20	1,19 $\pm$ 0,24	6,83 $\pm$ 0,13	20,40 $\pm$ 0,04

4.6. Variações em biomassa e parâmetros fisiológicos em função do tempo de revitalização nos meios MR1, MR2 e água destilada

No experimento das Figuras 16, 17 e 18 verificou-se o comportamento (variações em biomassa, viabilidade e parâmetros fisiológicos) da linhagem IQAr/45-2 durante as 16h de armazenamento após passarem por um ciclo de fermentação. O armazenamento foi feito em diferentes condições: 1) meio MR1 (com 1x de solução de sais), 2) meio MR2 (MR1 com 1 g.L⁻¹ de LC) e 3) água destilada em temperatura ambiente.

Na Figura 16A, com exceção da estocagem em água, durante a qual ocorreu um pequeno decréscimo de biomassa, as demais condições promoveram um aumento de biomassa ou renovação celular (aproximadamente 8,5% na condição 1 e de 15,5% na condição 2). A viabilidade foi semelhante nas três condições, ficando em média 80% (Figura 16B). Em todos os casos os níveis altos de trealose,

provavelmente em decorrência do estresse sofrido durante a fermentação, foram seguidos por uma rápida queda com valor mínimo em três horas.

Segundo Sebollela *et al.*, (2004), a presença de elevados teores de trealose (1,0 – 1,5 M) inibem a atividade (57 – 70%) de enzimas importantes (glutathione redutase, pirofosfatase citosólica e glicose-6-fosfato desidrogenase). Esses resultados, portanto, sugerem que as células podem apresentar uma significativa inibição de enzimas importantes durante, ou mesmo depois ao estresse, a menos que esse dissacarídeo seja rapidamente degradado durante a fase de recuperação, evitando a inibição de tais enzimas.

Aparentemente a condição 2 chegou ao fim do armazenamento com uma concentração maior de trealose ($17,7 \mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1}$) do que as condições 1 ($13,2 \mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1}$) e 3 ($11,5 \mu\text{g.mg}_{\text{células}}^{-1}$) como mostra a Figura 17A. Segundo Jorgensen *et al.*, (2002) e D'Amore *et al.*, (1991), uma maior capacidade fermentativa e osmotolerância estariam associadas a elevados níveis de trealose inicial, visto que essas células, ao fim das 16h, serão usadas para iniciar um novo ciclo de fermentação. Já, segundo Amorim e Leão (2005), as reservas energéticas, como a trealose, quando mantidas até o fim do processo, podem ser usadas como parâmetro para avaliar a eficiência de determinada levedura, concluindo que ela é resistente e suporta bem as ameaças à sua sobrevivência.

Os níveis de proteínas permaneceram constantes sem grandes alterações durante as 16h (Figura 17B).

No intervalo entre 2 e 6h observa-se a fase logarítmica de crescimento nas condições 1 e 2, com respectivo aumento de etanol e consumo máximo de açúcar (dados não mostrados). Esses fatores em conjunto poderiam gerar um estresse nutricional e hipo-osmótico.

O estresse hipo-osmótico faz com que o glicerol interno seja liberado para o meio (KAYINGO *et al.*, 2001), como observado 2h após o início da revitalização (Figuras 18A e B).

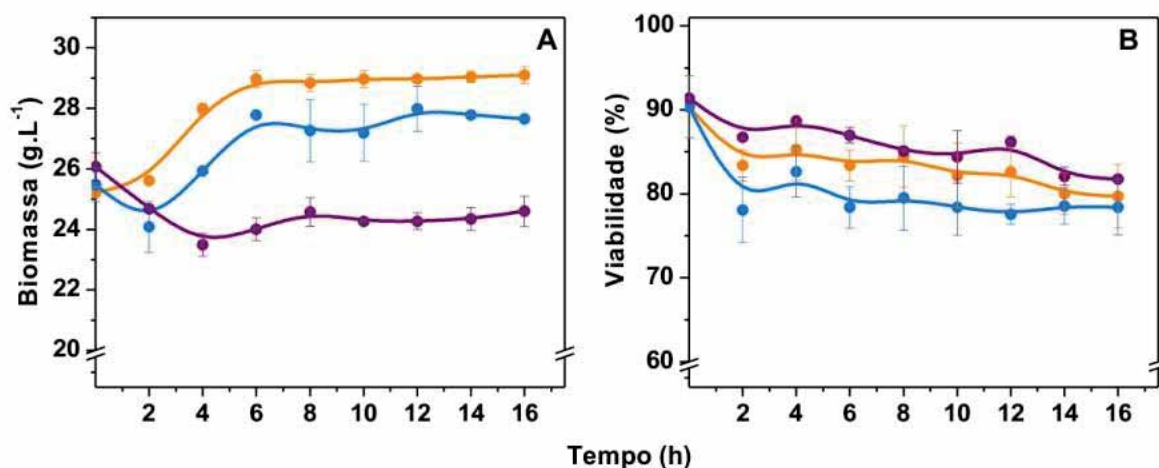


Figura 16 – Efeito dos tratamentos sobre as células da levedura IQAr/45-2 sobre a biomassa (A) e viabilidade (B) quando mantidas em: meio MR1 (●), meio MR2 (●) e água destilada (●), durante 16h de revitalização e armazenamento entre ciclos sucessivos de fermentação.

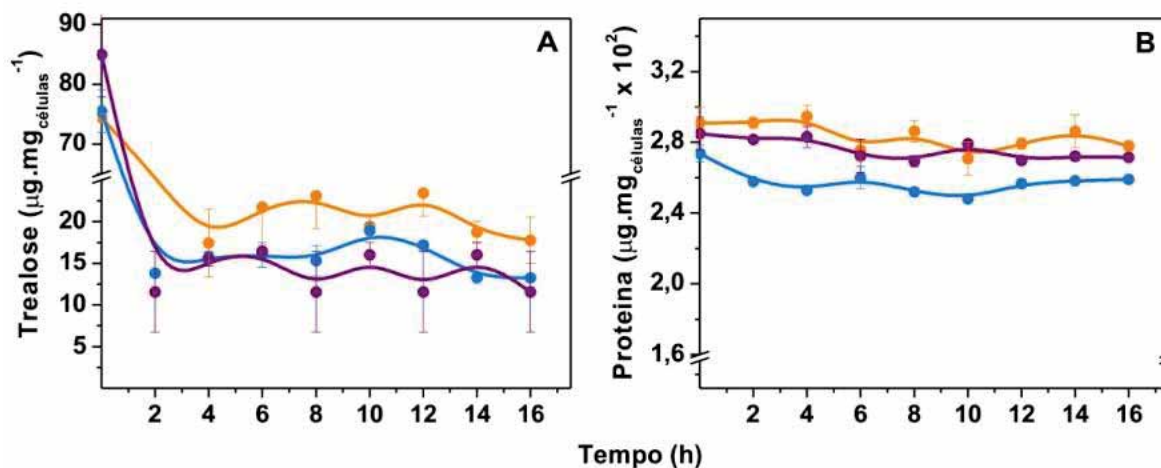


Figura 17 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre as células da levedura IQAr/45-2 sobre a trealose (A) e proteínas totais (B) quando mantidas em: meio MR1 (●), meio MR2 (●) e água destilada (●), durante 16h de revitalização e armazenamento entre ciclos sucessivos de fermentação.

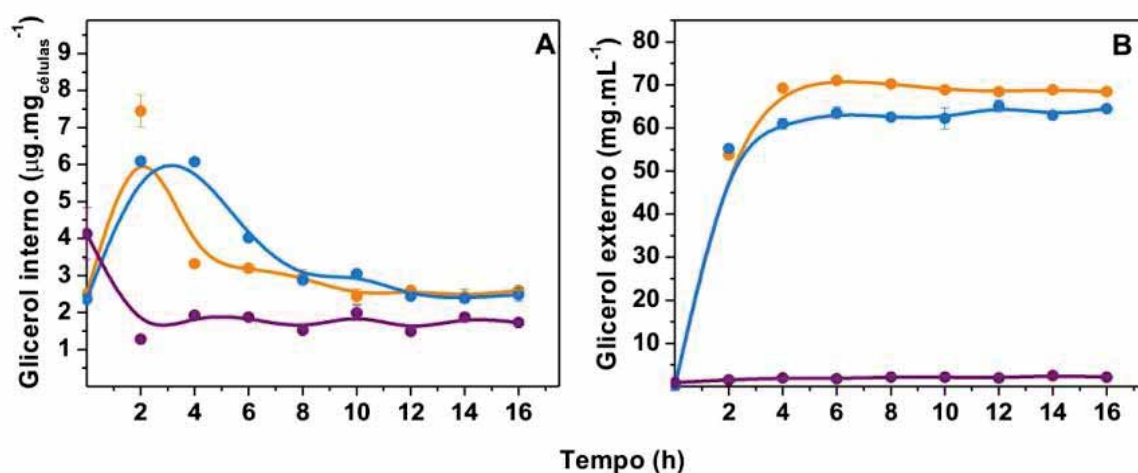


Figura 18 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre as células da levedura IQAr/45-2 sobre o glicerol interno (A) e externo (B) quando mantidas em: meio MR1 (-●-), meio MR2 (-○-) e água destilada (-●-), durante 16h de revitalização e armazenamento entre ciclos sucessivos de fermentação.

4.7. Ensaio qualitativo da resistência conferida por teores diferentes de trealose dos inóculos sobre o crescimento da levedura em condições de estresse osmótico, alcoólico e térmico

Segundo vários autores (ELEUTHERIO *et al.*, 1993; LILLIE; PRINGLE, 1980; MAHMUD *et al.*, 2010) a trealose é um açúcar capaz de conferir proteção às células frente a diversos fatores de estresse. Os resultados obtidos a partir do plaqueamento da linhagem IQAr/45-2 em meio YPD não mostram a influência da trealose no crescimento sob estresse térmico e etanol. Contudo, verificou-se um crescimento melhor no meio com 10% de NaCl quando as células encontravam-se com maiores teores de trealose, ou seja, no tempo zero da curva de revitalização quando comparado ao tempo de 12h (níveis de trealose menores) (Figura 19). Segundo Mahmud *et al.*, (2009), uma linhagem de *S. cerevisiae* com tripla deleção dos genes codificadores de trealase (NTH1, NTH2 e ATH1) apresentaram uma taxa específica de crescimento maior do que o controle quando exposta a um estresse salino de aproximadamente 6% de NaCl. Os mesmos autores ainda propõem que o acúmulo de trealose antes da exposição ao estresse é necessário para a proteção celular. Portanto, pode-se concluir que a trealose pode conferir uma proteção às células frente ao estresse osmótico, favorecendo o crescimento em meio hiper-osmótico.

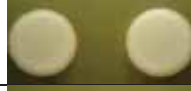
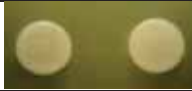
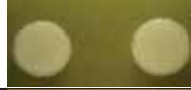
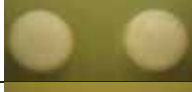
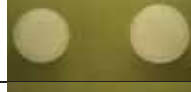
Fatores de estresse	Tempo	
Temperatura (°C)	0h	12h
30		
37		
40		
NaCl (% p/v) 30°C		
4		
6		
10		
Etanol (% v/v) 30°C		
8		
10		
12		

Figura 19 – Crescimento em meio YPD das células iniciais ($247 \mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$) e após 12h ($62 \mu\text{g}_{\text{trealose}} \cdot \text{mg}_{\text{células}}^{-1}$) de revitalização em meio MR1 sob condições de estresse térmico, osmótico (NaCl) e alcóolico

4.8. Efeito do tratamento ácido do fermento sobre a viabilidade e fenótipo das colônias em meios diferenciais

Na indústria de etanol, é necessária a manutenção de altos níveis de viabilidade celular. Porém, como há reciclo de células após a fermentação, as células de levedura são coletadas por centrifugação e tratadas com ácido sulfúrico em pH 2,0-2,5 por 1-2 h, a fim de reduzir a contaminação bacteriana e a floculação. Depois disto são reinoculadas em caldo-de-cana, melaço, xarope ou mistura dos mesmos. Esse procedimento, entretanto, pode interferir negativamente no metabolismo e fisiologia do fermento (DORTA, 2006; WHEALS *et al.*, 1999).

Muitas vezes a viabilidade celular da levedura permanece constante (atividade metabólica e integridade da membrana), contudo sua cultivabilidade, ou

seja, a capacidade da célula de crescer em meio sólido pode ser afetada (GABIER *et al.*, 2005).

O tratamento ácido (pH 2,0 em água destilada; solução de glicose 0,5%; melaço 1%) não causou perdas de biomassa e viabilidade das leveduras IQAr/45-2 e PE-2 durante os três tipos de tratamento ácido (Tabela 20).

Tabela 20 – Efeito do tratamento ácido¹ das linhagens de levedura IQAr/45-2 e PE-2, resultante de um ciclo de fermentação a 37°C, sobre a biomassa e viabilidade celular

Leveduras	Solução de tratamento pH 2,0 por 2h	Biomassa			Viabilidade final (%)
		Inicial	Final	Final/Inicial	
IQAr/45-2	Água destilada	38,68 ^a ± 0,93	39,86 ^a ± 0,37	1,03	99,00 ^a ± 0,77
	Glicose 0,5 %	47,39 ^a ± 0,19	48,18 ^a ± 0,19	1,02	95,50 ^a ± 2,47
	Melaço 1,0 %	45,40 ^a ± 0,00	46,46 ^a ± 0,75	1,02	97,80 ^a ± 1,17
PE-2	Água destilada	86,33 ^a ± 0,75	82,24 ^a ± 1,31	0,95	99,30 ^a ± 0,90
	Glicose 0,5 %	72,60 ^a ± 1,04	79,73 ^a ± 0,37	1,10	100,00 ^a ± 0,00
	Melaço 1,0 %	83,69 ^a ± 1,12	76,96 ^a ± 4,29	0,92	99,60 ^a ± 0,47

Valores iniciais médios de viabilidade para levedura IQAr/45-2 (98,41^a ± 0,20) e PE-2 (100,00^a ± 0,00)

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t e X² (α = 0,05)

¹Células mantidas em suspensão em água, glicose 0,5% e melaço 1%, mantendo-se o pH em 2,0 por 2h com adição de H₂SO₄ 6mol.L⁻¹ a intervalos de 30 min.

A Tabela 21 mostra que os três tipos de tratamento não causaram letalidade celular apenas para a linhagem IQAr/45-2 quando plaqueada em meio YPD, no qual a contagem de colônias mostrou um aumento na cultivabilidade entre 21% a 93%. Já, a levedura PE-2 mostrou uma redução de cultivabilidade de 38% a 51%. Dessa forma os valores relativos (final/inicial) mostraram a ocorrência de multiplicação celular para a linhagem IQAr/45-2 durante os três tipos de tratamento apesar do teste estatístico mostrar que alguns dados não apresentam diferença significativa.

Tabela 21 – Efeito do tratamento ácido¹ após 1 ciclo de fermentação sobre a sobrevivência das leveduras IQAr/45-2 e PE-2 no meio YPD

Leveduras	Solução de tratamento	YPD (células.ml ⁻¹ x 10 ⁸)		Crescimento Relativo (final/inicial)
		Inicial (Antes do tratamento)	Final (Após tratamento)	
IQAr/45-2	Água destilada		13,00 ^b ± 2,12	1,46
	Glicose 0,5 %	8,90 ^a ± 0,71	17,20 ^b ± 2,47	1,93
	Melaço 1,0 %		10,80 ^b ± 2,23	1,21
PE-2	Água destilada		7,65 ^b ± 1,05	0,62
	Glicose 0,5 %	12,30 ^a ± 2,60	6,88 ^b ± 1,99	0,56
	Melaço 1,0 %		6,02 ^b ± 1,58	0,49

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t ($\alpha = 0,05$)

¹Células mantidas em suspensão em água, glicose 0,5% e melaço 1%, mantendo-se o pH em 2,0 por 2h com adição de H₂SO₄ 6mol.L⁻¹ a intervalos de 30 min.

Baseado no número inicial de colônias em meio YPD e WLN, verificou-se a inibição no crescimento das células de IQAr/45-2 no meio WLN contendo corante verde de bromocresol. A redução no número de colônias (sensibilidade aos corantes) para a levedura IQAr/45-2 não foi observada para a levedura PE-2. Assim, o corante reduziu o número de colônias em 31,5% em meio WLN para a levedura IQAr/45-2 (Tabela 22).

Tabela 22 – Efeito do tratamento ácido¹ após 1 ciclo de fermentação sobre a sobrevivência das leveduras IQAr/45-2 e PE-2 no meio diferencial WLN

Leveduras	Solução de tratamento	WLN (células.ml ⁻¹ x 10 ⁸)		Crescimento Relativo (final/inicial)
		Inicial (Antes do tratamento)	Final (Após tratamento)	
IQAr/45-2	Água destilada		8,88 ^a ± 1,59	1,45
	Glicose 0,5 %	6,10 ^a ± 2,97	7,50 ^a ± 1,41	1,23
	Melaço 1,0 %		9,00 ^a ± 2,33	1,47
PE-2	Água destilada		5,58 ^b ± 0,58	0,43
	Glicose 0,5 %	13,00 ^a ± 1,30	7,31 ^b ± 1,18	0,56
	Melaço 1,0 %		6,70 ^b ± 1,74	0,51

^{a, b} Valores indicados pela mesma letra não diferem significativamente em relação aos seus respectivos valores iniciais conforme indica o teste t ($\alpha = 0,05$)

¹Células mantidas em suspensão em água, glicose 0,5% e melaço 1%, mantendo-se o pH em 2,0 por 2h com adição de H₂SO₄ 6mol.L⁻¹ a intervalos de 30 min.

Em meio WLN, a linhagem IQAr/45-2 apresentou fenótipos diferenciados da linhagem PE-2, apresentando coloração verde clara com o centro verde escuro, ao contrário da linhagem PE-2, cuja coloração foi uniforme e verde clara (Figura 20). Ambas apresentaram uma homogeneidade dos fenótipos antes e após os 3

tratamentos, mostrando que o tratamento ácido não foi responsável pelo aparecimento dessa característica.

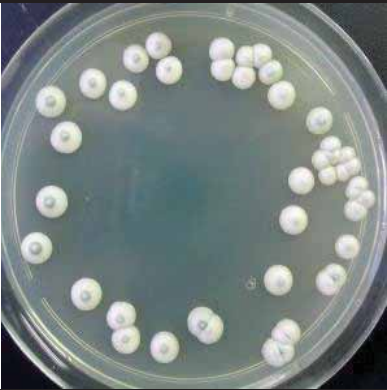
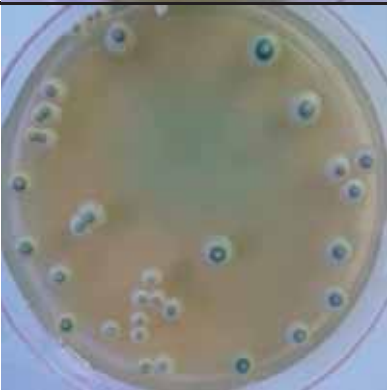
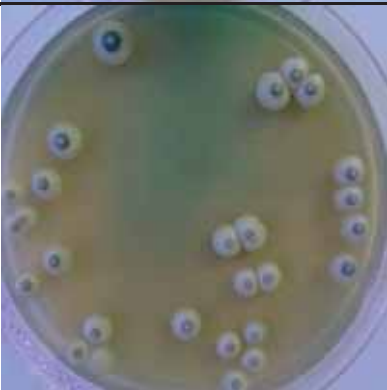
Tratamentos (pH 2,0 por 2h)	Linhagens	
	IQAr/45-2	PE-2
Antes do tratamento (Leite de levedura)		
Após tratamento em água destilada		
Após tratamento em glicose 0,5%		
Após tratamento em melaço 1%		

Figura 20 - Efeitos dos diversos tratamentos ácidos com H_2SO_4 (2h em pH 2,0) sobre a estabilidade das colônias da levedura IQAr/45-2 e PE-2 no meio diferencial WLN nas condições: antes do tratamento e após tratamentos com água destilada, glicose 0,5% e melaço 1%

4.9. Limites da acidez láctica e acética para o crescimento da linhagem IQAr/45-2

A Figura 21 indica que a menor concentração de ácido acético que conseguiu inibir o crescimento da levedura IQAr/45-2 em melaço solidificado 10% (ART) foi $\geq 0,4\%$ (p/v). O limite para crescimento em meio sintético líquido foi de $0,6\%$ (p/v) como descrito por Narendranath *et al.*, (2001). A presença da solução de sais pareceu não ter efeitos benéficos sobre a tolerância à acidez nem sobre o crescimento. Já, a adição de EN promoveu uma maior proliferação celular, contudo pareceu não beneficiar a tolerância a concentrações maiores de ácido acético.

A Figura 22 indica que o crescimento foi inibido em concentrações de ácido láctico $\geq 3\%$, sendo este valor elevado para $3,5-4,0\%$ com a adição de sais e EN. O limite encontrado por Narendranath *et al.*, (2001) em meio sintético foi de $2,5\%$. Segundo Maiorella (1983), 4% (p/v) de ácido láctico foi suficiente para o decréscimo de 80% na população de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em meio sintético.

Como conclusão pode-se dizer que a levedura IQAR/45-2 é bastante tolerante tanto ao ácido acético quanto ao láctico quando cultivada em melaço 10%. Os resultados descritos na literatura indicam que o ácido acético é mais inibitório à levedura em concentrações muito menores do que o ácido láctico. Isso pode ser explicado pelo fato dos dois ácidos apresentarem diferentes constantes de dissociação. Em um dado pH ácido, no caso 4,5, há mais moléculas de ácido acético ($pK_a = 4,74$) na forma não dissociada do que seria encontrado para uma concentração igual de ácido láctico ($pK_a = 3,86$). Por apresentarem natureza lipofílica, as formas não dissociadas desses ácidos se difundem passivamente através da membrana plasmática celular e, em pHs intracelulares maiores, eles dissociam-se produzindo ânions e prótons (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A fim de restituir a homeostase celular, perdida pelo acúmulo de prótons, a célula bombeia os prótons para o exterior por meio da H^+ -ATPase. Isso pode resultar em uma queda do ATP celular diminuindo o pool de energia destinado ao crescimento e funções metabólicas essenciais (BRUL; COOTE, 1999, HOLYOAK *et al.*, 1996).

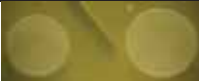
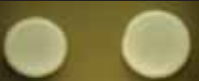
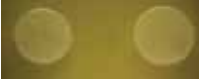
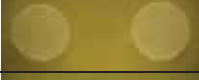
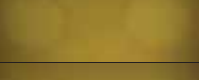
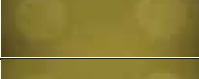
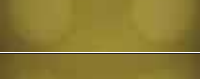
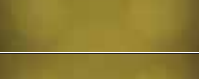
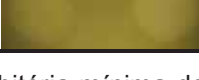
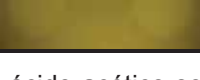
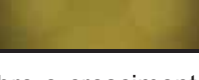
Concentrações de ácido acético (% p/v)	Meio de melaço 10%		
	Controle	Solução de sais	LC 1 g.L ⁻¹
0,0			
0,1			
0,2			
0,3			
0,4			
0,5			
0,6			
0,7			
0,9			

Figura 21 – Concentração inibitória mínima do ácido acético sobre o crescimento da linhagem IQAr/45-2 em meio sólido de melaço 10% acrescido de solução de sais e LC 1 g.L⁻¹ após 48h. Sais: 1 g.L⁻¹ DAP; 0,1 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,1 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O.

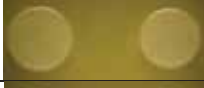
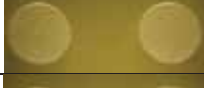
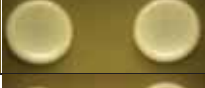
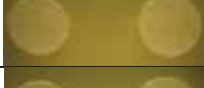
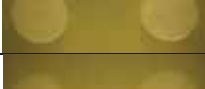
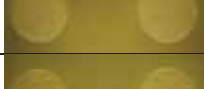
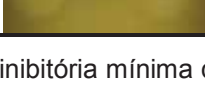
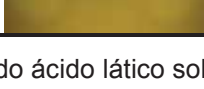
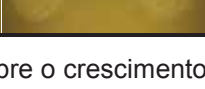
Concentrações de ácido lático (% p/v)	Meio de melaço 10%		
	Controle	Solução de sais	LC 1 g.L ⁻¹
0,0			
0,5			
1,0			
1,5			
2,0			
2,5			
3,0			
3,5			
4,0			

Figura 22 – Concentração inibitória mínima do ácido lático sobre o crescimento da linhagem IQAr/45-2 em meio de melaço 10% acrescido de solução de sais e LC 1 g.L⁻¹ após 48h. Sais: 1 g.L⁻¹ DAP; 0,1 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,1 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O.

Conclusões

CONCLUSÕES

A) Lisado celular

O lisado celular de levedura (LC) mostrou ser um bom estimulador do crescimento, apresentando um rendimento semelhante ao uso de extrato de levedura comercial, sua obtenção ainda mostrou-se fácil e de baixo custo, dispensando a necessidade de aditivos para a lise celular.

B) Propagações

A propagação em 4 etapas com concentração crescente de açúcar apresentou o mesmo rendimento de biomassa da linhagem IQAr/45-2 e sem efeito das temperaturas. Já, na propagação em 2 etapas com concentração de açúcar fixa (12% ART), a levedura IQAr/45-2 apresentou menor biomassa que a PE-2, porém um rendimento semelhante entre as duas leveduras foi observado na presença de LC.

C) Revitalização

A padronização da revitalização celular resultou no seguinte meio: melaço 8% a 30°C, pH 5,5 (meio MR). A esse meio foi adicionado sais e LC na concentração de 1 g.L⁻¹ (meio MR2), o que pareceu ser a melhor condição para a revitalização das células entre os ciclos de fermentação, com maiores rendimentos em etanol, em ambas as temperaturas. Nas fermentações a 34°C a formação de biomassa foi favorecida. A revitalização portanto beneficiou o processo, aumentando o rendimento em etanol, porém o longo tempo de armazenamento pode ter prejudicado o desempenho ao longo dos ciclos, observado por uma curva descendente de viabilidade etanol produzido, principalmente a 34°C.

A curva de revitalização em meio MR2 apresentou maiores aumentos em biomassa e trealose final. O glicerol interno apresentou um pico em 2-3h como resultado da exposição ao estresse osmótico do meio, seguido de uma queda acompanhada pelo aumento de glicerol externo (estresse hiposmótico). Os teores de proteína não apresentaram diferença aparente nos diferentes tratamentos, permanecendo constantes.

D) Tratamento ácido do fermento

O tratamento com ácido sulfúrico não acarretou em perdas de biomassa e viabilidade sobre as duas leveduras nem diferenças nos três tipos de tratamento. Porém observou-se redução no crescimento (cultivabilidade) da levedura PE-2 de 51% em meio YPD e de 57% em meio WLN. Isso não foi observado para a levedura IQAr/45-2, apenas uma sensibilidade ao corante verde de bromocresol com redução no crescimento de 31,5% comparado ao meio YPD. O plaqueamento em meio WLN ainda revelou uma diferença nos fenótipos das duas leveduras estudadas. Apesar de não apresentar prejuízo à linhagem IQAr/45-2, o tratamento ácido teria que ser testado ao longo dos ciclos sucessivos de fermentação juntamente com a revitalização das células, de forma a verificar seu efeito a longo prazo.

E) Tolerância à acidez láctica e acética

O limite de tolerância da levedura IQAr/45-2 quanto a acidez láctica (CIM $\geq$ 3%, p/v) pareceu ser beneficiado quando adicionou-se sais e LC ao melaço 10% (ART) solidificado com agar. O limite de acidez acética não pareceu ser beneficiado pela adição de sais ou LC (CIM $\geq$ 0,4 % p/v).

Referências

REFERÊNCIAS

- ABERNATHY, D. G.; SPEDDING, G.; STARCHER, B. Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay. **J. Inst. Brew.**, v. 115, p. 122-127, 2009.
- ALBERS, E. et al. Influences of the nitrogen sources on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3181-3195, 1996.
- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Sci. Agric.**, v. 54, n. 3, p. 189-194, 1997.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.
- ATTFIELD, P. V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **Febs Lett.**, v. 225, n. 1/2, p. 259-263, 1987.
- ATTFIELD, P. V. et al. Heterogeneity of stress gene expression and stress resistance among individual cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molec. Microbiol.**, v. 40, p. 1000-1008, 2001.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Appl. Energ.**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL E CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Disponível em: <http://www.cgee.org.br/arquivos/bioetanol_port.pdf?idProduto=4809>. Acesso em: 10 ago. 2012.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011. Cap. 5, p. 85-100.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 26, p. 678-687, 2000.
- BREJNING, J.; JESPERSEN, L. Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 75, p. 27-38, 2002.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 50, p. 1-17, 1999.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras contaminantes no processo de fermentação alcoólica na usina Santa Elisa. **STAB: Aç. Álcool Subprod.**, v. 17, p. 48-50, 1999.

CARRASCO, P.; QUEROL, A.; DEL OLMO, M. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Arch. Microbiol.**, v. 175, p. 450-457, 2001.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. 178 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G. G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **J. Ind. Microbiol.**, v. 7, p. 191-196, 1991.

D'AMORE, T. et al. A study of ethanol tolerance in yeast. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 9, p. 247-304, 1990.

DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 85, p. 253-263, 2009.

DORTA, C. O. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

EARNEST, C.; SNYDER, C.; WESTRA, S. Fermentation management. In: INGLEDEW, W. M., et al. **The Alcohol textbook**. 5th. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. Cap. 19, p. 281-282.

EASTMOND, P. J.; LI, Y.; GRAHAM, I. A. Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? **J. Exp. Bot.**, v. 54, p. 533-537, 2003.

ELBEIN, A. D. et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology**, v. 13, p. 17-27, 2003.

ELEUTHERIO, E. C. A.; ARAUJO, P. S.; PANEK, A. D. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1156, p. 263-266, 1993.

ENZO LIFE SCIENCES INC. **Heat shock proteins & the cellular stress response**. Disponível em: <http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/catalog/zz-c0210-1002_hsp_us_lowres.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2012.

ERDEI, E. et al. Trehalose overproduction affects the stress tolerance of *Kluyveromyces marxianus* ambiguously. **Biores.Technol.**, v. 102, p. 7232-7235, 2011.

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

GABIER, A. C. et al. Intracellular physiological events of yeast *Rhodotorula glutinis* during storage at +4 °C. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 105, p. 97-109, 2005.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – revisão. **STAB: Aç. Álcool Subprod.**, v. 9, p. 35-40, 1991.

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

GARCIA, D. B. **Danos causados por *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) na qualidade da cana e processo fermentativo.** 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

GARDNER, N.; RODRIGUE, N.; CHAMPAGNE, C. P. Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on the production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2022-2028, 1993.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnol. Biofuels**, v. 1, p. 1-6, 2008.

HAMPSEY, M. A. Review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 13, p. 1099-1133, 1997.

HAZELWOOD, L. A. et al. Identity of the growth-limiting nutrient strongly affects storage carbohydrate accumulation in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 6876-6885, 2009.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, cap. 6, p. 93-122.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress response**. 5th. ed. Austin: R.G. Landes, 1997. 389 p.

HOLYOAK, C. D. et al. Activity of the plasma membrane H1-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3158-3164, 1996.

IMAI, T.; OHNO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 3604-3608, 1995.

INGLEDEW, W. M. et al. **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. 552 p.

JONES, A. M.; INGLEDEW, W. M. Fermentation of very high gravity wheat mash prepared using fresh yeast autolysate. **Biores. Technol.**, v. 50, p. 97-101, 1994.

JORGENSEN, H. et al. Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 310-317, 2002.

KAYINGO, G.; KILIAN, S. G.; PRIOR, B. A. Conservation and release of osmolytes by yeasts during hypo-osmotic stress. **Arch. Microbiol.**, v. 177, p. 29-35, 2001.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. D.; COX M. M. Carboidratos e glicoconjugados. In: _____. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. Cap. 9, p. 232.

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

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-39.

LOGOTHETIS, S.; WALKER, G.; NERANTZIS, E. T. Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability. **Proc. Nat. Sci.**, v. 113, p. 271-284, 2007.

MAHMUD, S. A.; HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 109, p. 262-266, 2010.

MAHMUD, S. A. et al. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 28, p. 17-30, 2009.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 25, p. 103-121, 1983.

MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24 p. 532-535, 2004.

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

MUKHTAR, K. et al. Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. **J. Biomed. Biotech.**, v. 2010, 2010. DOI: 101155/2010/419586.

MURTAGH, T. E. Molasses as a feedstock for alcohol production. In: INGLEDEW, W. M., et al. **The Alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 1999. Cap. 19, p. 281-282.

NARENDRANATH, N.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 2239-2243, 2005.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 59, p. 187-194, 2001.

NORDSTRÖM, K. Yeast growth and glycerol formation. **Acta Chem. Scand.**, v. 20, p. 1016-1025, 1966.

OUGH, C. S.; FONG, D.; AMERINE, M. A. Glycerol in wine: determination and some factors affecting. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 23, p. 1-5, 1972.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour. Technol.**, v. 74, p. 25-33, 2000.

PARAZZI JUNIOR, O. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PELCZAR, M. J. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997. 524 p.

PIGEAU, G. M.; INGLIS, D. L. Upregulation of ALD3 and GPDI in *Saccharomyces cerevisiae* during ice wine fermentation. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, p. 112-125, 2005.

PULZATTO, M. E. **Fatores que influem na obtenção de biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces cerevisiae*) na fermentação alcoólica**. 2000. 112 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2nd. ed. West Sussex: Wiley, 2000. 512 p.

ROBYT, J. F.; WHITE, B. J. **Biochemical techniques: theory and practice**. Michigan: Waveland, 1987. 407 p.

ROTH, R. Carbohydrate accumulation during the sporulation of yeast. **J. Bacteriol.**, v. 101, p. 53-57, 1970.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p.

SEBOLLELA, A. et al. Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress. **Int. J. Biochem. Cell. B.**, v. 36, p. 900-908, 2004.

SQUAREZI, C. et al. Inulase production by agro-industrial residues: optimization of pretreatment of substrates and production medium. **Food Bioprocess Technol.**, v. 2, p. 409-414, 2009.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. In: GUTHRIE, G.; FINK, G. R. (Ed.). **Methods enzymology**. New York: Academic Press, 1991. v. 194, p. 21-37.

SILVA, J. A. et al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1073-1077, 2008.

SILVA, L. A. F. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 215 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STEHLIK-TOMAS, V. et al. Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *S. cerevisiae*. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 42, p. 115-120, 2004.

TORIJA, M. J. et al. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 80, p. 47-53, 2002.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Dados e cotações-estatísticas**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

WALKER, G. W. **Yeast physiology and biotechnology**. London: John Wiley & Sons, 1998. 350 p.

WANG, Z. X. et al. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, p. 201-223, 2001.

WARD, O. P.; SINGH, A. Bioethanol technology: developments and perspectives. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 51, p. 53-80, 2002.

WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p. 482-487, 1999.

YEMM, E.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochem. J.**, v. 57, p. 508-514, 1954.

ZHANG, Z. Batch fermentation and fermentor design. In: INGLEDEW, W. M. et al. **The alcohol textbook**. 5th. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. Cap. 17, p. 246-247.

ZHAO, X. Q.; BAI, F.W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **J. Biotech.**, v. 144, p. 23-30, 2009.

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

Apêndice

APÊNDICE – Curvas de calibração

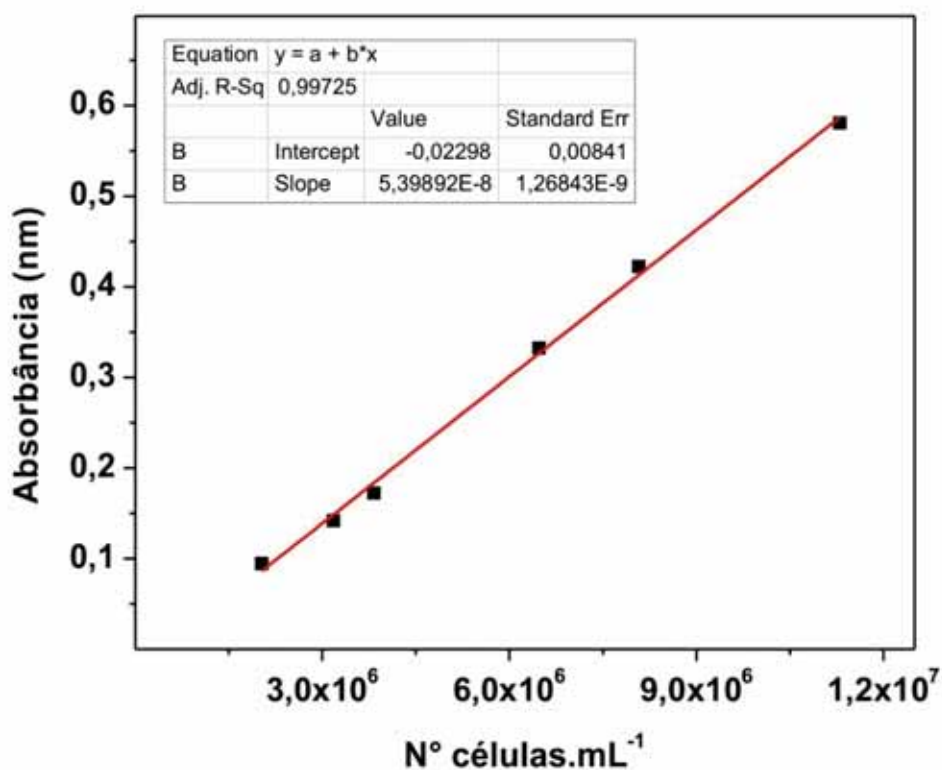


Figura 1 – Curva padrão de calibração correlacionando número de células com a absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b = 5,39 \times 10^{-8}$, intercepto da reta $a = -0,023$ e fator de correlação ($R^2 = 0,997$) para o espectrofotômetro Biospectro modelo SP-22.

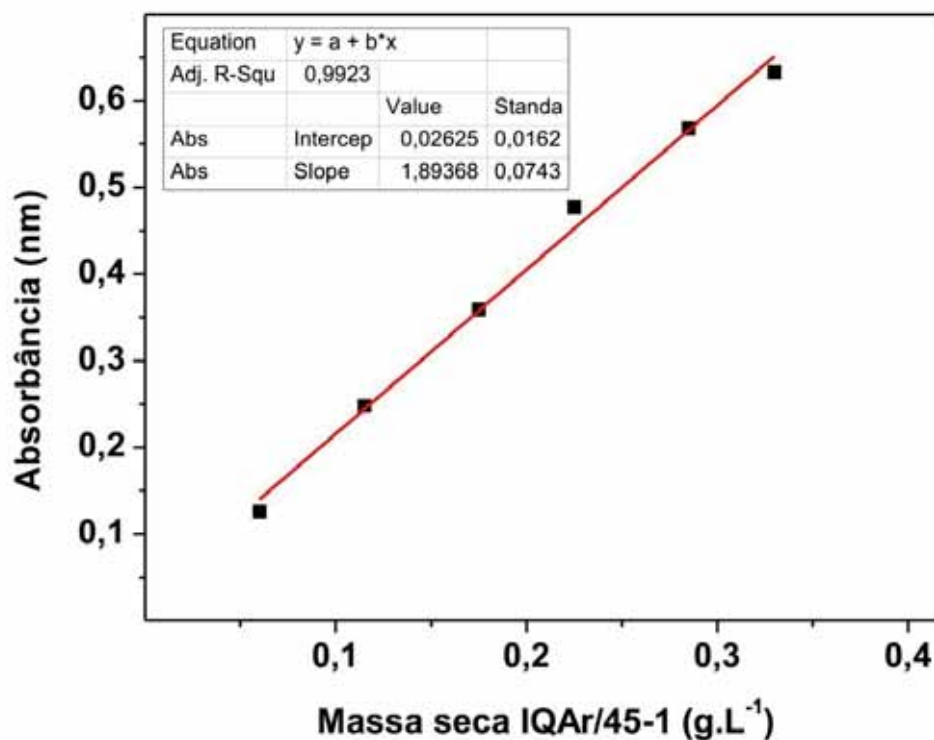


Figura 2 – Curva padrão de calibração correlacionando massa seca da levedura IQAr/45-2 com a absorbância. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=1,893$, intercepto da reta $a=0,026$ e fator de correlação ($R^2=0,992$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

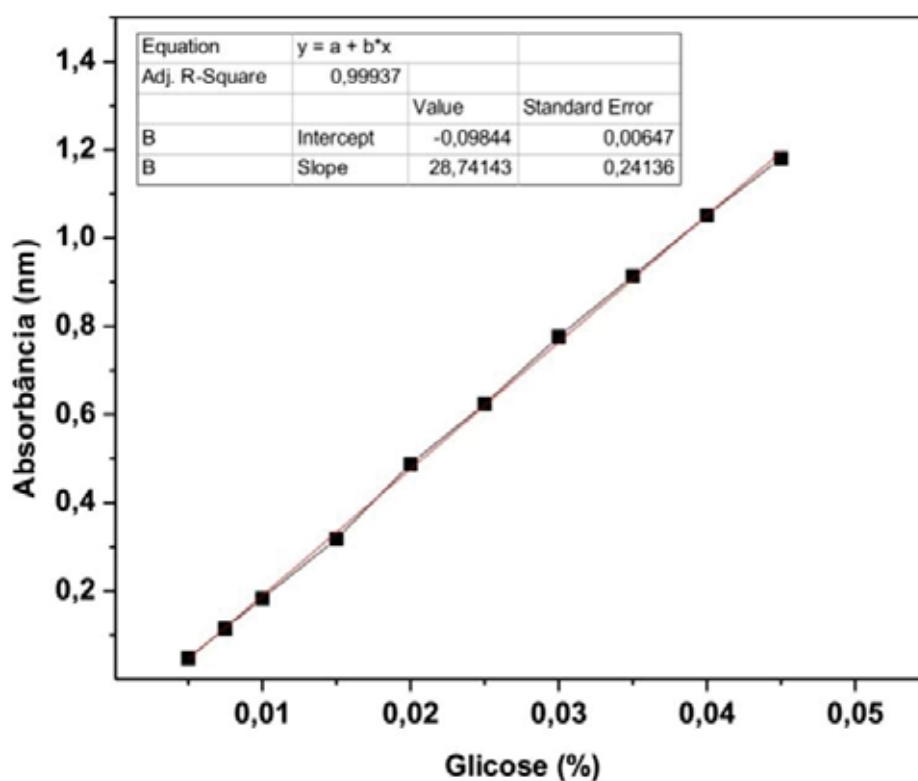


Figura 3 – Curva padrão de calibração de glicose (%m/v) para dosagens de açúcares redutores totais pelo método DNS (MILLER, 1959). A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=28,74$, intercepto da reta $a=-0,098$ e fator de correlação ($R^2=0,999$) para o espectrofotômetro Biospectro modelo SP-22.

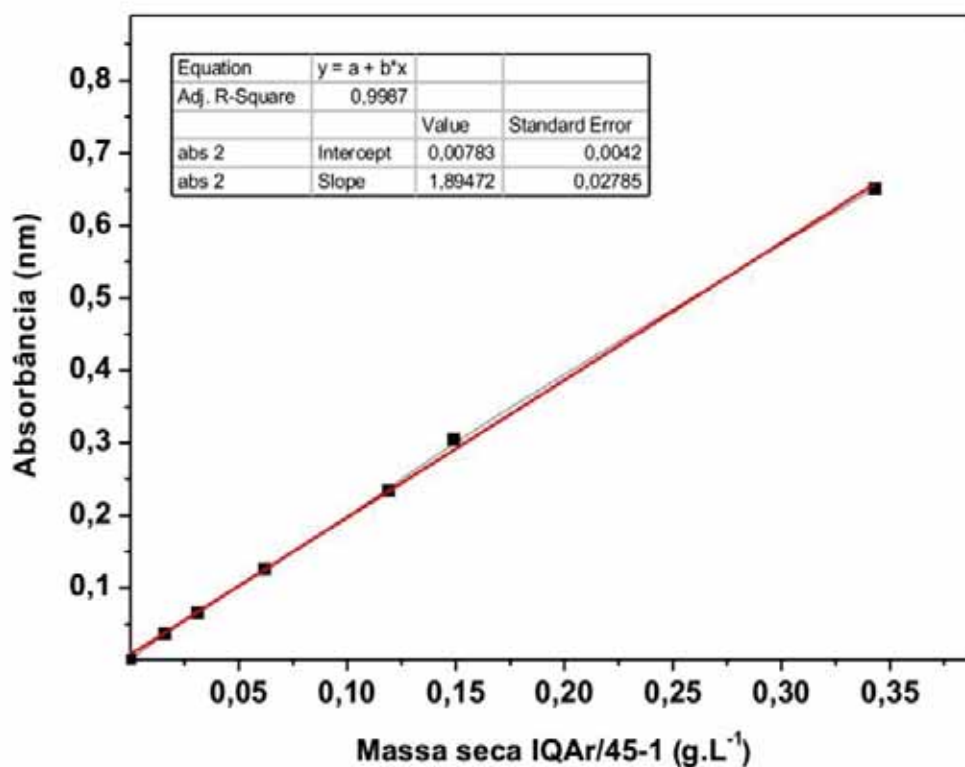


Figura 4 – Curva de calibração para análise de biomassa da linhagem IQAr/45-2 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=1,895$, fator de correlação $R^2=0,999$ e coeficiente linear $a = 0,0078$ para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

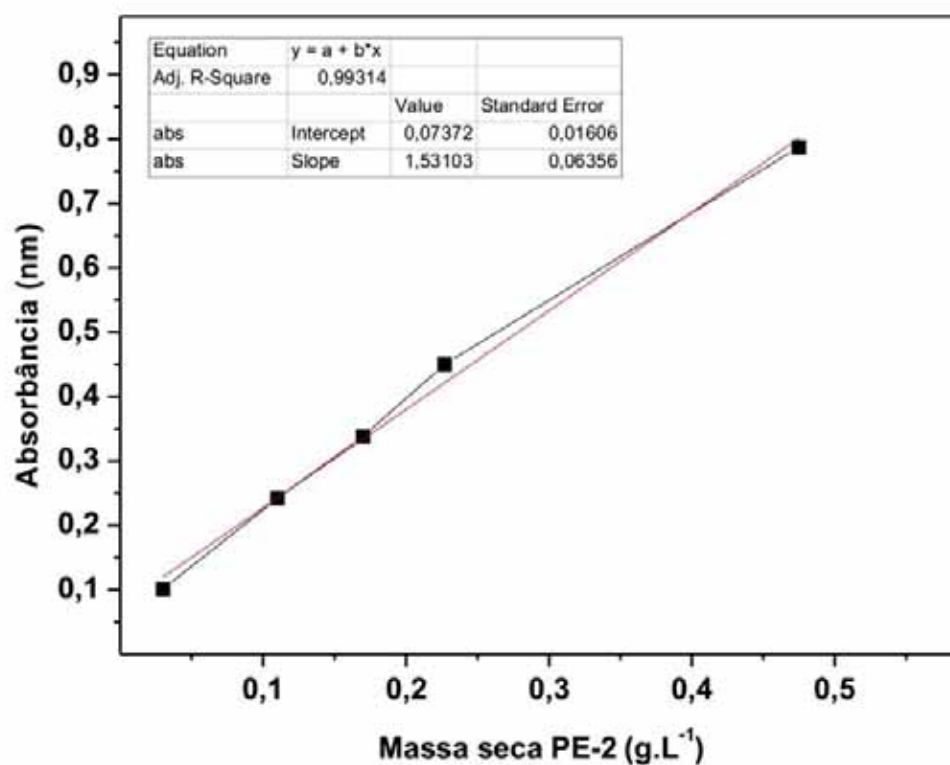


Figura 5 – Curva de calibração para análise de biomassa da linhagem PE-2 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=1,531$, fator de correlação $R^2=0,993$ e coeficiente linear $a = 0,073$ para o espectrofotômetro Biospectro modelo SP-22.

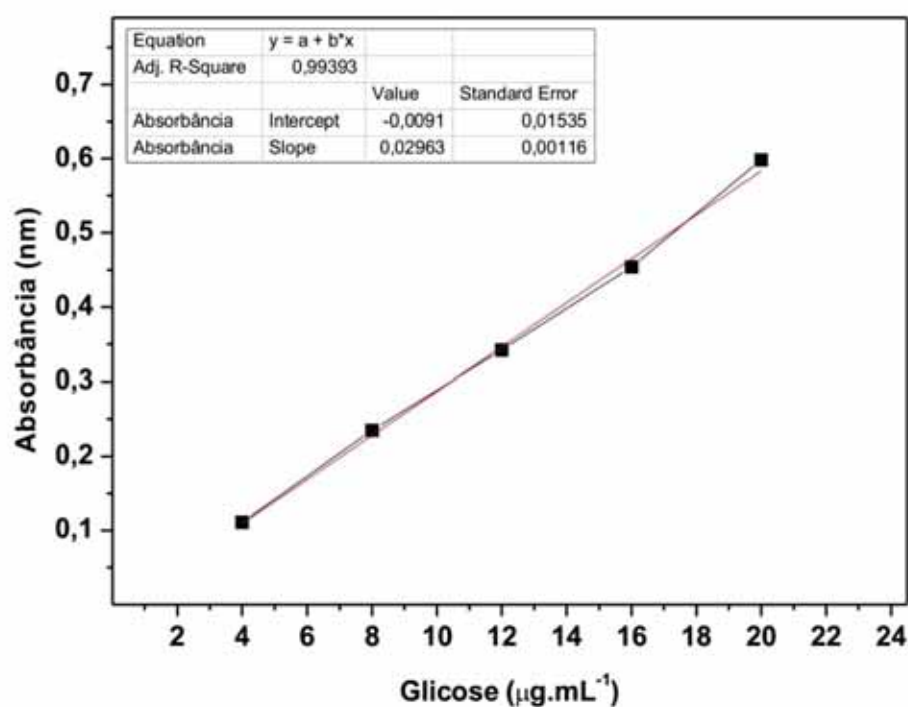


Figura 6 – Curva padrão de calibração de glicose $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para dosagens de trealose pelo método da antrona. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=0,030$, intercepto da reta $a=-0,009$ e fator de correlação ($R^2=0,994$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

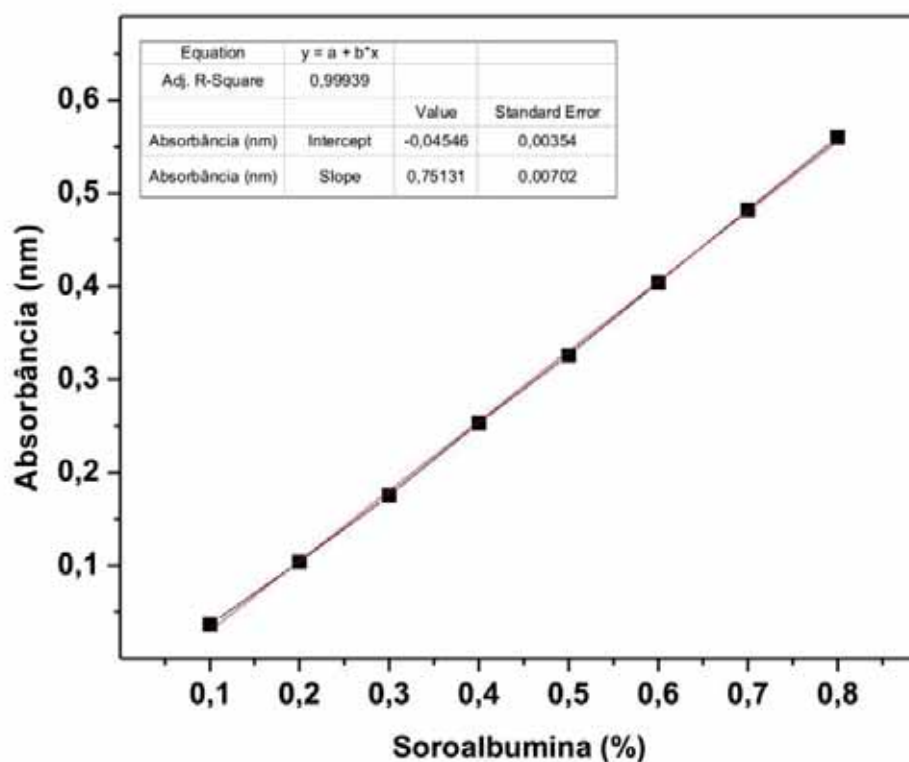


Figura 7 – Curva padrão de calibração de soroalbumina 1% (m/v) para dosagens de proteínas totais feitas pelo método do reagente de Biureto. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=0,751$, intercepto da reta $a=-0,045$ e fator de correlação ($R^2=0,999$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

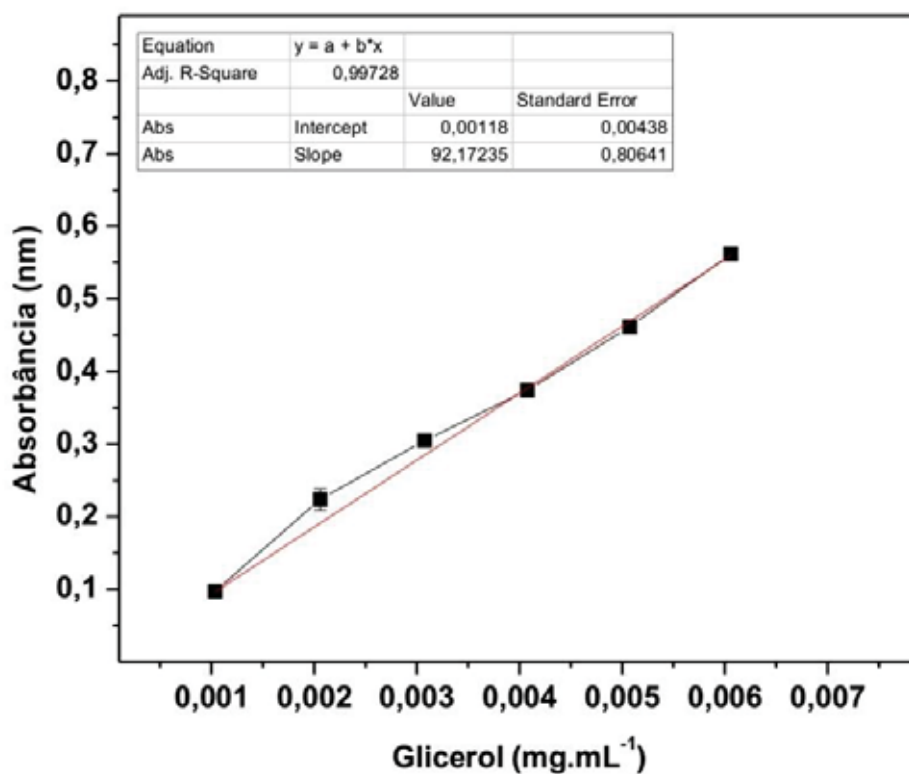


Figura 8 – Curva padrão de calibração de glicerol 0,208 mg.mL⁻¹ para dosagens de glicerol através de kit enzimático. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=92,17$, intercepto da reta $a=-0,001$ e fator de correlação ($R^2=0,997$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

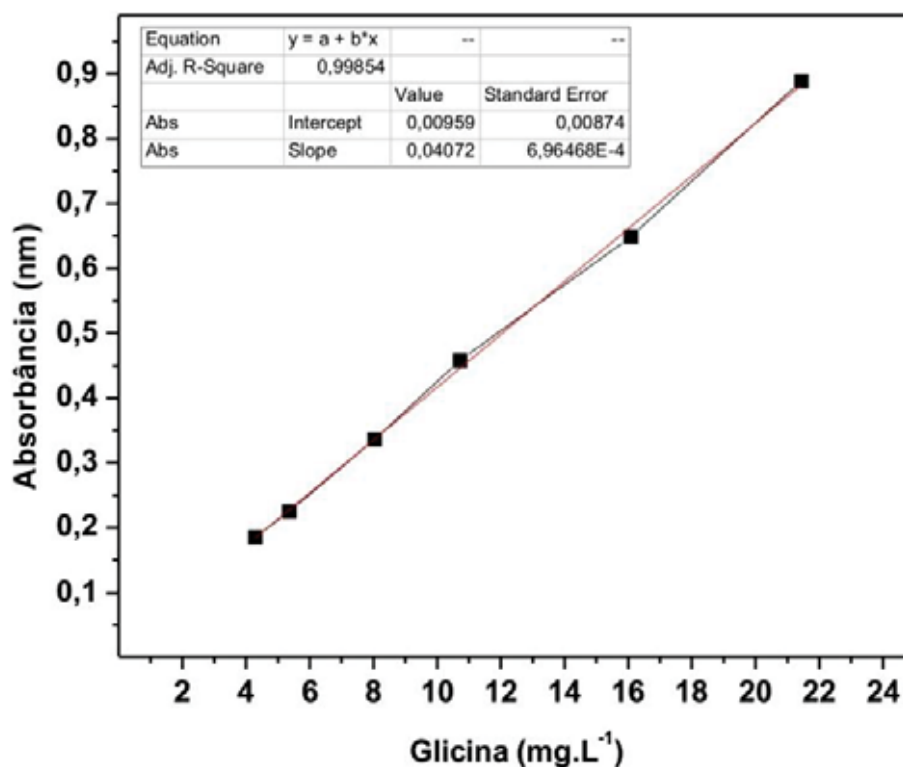


Figura 9 – Curva padrão de calibração de glicina 1072 mg.L⁻¹ para dosagens de amino nitrogênio livre feitas pelo método da ninidrina. A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular b=0,040, intercepto da reta a=-0,009 e fator de correlação ($R^2=0,998$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

APÊNDICE B – Tabelas referentes às figuras do texto (dados originais)

Tabela 1 – Curva de propagação em melão 5% (Figura 8 do texto)

Tempo (h)	Controle	Biomassa (g.L ⁻¹)							
		Extrato de levedura (g.L ⁻¹)				LC (g.L ⁻¹)			
		3,0	5,0	10	20	0,3	0,5	1	2
0	0,91 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,90 ± 0,03	0,91 ± 0,00	0,89 ± 0,00	0,92 ± 0,01	0,92 ± 0,07	0,94 ± 0,03	0,88 ± 0,00
2	1,07 ± 0,06	1,31 ± 0,01	1,37 ± 0,04	1,43 ± 0,00	1,41 ± 0,02	1,38 ± 0,01	1,43 ± 0,02	1,45 ± 0,00	1,38 ± 0,03
4	1,16 ± 0,01	2,74 ± 0,02	3,17 ± 0,13	3,12 ± 0,07	3,13 ± 0,05	2,20 ± 0,00	2,69 ± 0,09	3,38 ± 0,03	3,17 ± 0,01
6	1,25 ± 0,00	3,17 ± 0,01	4,46 ± 0,09	4,73 ± 0,27	4,47 ± 0,04	2,37 ± 0,05	2,86 ± 0,17	4,63 ± 0,04	5,02 ± 0,00
8	1,25 ± 0,04	3,41 ± 0,00	4,92 ± 0,00	5,58 ± 0,00	5,18 ± 0,12	2,42 ± 0,17	3,38 ± 0,00	4,91 ± 0,01	5,04 ± 0,09
10	1,33 ± 0,00	3,60 ± 0,01	4,97 ± 0,01	5,46 ± 0,05	5,31 ± 0,03	2,68 ± 0,00	3,61 ± 0,01	4,94 ± 0,01	5,28 ± 0,07
12	1,33 ± 0,01	3,58 ± 0,02	4,76 ± 0,01	5,37 ± 0,03	5,24 ± 0,01	2,70 ± 0,02	3,58 ± 0,02	4,85 ± 0,02	5,19 ± 0,07

Tabela 2 – Curva de propagação em melão 5% (Figura 8 do texto)

Tempo (h)	Biomassa (g.L ⁻¹)			
	Ácido glutâmico (g.L ⁻¹)		Sais (g.L ⁻¹)	
	0,05	0,1	2,5	5,0
0	1,01 ± 0,00	0,99 ± 0,02	1,09 ± 0,01	1,09 ± 0,00
2	1,29 ± 0,02	1,29 ± 0,01	1,33 ± 0,02	1,34 ± 0,02
4	1,47 ± 0,01	1,48 ± 0,02	1,58 ± 0,02	1,58 ± 0,01
6	1,58 ± 0,01	1,58 ± 0,00	1,66 ± 0,01	1,68 ± 0,00
8	1,65 ± 0,02	1,67 ± 0,01	1,79 ± 0,01	1,77 ± 0,01
10	1,66 ± 0,01	1,67 ± 0,00	1,79 ± 0,01	1,78 ± 0,00
12	1,65 ± 0,02	1,67 ± 0,01	1,79 ± 0,01	1,77 ± 0,01

Tabela 3 – Curva de propagação em melaço 5% usando LC bruto e centrifugado (Figura 9 do texto)

Tempo (h)	Número de células (cél.mL ⁻¹ x 10 ⁸)				
	Controle	LC (1 g.L ⁻¹)		LC (2 g.L ⁻¹)	
		Bruto	Centrifugado	Bruto	Centrifugado
0	0,32 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,36 ± 0,06	0,31 ± 0,08
2	0,52 ± 0,00	0,60 ± 0,00	0,81 ± 0,05	0,82 ± 0,17	0,81 ± 0,08
4	0,67 ± 0,28	1,45 ± 0,21	1,13 ± 0,10	1,57 ± 0,25	1,91 ± 0,17
6	0,55 ± 0,03	1,21 ± 0,05	1,13 ± 0,01	2,47 ± 0,10	1,93 ± 0,28
8	0,73 ± 0,07	1,36 ± 0,03	1,24 ± 0,14	2,47 ± 0,10	2,09 ± 0,04

Tabela 4 – Curva de propagação em melaço 5% usando LC bruto e centrifugado (Figura 9 do texto)

Tempo (h)	Biomassa (g.L ⁻¹)				
	Controle	LC (1 g.L ⁻¹)		LC (2 g.L ⁻¹)	
		Bruto	Centrifugado	Bruto	Centrifugado
0	0,87 ± 0,00	1,11 ± 0,04	1,19 ± 0,08	0,99 ± 0,16	0,86 ± 0,24
2	1,46 ± 0,00	1,67 ± 0,00	2,28 ± 0,15	2,32 ± 0,49	2,27 ± 0,22
4	1,88 ± 0,80	4,09 ± 0,60	3,20 ± 0,27	4,46 ± 0,72	5,43 ± 0,47
6	1,53 ± 0,08	3,42 ± 0,13	3,20 ± 0,03	6,81 ± 0,01	5,47 ± 0,80
8	2,04 ± 0,20	3,85 ± 0,08	3,52 ± 0,39	6,79 ± 0,02	5,92 ± 0,10

Tabela 5 – Primeira etapa da Propagação 2 (Figura 10 do texto)

Tempo (h)	Biomassa (g.L ⁻¹)					
	IQAr/45-2		PE-2		IQAr/45-2 (LC 1 g.L ⁻¹)	
	34°C	37°C	34°C	37°C	34°C	37°C
0	0,82 ± 0,00	0,79 ± 0,00	0,93 ± 0,01	0,93 ± 0,01	0,80 ± 0,00	0,80 ± 0,06
2	1,19 ± 0,00	1,17 ± 0,01	1,45 ± 0,00	1,57 ± 0,00	1,40 ± 0,01	1,49 ± 0,01
4	1,35 ± 0,00	1,32 ± 0,02	2,87 ± 0,02	2,76 ± 0,02	2,89 ± 0,00	3,01 ± 0,00
6	1,47 ± 0,01	1,43 ± 0,05	4,69 ± 0,04	4,27 ± 0,06	4,70 ± 0,06	4,57 ± 0,02
8	1,56 ± 0,00	1,48 ± 0,02	5,95 ± 0,23	5,65 ± 0,03	5,40 ± 0,01	5,28 ± 0,01
9	1,58 ± 0,00	1,55 ± 0,00	6,95 ± 0,02	5,81 ± 0,37	5,81 ± 0,37	5,51 ± 0,03

Tabela 6 – Fermentação única para padronização do tempo de fermentação (Figura 11 do texto)

Tempo (h)	Etanol (g.L ⁻¹)		ART (%)	
	34°C	37°C	34°C	37°C
0	3,90 ± 0,30	5,70 ± 0,50	0,10 ± 0,00	0,30 ± 0,10
1	32,50 ± 1,10	32,90 ± 1,00	5,70 ± 0,80	8,30 ± 1,00
2	43,60 ± 0,90	48,50 ± 1,20	9,90 ± 1,00	12,40 ± 0,10
3	48,38 ± 0,10	50,74 ± 2,10	9,80 ± 0,10	10,90 ± 0,30
4	57,80 ± 0,60	62,40 ± 0,60	5,10 ± 0,50	6,50 ± 1,00
5	67,80 ± 0,60	73,40 ± 0,00	2,80 ± 0,60	4,40 ± 0,80
6	72,00 ± 4,50	78,30 ± 2,50	2,00 ± 0,50	2,35 ± 0,50
7	73,20 ± 2,00	76,25 ± 2,60	1,90 ± 0,60	2,30 ± 0,50
8	72,20 ± 3,60	77,17 ± 0,00	1,90 ± 0,70	2,10 ± 0,50

Tabela 7 – Fermentações a 34°C com revitalização em meio MR1 (Figuras 12 e 13 do texto)

Ciclos	Fermentações a 34°C com revitalização em meio MR1					
	Biomassa (g.L ⁻¹)		Viabilidade (%)		Etanol produzido (g.L ⁻¹)	ART residual (%)
	Inicial	Final	Inicial	Final		
1	23,88 ± 0,56	34,78 ± 1,96	98,97 ± 0,00	95,47 ± 0,03	97,20 ± 3,01	0,93 ± 0,02
2	25,62 ± 0,19	39,01 ± 0,84	95,57 ± 0,00	98,37 ± 0,01	91,11 ± 4,11	1,26 ± 0,04
3	25,50 ± 1,49	39,93 ± 0,65	92,58 ± 0,01	86,12 ± 0,04	90,92 ± 1,23	1,23 ± 0,01
4	26,10 ± 0,93	38,81 ± 0,75	85,32 ± 0,01	82,08 ± 0,02	85,41 ± 3,09	2,51 ± 0,10
5	28,04 ± 0,75	39,07 ± 1,12	84,53 ± 0,07	81,28 ± 0,02	86,28 ± 0,21	2,23 ± 0,03
6	23,96 ± 2,43	36,50 ± 0,65	81,83 ± 0,01	81,94 ± 0,04	79,97 ± 0,46	4,13 ± 0,13
7	24,43 ± 0,56	38,41 ± 0,37	85,67 ± 0,04	79,63 ± 0,00	79,52 ± 1,38	2,74 ± 0,05
8	23,64 ± 3,04	35,77 ± 0,19	83,12 ± 0,00	86,80 ± 0,04	76,53 ± 1,44	5,22 ± 0,10
9	23,44 ± 0,75	35,38 ± 2,24	83,38 ± 0,01	88,39 ± 0,01	83,82 ± 0,22	3,05 ± 0,04
10	23,84 ± 0,37	37,55 ± 0,28	89,67 ± 0,00	89,16 ± 0,06	79,75 ± 4,61	2,12 ± 0,01

Tabela 8 – Fermentações a 34°C com revitalização em meio MR2 (Figuras 12 e 13 do texto)

Ciclos	Fermentações a 34°C com revitalização em meio MR2						
	Biomassa (g.L ⁻¹)		Viabilidade (%)		Etanol produzido (g.L ⁻¹)	ART residual (%)	
	Inicial	Final	Inicial	Final			
1	24,24 ± 0,75	30,10 ± 3,67	98,97 ± 0,00	95,30 ± 0,02	96,42 ± 1,61	0,93 ± 0,01	
2	24,43 ± 1,68	37,16 ± 1,40	96,80 ± 0,03	91,56 ± 0,01	90,90 ± 1,20	0,87 ± 0,01	
3	26,14 ± 3,11	38,21 ± 0,28	90,46 ± 0,02	89,67 ± 0,06	89,99 ± 1,14	1,14 ± 0,00	
4	24,27 ± 3,55	39,01 ± 0,09	87,91 ± 0,02	84,63 ± 0,01	91,07 ± 4,52	2,00 ± 0,01	
5	27,60 ± 0,93	37,95 ± 1,03	88,42 ± 0,01	85,29 ± 0,04	85,38 ± 0,84	1,91 ± 0,01	
6	23,44 ± 0,00	35,11 ± 0,19	85,86 ± 0,01	87,13 ± 0,02	81,36 ± 0,25	3,81 ± 0,02	
7	24,24 ± 0,75	34,58 ± 0,75	86,56 ± 0,01	84,94 ± 0,02	83,41 ± 0,94	1,88 ± 0,01	
8	23,32 ± 2,43	34,58 ± 0,19	88,04 ± 0,01	81,05 ± 0,02	81,77 ± 2,66	3,59 ± 0,04	
9	23,92 ± 1,87	36,89 ± 0,28	87,86 ± 0,03	86,30 ± 0,04	83,68 ± 3,21	2,52 ± 0,00	
10	23,32 ± 3,41	37,03 ± 1,40	89,31 ± 0,04	88,40 ± 0,02	84,70 ± 0,78	1,67 ± 0,01	

Tabela 9 – Fermentações a 34°C com armazenamento em água destilada (Figuras 12 e 13 do texto)

Ciclos	Fermentações a 34°C com armazenamento em água destilada					
	Biomassa (g.L ⁻¹)		Viabilidade (%)		Etanol produzido (g.L ⁻¹)	ART residual (%)
	Inicial	Final	Inicial	Final		
1	23,66 ± 0,69	35,01 ± 0,39	98,97 ± 0,00	95,11 ± 0,03	99,25 ± 3,91	1,01 ± 0,07
2	26,49 ± 3,14	35,38 ± 2,59	94,39 ± 0,01	91,66 ± 0,00	87,06 ± 2,89	2,20 ± 0,07
3	26,39 ± 3,08	35,48 ± 0,98	89,28 ± 0,00	85,10 ± 0,04	84,60 ± 1,51	2,82 ± 0,31
4	25,44 ± 3,49	37,03 ± 0,61	78,77 ± 0,06	86,80 ± 0,03	77,82 ± 1,34	3,85 ± 0,01
5	28,51 ± 2,28	36,40 ± 2,20	74,72 ± 0,04	73,37 ± 0,05	78,08 ± 0,36	3,58 ± 0,49
6	26,16 ± 2,18	37,03 ± 0,60	71,38 ± 0,00	73,63 ± 0,06	76,93 ± 1,33	4,86 ± 0,01
7	24,04 ± 1,44	35,64 ± 2,21	68,06 ± 0,02	72,06 ± 0,01	76,53 ± 1,44	4,79 ± 0,43
8	24,49 ± 2,79	36,07 ± 1,83	76,57 ± 0,01	72,42 ± 0,07	70,82 ± 0,54	6,33 ± 0,73
9	24,08 ± 1,84	38,02 ± 0,88	81,27 ± 0,03	86,91 ± 0,01	79,93 ± 1,08	4,66 ± 0,79
10	23,84 ± 3,07	36,00 ± 0,66	87,99 ± 0,02	86,88 ± 0,02	74,26 ± 1,98	4,71 ± 0,03

Tabela 10 – Fermentações a 37°C com revitalização em meio MR1 (Figura 14 e 15 do texto)

Ciclos	Fermentações a 37°C com revitalização em meio MR1						
	Biomassa (g.L ⁻¹)		Viabilidade (%)		Etanol produzido (g.L ⁻¹)	ART residual (%)	
	Inicial	Final	Inicial	Final			
1	21,85 ± 0,59	30,29 ± 1,68	97,70 ± 0,55	93,51 ± 1,75	84,26 ± 3,63	2,12 ± 0,22	
2	22,51 ± 0,36	35,11 ± 0,56	91,84 ± 3,03	91,80 ± 0,80	78,29 ± 3,79	3,05 ± 0,51	
3	24,87 ± 0,84	33,03 ± 0,89	89,47 ± 2,30	85,79 ± 0,63	80,05 ± 2,02	3,37 ± 0,26	
4	26,45 ± 0,39	29,90 ± 0,28	81,41 ± 1,11	83,23 ± 1,82	73,64 ± 5,49	5,34 ± 0,34	
5	23,19 ± 0,53	34,06 ± 2,05	78,44 ± 2,28	83,65 ± 1,43	79,27 ± 1,09	3,77 ± 0,19	
6	24,51 ± 1,01	29,30 ± 2,24	77,15 ± 4,51	84,17 ± 0,51	77,39 ± 1,51	4,96 ± 0,52	
7	25,21 ± 2,66	31,81 ± 2,24	84,63 ± 1,03	79,61 ± 2,08	77,50 ± 4,03	4,70 ± 0,30	
8	25,07 ± 0,17	30,29 ± 0,65	80,70 ± 1,19	78,51 ± 0,61	76,50 ± 1,21	4,71 ± 0,15	

Tabela 11 – Fermentações a 37°C com revitalização em meio MR2 (Figura 14 e 15 do texto)

Fermentações a 37°C com revitalização em meio MR2						
Ciclos	Biomassa (g.L ⁻¹)		Viabilidade (%)		Etanol produzido (g.L ⁻¹)	ART residual (%)
	Inicial	Final	Inicial	Final		
1	23,86 ± 1,62	32,77 ± 1,08	98,03 ± 0,01	95,83 ± 1,00	85,98 ± 1,92	1,58 ± 0,05
2	24,57 ± 2,06	32,70 ± 0,72	97,03 ± 0,01	92,60 ± 1,20	87,74 ± 0,16	0,28 ± 0,02
3	24,89 ± 1,07	33,07 ± 0,95	92,27 ± 0,02	91,67 ± 1,80	82,78 ± 1,13	1,16 ± 0,31
4	24,87 ± 1,22	32,67 ± 0,38	84,81 ± 0,01	82,50 ± 1,30	80,14 ± 1,60	1,24 ± 0,30
5	25,11 ± 0,91	31,61 ± 0,84	83,29 ± 0,01	79,35 ± 1,20	79,03 ± 2,44	2,41 ± 0,36
6	23,28 ± 0,30	31,28 ± 0,46	84,26 ± 0,00	83,61 ± 1,30	81,12 ± 2,40	2,37 ± 0,43
7	24,12 ± 1,89	35,51 ± 0,30	82,49 ± 0,02	80,83 ± 1,00	80,10 ± 0,22	2,41 ± 0,07
8	25,74 ± 0,30	36,83 ± 0,15	82,17 ± 0,01	81,06 ± 1,50	80,14 ± 0,59	2,19 ± 0,13
9	25,15 ± 1,72	34,85 ± 0,15	85,12 ± 0,02	82,59 ± 1,40	81,23 ± 0,42	2,09 ± 0,40
10	24,79 ± 1,13	31,75 ± 0,08	81,88 ± 0,01	83,04 ± 1,00	83,69 ± 0,06	2,03 ± 0,01

Tabela 12 – Fermentações a 37°C com armazenamento em água (Figura 14 e 15 do texto)

Ciclos	Fermentações a 37°C com armazenamento em água destilada						
	Biomassa (g.L ⁻¹)		Viabilidade (%)		Etanol produzido (g.L ⁻¹)	ART residual (%)	
	Inicial	Final	Inicial	Final			
1	24,06 ± 0,30	32,04 ± 1,65	98,03 ± 0,01	95,16 ± 1,40	91,33 ± 1,92	0,28 ± 0,11	
2	24,75 ± 1,20	33,13 ± 1,64	94,42 ± 0,01	92,90 ± 1,40	79,50 ± 0,85	1,42 ± 0,12	
3	24,61 ± 1,13	31,94 ± 1,53	93,40 ± 0,01	90,07 ± 1,20	83,87 ± 2,73	1,46 ± 0,22	
4	25,30 ± 1,17	30,72 ± 0,79	86,17 ± 0,07	80,63 ± 1,30	81,09 ± 0,60	2,24 ± 0,21	
5	25,46 ± 1,07	32,74 ± 0,34	71,13 ± 0,01	75,87 ± 1,25	73,18 ± 0,05	3,58 ± 0,16	
6	23,64 ± 1,40	33,23 ± 0,54	69,63 ± 0,01	75,51 ± 1,00	66,11 ± 1,72	4,55 ± 0,02	
7	25,01 ± 0,87	34,19 ± 0,55	63,25 ± 0,03	70,63 ± 1,30	62,25 ± 2,29	4,91 ± 0,10	
8	25,25 ± 1,67	35,01 ± 0,90	65,55 ± 0,08	73,67 ± 1,50	66,46 ± 0,93	4,70 ± 0,08	
9	25,58 ± 1,54	35,31 ± 1,47	65,55 ± 0,00	72,07 ± 1,70	68,45 ± 0,09	4,79 ± 0,22	
10	25,21 ± 1,35	32,80 ± 0,35	64,96 ± 0,05	70,05 ± 1,00	68,04 ± 1,15	4,68 ± 0,03	

Tabela 13 – Curva de revitalização nos meio MR1, MR2 e água destilada (Figura 16 do texto)

Tempo (h)	Parâmetros avaliados durante as 16h de revitalização					
	Biomassa (g.L ⁻¹)			Viabilidade (%)		
	MR1	MR2	Água destilada	MR1	MR2	Água destilada
0	25,48 ± 0,56	25,21 ± 0,19	26,07 ± 0,47	90,39 ± 3,67	90,39 ± 3,67	91,41 ± 0,26
2	24,09 ± 0,84	25,61 ± 0,00	24,69 ± 0,09	78,09 ± 3,88	83,37 ± 1,84	86,73 ± 0,22
4	25,94 ± 0,09	27,98 ± 0,19	23,49 ± 0,37	82,64 ± 3,00	85,29 ± 3,67	88,68 ± 0,30
6	27,79 ± 0,09	28,97 ± 0,28	24,01 ± 0,38	78,38 ± 2,50	83,37 ± 1,84	87,00 ± 0,94
8	27,26 ± 1,03	28,84 ± 0,27	24,58 ± 0,47	79,51 ± 3,80	84,45 ± 3,67	85,13 ± 0,22
10	27,19 ± 0,93	28,97 ± 0,28	24,27 ± 0,09	78,42 ± 3,36	82,17 ± 3,88	84,42 ± 3,11
12	27,98 ± 0,75	28,97 ± 0,09	24,27 ± 0,28	77,55 ± 1,21	82,64 ± 3,00	86,20 ± 0,62
14	27,79 ± 0,09	29,04 ± 0,19	24,35 ± 0,37	78,54 ± 2,19	80,00 ± 2,50	82,11 ± 1,10
16	27,65 ± 0,09	29,11 ± 0,28	24,60 ± 0,50	78,39 ± 3,30	79,71 ± 3,80	81,75 ± 0,22

Tabela 14 – Curva de revitalização nos meio MR1, MR2 e água destilada (Figura 17 do texto)

Tempo (h)	Parâmetros avaliados durante as 16h de revitalização					
	Trealose (µg.mg ⁻¹ _{células})			Proteína total (µg.mg ⁻¹ x 10 ²)		
	MR1	MR2	Água destilada	MR1	MR2	Água destilada
0	75,50 ± 3,55	74,40 ± 0,65	85,00 ± 7,16	273,71 ± 4,70	290,85 ± 9,26	285,00 ± 9,33
2	13,80 ± 0,27	25,12 ± 0,91	11,57 ± 4,83	257,69 ± 0,78	291,11 ± 3,09	281,56 ± 0,00
4	15,79 ± 0,58	17,44 ± 4,10	15,50 ± 0,84	252,82 ± 0,78	294,69 ± 6,18	283,16 ± 6,18
6	16,02 ± 1,48	21,77 ± 4,56	16,44 ± 0,11	260,07 ± 6,27	275,59 ± 6,15	272,33 ± 9,26
8	15,31 ± 1,86	23,12 ± 3,97	11,57 ± 4,81	251,95 ± 0,78	286,34 ± 6,10	269,19 ± 3,09
10	18,94 ± 0,95	19,44 ± 1,30	16,02 ± 1,48	248,12 ± 1,90	270,82 ± 9,20	279,29 ± 0,00
12	17,20 ± 0,48	23,46 ± 2,78	11,57 ± 4,83	256,65 ± 2,35	279,17 ± 3,09	269,60 ± 1,90
14	13,26 ± 0,13	18,76 ± 1,31	16,02 ± 1,44	258,22 ± 0,00	286,34 ± 9,23	272,08 ± 2,35
16	13,26 ± 0,40	17,78 ± 2,80	11,57 ± 4,82	259,09 ± 1,57	277,98 ± 3,06	271,46 ± 0,00

Tabela 15 – Curva de revitalização nos meio MR1, MR2 e água destilada (Figura 18 do texto)

Tempo (h)	Parâmetros avaliados durante as 16h de revitalização					
	Glicerol interno ($\mu\text{g.mg}^{-1}_{\text{células}}$)			Glicerol externo (mg.mL^{-1})		
	MR1	MR2	Água destilada	MR1	MR2	Água destilada
0	2,36 $\pm$ 0,03	2,50 $\pm$ 0,13	4,13 $\pm$ 0,70	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,92 $\pm$ 0,00
2	6,10 $\pm$ 0,11	7,45 $\pm$ 0,43	1,27 $\pm$ 0,04	55,27 $\pm$ 0,00	53,81 $\pm$ 0,02	1,56 $\pm$ 0,00
4	6,08 $\pm$ 0,04	3,33 $\pm$ 0,08	1,93 $\pm$ 0,06	60,97 $\pm$ 1,17	69,24 $\pm$ 0,02	1,98 $\pm$ 0,00
6	4,03 $\pm$ 0,02	3,20 $\pm$ 0,10	1,88 $\pm$ 0,01	63,50 $\pm$ 1,32	71,07 $\pm$ 0,01	1,77 $\pm$ 0,00
8	2,87 $\pm$ 0,02	2,96 $\pm$ 0,20	1,52 $\pm$ 0,04	62,55 $\pm$ 0,39	70,27 $\pm$ 0,02	2,20 $\pm$ 0,00
10	3,05 $\pm$ 0,06	2,44 $\pm$ 0,20	1,99 $\pm$ 0,20	62,23 $\pm$ 2,41	68,89 $\pm$ 0,00	2,20 $\pm$ 0,00
12	2,44 $\pm$ 0,00	2,60 $\pm$ 0,02	1,49 $\pm$ 0,04	65,12 $\pm$ 1,48	68,47 $\pm$ 0,00	1,98 $\pm$ 0,00
14	2,38 $\pm$ 0,03	2,44 $\pm$ 0,20	1,88 $\pm$ 0,01	62,96 $\pm$ 0,54	68,89 $\pm$ 0,00	2,48 $\pm$ 0,00
16	2,48 $\pm$ 0,18	2,60 $\pm$ 0,02	1,72 $\pm$ 0,04	64,46 $\pm$ 0,39	68,47 $\pm$ 0,00	2,20 $\pm$ 0,00