



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

**PERFIL DE ESTRESSE EM *Saccharomyces cerevisiae*
DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO**

Acadêmica: Nislene Pires dos Santos Lobo

Dourados – MS
Dezembro/2016





**PERFIL DE ESTRESSE EM *Saccharomyces cerevisiae*
DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO**

Acadêmica: Nislene Pires dos Santos Lobo
Orientadora: Prof. Dra. Margareth Batistote

“Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais”.

Dourados – MS
Dezembro/2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S _____ e Lobo, Nislene Pires dos Santos
Perfil de estresse em *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo fermentativo/Nislene Pires dos Santos Lobo. Dourados, MS:UEMS, ANO 2016
58f.

Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2016. Orientadora: Prof.º Dra. Margareth Batistote

1. Levedura 2. Fermentação 3. Etanol. Título



Nislene Pires dos Santos Lobo

**PERFIL DE ESTRESSE EM *Saccharomyces cerevisiae*
DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO**

Dourados, 07 de dezembro de 2016.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Margareth Batistote
Orientadora

Profa. Dra. Emília Maria Silva

Profa. Dra. Gisele Jane de Jesus

A Deus

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

Dias e noites se passaram.

Vitórias foram conquistadas.

Derrotas foram superadas.

Amizades foram criadas.

Conhecimentos foram adquiridos.

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

Vemos:

Te louvar, Te agradecer e Te oferecer

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

Desse momento

“Obrigado Senhor!”



Dedico esta dissertação ao meu esposo, Paulo Machado Lobo e à minha filha Luísa Santos Lobo, pelo apoio, carinho, pela compreensão de minhas ausências e pelos sacrifícios realizados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me concedido capacidade, força e determinação para realizar este trabalho;

À minha sogra Ivanete Machado Lobo que foi de grande importância para que eu conseguisse concluir este estudo, cuidando da minha filha com todo amor e carinho;

À minha irmã Nislei Pires dos Santos, fiel colaboradora e à minha mãe Aparecida Moralez Lopes dos Santos, pela motivação e determinação em estar sempre pronta para ajudar no que fosse necessário.

À minha orientadora, Dr^a. Margareth Batistote, pelo imenso apoio, paciência, incentivo a mim durante as etapas do mestrado, pois sem sua enorme determinação, dedicação e capacidade de trabalho, a finalização desta dissertação não seria possível;

À professora Dr^a. Claudia Andrea Lima Cardoso, suporte, pelo seu apoio e disponibilidade e atenção a mim dispensada em todos os momentos de dúvida;

A todos do laboratório, que tanto colaboram comigo, nos experimentos, além de inestimável ajuda em todas as demais etapas deste estudo, Franksteffen S. Maia pela colaboração em vários momento do estudo.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

Às minhas amigas, por estarem sempre comigo, presentes em minha vida, me apoiando, incentivando e me ajudando a superar essa etapa em minha vida;

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais pela oportunidade de enriquecimento acadêmico.

ACAPES pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Resumo.....	01
Abstract.....	02
Capítulo 1 - Considerações Gerais.....	03
Referências Bibliográfica	08
Capítulo 1 - Ação do estresse fermentativo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes condições de cultivo.....	12
1-Introdução	12
2-Objetivo.....	13
3-Material e Métodos.....	14
4-Resultados e Discussão.....	16
5-Conclusões	20
Referências Bibliográfica.....	21
Capítulo 3- Produção de metabólitos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sob ação de estresse fermentativo.....	23
1-Introdução.....	23
2-Objetivo.....	24
3-Material e Métodos.....	24
4-Resultados e Discussão.....	27
5-Conclusões.....	34
Referências Bibliográfica.....	34
Capítulo 4- Perfil de assimilação de aminoácidos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em resposta ao estresse fermentativo.....	37
1-Introdução.....	37
2-Objetivo.	38
3-Material e Métodos.....	39
4-Resultados e Discussões.....	41
5-Conclusões.....	47
Referências Bibliográfica.....	48

RESUMO

O Brasil detém o que se entende por mais moderno na produção de etanol, no entanto existem muitos questionamentos em relação à ação do estresse fermentativo aos quais são submetidas as leveduras durante a produção de etanol combustível. O processo é passivo de grandes oscilações no mosto fermentativo e estas oscilações refletem diretamente nas leveduras ocasionando o estresse celular. No entanto, a busca por um processo mais eficiente na produção de etanol perpassa por compreender as bases do processo de produção e as condições estressantes as quais são submetidas às leveduras. O estudo visa analisar o perfil de estresse celular aos quais são submetidas às leveduras durante o processo fermentativo. Para o cultivo celular foram utilizadas as linhagens Catanduva-1 e Red Star cultivadas em meio (YPD 2%) esterilizado a 120°C por 20 minutos, e incubadas a 30°C por 10 horas para produção de biomassa. O mosto foi calibrado nas concentrações de (18°, 22° e 25°) Brix nas temperaturas de 30°C e 40°C, alíquotas foram retiradas para as análises dos parâmetros fermentativos, metabolitos secundários e consumo de aminoácidos. A biomassa foi realizada por medidas espectrofotométricas a 570nm, a viabilidade celular por coloração de azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer, o consumo dos açúcares determinado pelo método do ácido 3,5dinitrosalicílico. A concentração de etanol foi analisada por cromatografia gasosa, glicerol por kit enzimático de triglicerídeos (Laborlab®), acidez por titulação utilizando NaOH (0,1M), o pH por fita de papel indicador e a condutividade por condutivímetro. A identificação dos aminoácidos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). De acordo com os resultados obtidos, as leveduras estudadas sofreram a ação do estresse fermentativo, mostrando que estes fatores interferem na produção de etanol. Para a produção de metabolitos a levedura Catanduva-1 produziu menos etanol e manteve a produção de glicerol. A Red Star apresentou maior produção de etanol, no entanto apresentou um aumento gradativo de glicerol. A acidez aumentou com o aumento da temperatura, concentrações de Brix, e tempos maiores de fermentações, isso ocorreu para ambas as leveduras. A linhagem Catanduva-1 apresentou a maior condutividade na temperatura de 40°C, entretanto a Red Star a menor. As análises dos aminoácidos apresentaram diferenças significativas na concentração, sendo o tempo de fermentação preponderante.

Palavras-chave: Levedura, fermentação, etanol

ABSTRACT

Brazil has what is considered the most modern in ethanol production, however, there are still many questions regarding to the action of fermentative stress that are submitted to yeasts during the production of ethanol fuel. The process is passive of large oscillations in the fermentative wort, and these oscillations may reflect directly in the yeasts causing the cellular stress. However, the search for a more efficient process in the production of ethanol goes by understanding the bases of the production process and the stressful conditions in which the yeasts are submitted. Therefore, the aim of this study is to analyse the cellular stress profile of the yeasts during the fermentation process. For cell culture, it was used Catanduva-1 and Red Star strains cultured in 2% YPD, sterilized at 120°C for 20 minutes and incubated at 30°C for 10 hours, for biomass production. The wort was calibrated at different Brix concentrations (18°, 22° e 25°) at 30°C and 40°C, and aliquots were taken to analysis of fermentative parameters, secondary metabolites and amino acid consumption. The biomass was performed by spectrophotometric measurements at 570nm, cell viability by methylene blue staining and counting in Neubauer chamber, and the consumption of sugars was determined by the 3,5 dinitrosalicylic acid method. The ethanol concentration was analysed by gas chromatography, glycerol by enzymatic triglyceride kit (Laborlab®), the acidity by titration using NaOH (0.1M), pH by indicator paper tape and conductivity by conductivity meter. The amino acids identification was performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). According to the results of the study, the yeasts underwent the action of the fermentative stress, showing that these factors may interfere in the ethanol production. Regarding the production of metabolites, the yeast Catanduva-1 produced less ethanol and maintained the glycerol production. Red Star produced more ethanol; however, it showed a gradual increase of glycerol. The acidity increased with temperature, Brix concentrations, and longer fermentation times, this occurred for both yeasts. The yeast Catanduva-1 showed the highest conductivity at 40° C, while Red Star showed the lowest one. The amino acids analysis showed significant difference in concentration, being the preponderant fermentation time.

Key words: Yeast, fermentation, ethanol.

CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O etanol é uma fonte de energia renovável que compõe a matriz energética do Brasil. A presença de unidades de produção praticamente em todos os estados do país traz benefícios importantes, como milhões de postos de trabalhos, constituindo uma parcela significativa da economia do país (REIS,2016). O processo de produção de etanol no Brasil utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima, na qual são desenvolvidas como caldo de cana, mosto, melação diluído ou uma mistura de ambos (AMORIM et al., 2011).

O cultivo da cana-de-açúcar representa mais de 9 milhões de hectares no Brasil e é plantado em todo território nacional. O Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar e o segundo maior produtor de etanol, segundo dado União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2016). A produção de etanol a partir do milho, o Estados Unidos é o maior produtor do mundo e, juntamente com o Brasil, representam 70% da produção mundial deste importante biocombustível, de acordo com os dados Renewable Fuels Association (RFA, 2015).

A cana-de-açúcar apresenta vantagens econômicas e ambientais na produção de etanol, comparando com outras matéria primas. Apresentando uma eficiência energética positiva, sendo que a cada 9,3 unidades de energia renovável, utiliza-se uma unidade de energia fóssil. Logo, o derivado de milho produz apenas 1,4 e a beterraba, 2,0 unidade de energia fóssil. Usinas brasileiras possuem autossuficiência energética, gerando bioenergia, utilizando produtos do próprio processo, apresentando maior produtividade de litros de etanol por ha⁻¹, com produção de 6,5 mil L ha⁻¹ em contrapartida o milho produz 4,2 mil L ha⁻¹ e a beterraba 5,5 mil L ha⁻¹, segundo dados da Gestão no Campo (GNC, 2014).

O Brasil defronta com a perspectiva de um aumento significativo da demanda de álcool combustível. Essa previsão se sustenta em três realidades de mercado: aumento interno do consumo de álcool hidratado pelo sucesso de introdução da alternativa flex-fuel no mercado de veículos automotivos leves; expansão das exportações brasileiras de álcool à gasolina, como forma de enfrentar o aquecimento global; opção brasileira pela produção do biodiesel, utilizando etanol na transesterificação dos óleos vegetais (BONOMI & FELIPE, 2010). O levantamento da produção de etanol na safra de 2014/2015 está estimada em 28,66 bilhões de litros, 705,92 milhões de litros, a mais do que os 27,96 bilhões de

litros da safra 2012/13. Deste total, 11,80 bilhões de litros deverá ser de etanol anidro e 16,86 bilhões de litros de etanol hidratado. No Brasil, a região do Centro-Sul, apresenta a maior produção de etanol, produzindo 92,93%, sendo São Paulo 48,61%, Goiás 14,41%, Minas Gerais 10,25%, Mato Grosso do Sul 9,02%, Paraná 5,72% e Mato Grosso 3,93%, segundo Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014).

O setor sucroenergético no Estado de Mato Grosso do Sul tem apresentado um crescimento acentuado, principalmente na região Sul do estado, em terras antes destinadas à pecuária e em áreas de pastagens degradadas, que agora estão sendo substituídas pela cana-de-açúcar (CENTENARO, 2012). A região da Grande Dourados tem se tornado um polo industrial, pois 13 municípios têm usinas implantadas, estas indústrias foram capazes de moer de 2,2 milhões a 5,0 milhões de toneladas decana-de-açúcar. Em relação à avaliação dos tipos de produtos gerados pelas usinas analisadas, estas produzem: açúcar, álcool e energia, sendo a bioenergia um dos mais novos produtos do setor (FERRI et al., 2014). A busca por um processo mais eficiente de produção de etanol combustível perpassa por compreender as bases do processo de produção e as condições estressantes às quais são submetidas às leveduras durante o processo fermentativo e o que isto resulta na produção de etanol. As condições adversas encontradas durante o processo industrial para a produção de etanol impõem nas leveduras, condições estressantes os que pode ocasionar perda da produção de etanol.

1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura, pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes* ordem *Saccharomycetales* e a família *Saccharomycetaceae* (BISBY et.al., 2012). O gênero *Saccharomyces* é um dos mais utilizados na indústria produtora de fermentados que tem como produto final o álcool. A capacidade deste gênero de ser utilizado em processos industriais transformando açúcares em etanol propicia uma alta tolerância a produção de etanol, resistência a variações de temperatura, atividade celular em ambiente ácido, esses atributos podem ser conferidos ao gênero *Saccharomyces* (SANTOS et.al., 2013). As leveduras são organismos eucarióticos unicelulares apresentam núcleo, e estruturas celulares como mitocôndria, aparelho de Golgi, vesículas de secreção, retículo endoplasmático, vacúolos, ribossomos, entre outras organelas celulares. A

Saccharomyces cerevisiae são organismos de fácil manipulação, capazes de crescer em várias fontes de carbono e nitrogênio e de fornecer grande número de células em um tempo relativamente curto. Devido a estas peculiaridades, esses microrganismos são um dos mais adequados e fascinantes para estudos de processos biológicos, pois eles apresentam características estruturais e funcionais de eucariotos superiores (SILVA, 2010).

Estes microrganismos são mesófilos e crescem em faixa de temperatura variando, de 26°C e 35°C e desempenham melhor atividade em pH de 4,0 a 5,0 (AMARAL, 2009). São células eucarióticas, de rápido crescimento e de fácil manipulação genética, muito utilizada como modelo de estudos fisiológicos e bioquímicos (NASHEUER et al., 2002; BIDDICK; YOUNG, 2009, KARATHIA et al., 2011).

Este microrganismo realiza a fermentação do açúcar para obter energia química necessária à sua sobrevivência, liberando o etanol, que é formado pela degradação de monossacarídeos. Durante a fermentação alcoólica as leveduras produzem a enzima invertase que hidrolisa a sacarose, (C₁₂H₂₂O₁₁), em glicose e frutose, sendo a glicose a molécula mais utilizada por este microrganismo (SOUZA, 2009).

A sobrevivência de qualquer organismo requer a capacidade de adaptações às alterações ambientais. Na natureza ocorre uma grande diversidade de cepas de leveduras, as quais mesmo sendo de mesma espécie podem apresentar diferenças entre si quanto ao seu genótipo e fenótipo, de forma a se adaptar ao seu nicho ecológico (CECCATO-ANTONINI, 2010). Entre diversos microrganismos produtores de etanol à levedura *Saccharomyces cerevisiae* destaca como excelente produtora de etanol (MA & LIU, 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol, e utiliza o caldo de cana ou melaço para a produção de álcool. Para que este sucesso ocorra, das mais de 395 usinas produtoras de etanol, 190 optam por iniciar o processo por leveduras selecionadas entre elas Catanduva-1, Pedra-2, Santa Adélia, Barra Grande (AMORIM, 2005). Estudos realizados por Batistote et al. (2010), em usinas implantadas no sul do estado do Mato Grosso do Sul, na safra 2009/2010, relatam que as leveduras mais utilizadas foram Cat-1, Pe-2, Barra Grande e Fleishmann. Entre 2010 e 2015 novas leveduras foram lançadas no mercado, a FT-858 com alta capacidade de brotamento e a Fermel que apresentam um eficiente performance fermentativa em altas concentrações de melaço (JORNAL DA CANA, 2014).

1.2 Metabolômica

Metaboloma é definido como um conjunto de moléculas de baixo peso molecular presentes em um organismo, que representam o conjunto de metabólitos (ZHOU et al.,2012). O termo Metabolômica foi introduzido nos anos 2000 por Dr. Oliver Fieh e colaboradores, e refere-se a uma análise abrangente (qualitativa e quantitativa) de todos os metabólitos primário e secundário de um sistema celular (KRASTANOV, 2010).

A metabolômica é um enfoque muito versátil, podendo ser utilizada em diferentes tipos de estudos, tais como na investigação de alterações metabólicas de um organismo em resposta ao estresse induzido por agentes físicos, luz UV, calor, desidratação, químicos como fármacos e agroquímicos ou biológicos, contaminantes e outros (FUNARI et al.,2013).

Os produtos naturais, mais especificamente os metabólitos secundários, notabilizados pela diversidade de tipos estruturais complexos, são substâncias essenciais ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa dos organismos que os contêm. São também de grande utilidade para a espécie humana como fármacos, alimentos, fragrâncias, cosméticos e agroquímicos (MISHRA, 2011).

A produção do etanol brasileiro é derivada de tecnologias de primeira geração, onde uma simples fonte de açúcar, proveniente da extração da cana de açúcar, a sacarose, é fermentada pela levedura, gerando produtos secundários como etanol, gás carbônico glicerol e ácido acético (BROWN et al., 2013).

Devido as diferentes rotas metabólicas, a levedura utiliza vários compostos como fonte de carbono para seu metabolismo que são monossacarídeos, frutose, glicose e galactose e os dissacarídeos maltose e sacarose (SANTOS et al., 2013). A levedura utiliza aminoácidos, peptídeos e proteínas, como fonte de nitrogênio, que são nutrientes importante para o seu metabolismo (BURIN, 2014). Entretanto, fonte de carbono e nitrogênio são os principais nutrientes utilizados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Isso implica que fluxo de carbono e nitrogênio constituem parâmetros importantes na regulação do crescimento celular (MIRANDA JUNIOR, 2012). O esquema abaixo apresenta a assimilação de fonte de carbono e nitrogênio pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1).

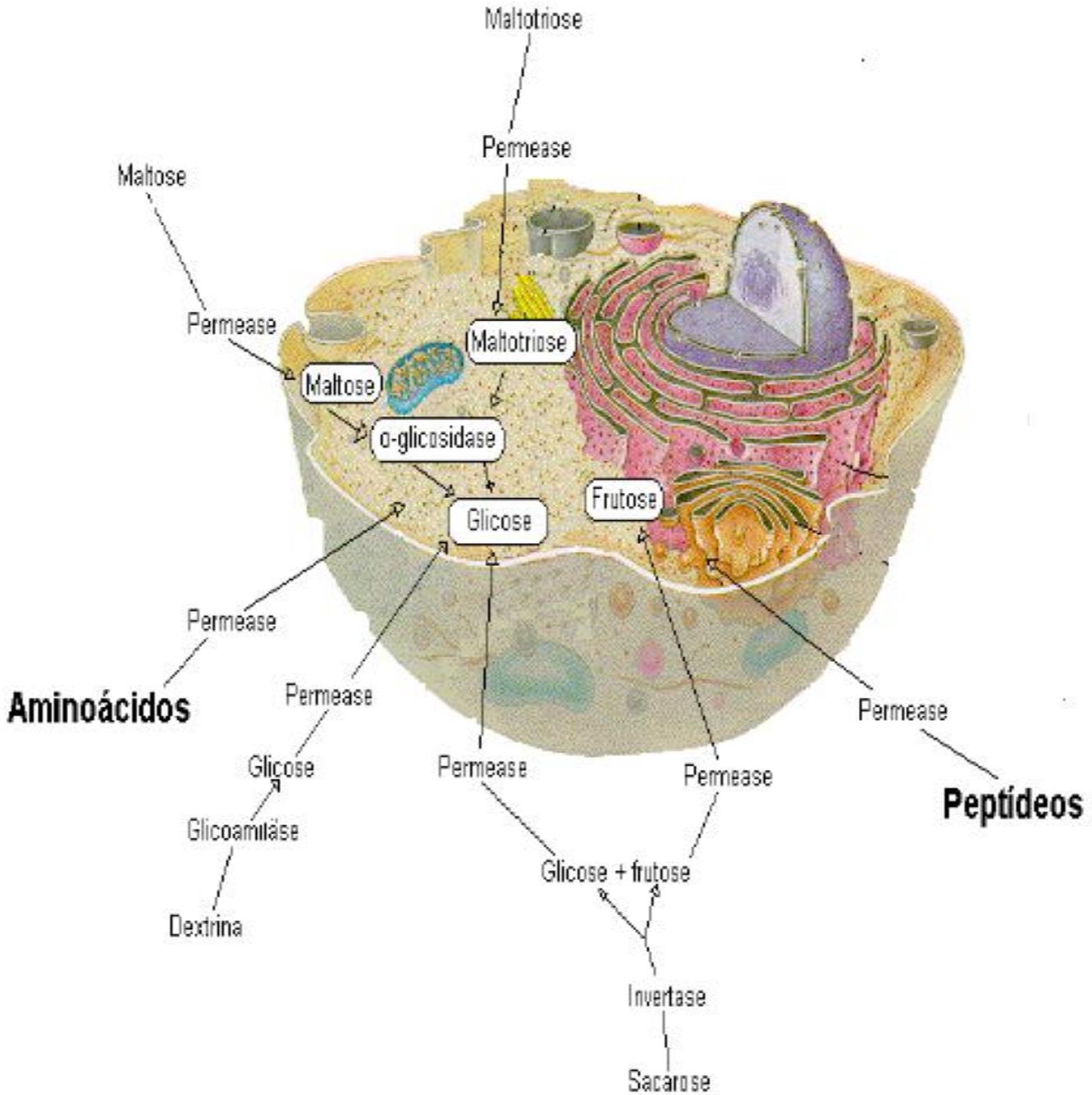


Figura 1 – Esquema representando a assimilação de fonte de carbono e nitrogênio pela levedura *Saccharomyce cerevisiae* (adaptado por BATISTOTE, 2006) Fonte: Disponível em <http://taianemaia.blogspot.com.br/2006/08/defineclulas.html>. Acesso em: 10.Out.2016.

O glicerol é o terceiro maior subproduto importante da fermentação alcoólica após a produção de CO₂, sendo produzido em resposta à pressão osmótica, que pode ocorrer durante o processo fermentativo (GOMBERT & MARIS, 2015). A formação de glicerol pode inibir ou ser um fator limitante da produção de etanol durante o processo fermentativo, quando ocorre um aumento deste metabólito no mosto fermentado, ocasiona um decréscimo lento e linear da produtividade alcoólica (BASSO et al., 2008).

Dentre os metabólitos produzidos durante a fermentação alcoólica, destacam-se os ácidos orgânicos, gerados pelas bactérias como produto final de sua síntese e, pelas leveduras como produtos secundários, estimulados pelo estresse ocorrido durante o processo fermentativo (DE CARVALHO & MONTEIRO, 2011).

Inúmeras são as condições adversas que ocorrem no ecossistema da fermentação os quais as leveduras estão inseridas e sendo as responsáveis por transformar o substrato em etanol. Entender como estes microrganismos respondem a estas condições de estresse as quais são submetidas durante o processo de fermentação, possa ser uma importante ferramenta para assegurar e aumentar a produção de etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, F.S. Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2009.

AMORIM, V.A. Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. Piracicaba: **FERMENTEC**. 434p, 2005.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.91, p.1267-75, 2011.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, p. 1155-1163, 2008.

BATISTOTE, M. **Estudo fisiológico do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no meio de cultura no metabolismo de leveduras**. 2006.175 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) -Universidade EstadualPaulista, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara-SP, 2006.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, A. C.; ERNANDES, J. R.; DOFFINGER, R. D. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias do Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto à base de caldo de cana. **Revista Ciência e Natura**, v.32, p. 83-95, 2010.

BIDDICK, R.; YOUNG, E. T. The disorderly study of ordered recruitment. **Yeast**, v. 26, p. 205–220, 2009.

BISBY, F., ROSKOV, Y., CULHAM, A. (2012). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life. <http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2012/details/species/id/8526088/source>. Acesso em: 19 Out 2015.

BONOMI, A.; FELIPE, M.G.A. **Bioetanol de cana-de-açúcar**. 1. ed. Edgar Blucher. p. 543, 2010.

BROWN, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**. v.13, p. 277-90, 2013.

BURIN, V. M. **Processo de clarificação do mosto: influência na composição fenólica, nitrogenada e no perfil volátil de vinhos. Compostos heterocíclicosn, s,o, glutaciona e aminoácidos, contribuição para o 'bouquet**. 2014. 231f.Tese(Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina- Florianópolis - SC. 2014.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica**. A importância do monitoramento microbiológico em destilarias. São Carlos: Edu FS Car, p. 105, 2010.

CENTENARO, M. **Um estudo do sobre investimento direto externo no setor sucroenergético do estado de Mato Grosso do Sul**. 2012. 194f (Doutorado em Administração) Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, São Leopoldo- RS, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento brasileiro da safra de cana-de-açúcar. Safra 2014/2015**, v. 1 – Safra 2014/15, n. 3 - Terceiro Levantamento, Brasília, dez. 2014.

DE CARVALHO, G.G.; MONTEIRO, R.A.B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para a produção de etanol. **FAZU em Revista**, v.2, p. 47-54, 2011.

FERRI, A.; COSTA, M. A. S.; BATISTOTE, M.; NAKA, M. H. Análise do perfil de produção de etanol em usinas localizadas na região da Grande Dourados – MS. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 251-268, 2014.



FUNARI, C.S.; CASTRO, I.; CAVALHEIRO, J. A.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, p.1605-1609, 2013.

Gestão no Campo. Cana de Açúcar –GNC. **Alta tecnologia e aspectos sustentáveis**. 2014. Disponível em: <<http://www.gestao no campo.com.br/biblioteca/alta-tecnologia e aspectos sustentáveis>>. Acesso em: 02 Set. 2015

GOMBERT, A.K.; MARIS, A.J. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**, v.33, p.81–86, 2015.

JORNAL CANA. Fermentec explica importância da seleção de leveduras. 2014. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/fermentec-fala-sobre-importancia-da-selecao-de-levedura>>. Acesso em: 26 Abril 2016.

KARATHIA, H., VILAPRINYO, E., SORRIBAS, A. and Alves, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: **A Comparative Study**. v. 6, p.1615, 2011.

KRASTANOV, A. Metabolomics-The State of Art, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.24, p.1537, 2010.

MA, M.; LIU, Z.L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 87, p.829 –845, 2010.

MIRANDA JUNIOR, M. **Estudos fisiológicos com leveduras industriais produtoras de etanol: efeito da natureza da fonte de nitrogênio**.2012. 122 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara-SP, 2012.

MISHRA, B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p.4769-4807, 2011.

NASHEUER, H.P., SMITH, R., BAUERSCHMIDT, C., GROSSE, F. AND WEISSHART, K. Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. Progress in nucleic acid **Research and Molecular Biology**, v. 72, p. 41–94, 2002.

REIS, V. R. **Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum***. 2016. 132f. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP, 2016.

RFA Renewable Fuels Association. 2015. Disponível em http://ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2016/02/RFA_2016_full_final> Acesso em: 26Set 2016.



SANTOS, E. F.; SCHAUTZ, L. C. A.; CARDOSO, A. L.; ERNANDES, J.R.; BATISTOTE, M.; O efeito da complexidade estrutural de fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. **Ciência e Natura**, v.35, p.09-14, 2013.

SILVA, L. D. 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 91f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Estadual Paulista-Araraquara-SP, 2010.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae***. 2009 155f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantã São Paulo-SP, 2009.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-açúcar.2016.Disponível em: <<http://www.unica.com.br> >. Acesso em: 22 Out 2016.

ZHOU, B.; XIAO, J.F.; TULI, L.; RESSOM, H.W. LC-MS- Based Metabolomics, **Molecular BioSystems**, v.8, p.470-471, 2012.

2-CAPÍTULO- AÇÃO DO ESTRESSE FERMENTATIVO EM *Saccharomyces cerevisiae* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

1- INTRODUÇÃO

O etanol vem ganhando destaque nas últimas décadas devido à busca por bicomcombustíveis alternativos para atender a demanda da indústria automotiva. No Brasil, a cana de açúcar é a matéria prima usada para produção de etanol (SOUZA & MONTEIRO, 2012).

A transformação de carboidratos em etanol é denominada fermentação alcoólica e as leveduras têm um papel fundamental nesse processo (ALENCAR et al., 2009). No entanto para *Saccharomyces cerevisiae* metaboliza a sacarose, o principal açúcar presente no caldo de cana ou no melaço, e produz a enzima invertase, que hidrolisa a sacarose, produzindo monômeros de glicose e frutose, que entram na célula por difusão facilitada através de transportadores de membrana (BASSO et al., 2011), as leveduras são os principais agentes iniciadores do processo fermentativo para a produção de etanol (NASCIMENTO, 2016).

A fermentação é uma das etapas fundamentais e sem dúvida a mais crítica do processo e a concentração do substrato é um fator importante a ser considerado, bem como leveduras selecionadas que irão iniciar o processo. Fermentações em mosto à base de caldo de cana, recomenda-se que as concentrações de sólidos solúveis sejam entre (18° e 22°) Brix, no entanto a concentração de 18°Brix é a ideal para que se tenha uma produção máxima de etanol (CEBALHOS-SCHIAVONE, 2009). Já para Ferri et al. (2014) avaliaram e monitoraram o controle do processo em usinas no estado de Mato Grosso do Sul, e observaram que as condições do processo fermentativo, variaram entre as usinas analisadas. Segundo o autor a melhor concentração do substrato utilizado nestas usinas foi 18°Brix, com temperatura variando entre 30°C a 35°C, com o pH variando entre 2,6 a 4,5 e uso frequente de antibiótico.

Estudos realizados por Souza (2009) mostraram que altas concentrações de açúcares propiciam o estresse celular em leveduras, pois induz o aumento da osmolaridade externa ocasionando perda de biomassa e a taxa de viabilidade celular, e causam alterações no gradiente osmótico da membrana plasmática, ocasionando em perdas de volume das

células que se contraem por causa de diferenças da pressão osmótica entre o meio intracelular e extracelular.

Outro fator importantíssimo a ser considerado é a variação de temperatura as quais são submetidas as leveduras durante o processo fermentativo. Este fator é sem dúvida o que mais afeta a atividade dos microrganismos influenciando no crescimento, capacidade fermentativa, metabolismo e viabilidade celular, devido a formação de novos compostos, alterando o meio fermentativo, como aumento de presença de substâncias ácidas, sólidos solúveis e concentração de etanol (NAVES et al., 2010). As fermentações conduzidas a temperaturas mais baixas podem levar a uma maior resistência da levedura ao teor de etanol final e também uma menor geração de subprodutos do metabolismo celular devido ao menor estresse o qual as células são submetidas (CRUZ et al., 2014).

Na maioria dos processos fermentativos o pH do meio afeta tanto o crescimento, como a formação dos produtos (RIBEIRO, 2010). O pH ideal para o um bom crescimento da levedura é de aproximadamente de 5,0. Valores de pH maiores, próximo de 6,0, durante o processo produz maior quantidade de glicerina e ácido acético, além de álcool etílico e anídrico (ZULIM et al., 2014). O tempo de fermentação também se torna um fator estressante, no qual tempos prolongados podem ocasionar contaminações, baixa viabilidade celular e excesso de açúcares no mosto (SANTOS et al., 2013).

O conhecimento do comportamento das leveduras industriais em situações estressantes, é importante para que se tenha conhecimento de sua eficiência fermentativa. É neste contexto que o presente estudo pretende avaliar a ação do estresse fermentativo em que são submetidas as leveduras durante a produção de etanol combustível, visando contribuir com novos conhecimentos e comparar com as causas do estresse, podem acarretar na fisiologia destes microrganismos.

2 OBJETIVO

O estudo visou avaliar a ação do estresse fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae*, sob diferentes condições de cultivo em mosto a base de caldo de cana, através dos parâmetros fermentativos: biomassa, viabilidade celular, consumo de açúcar e pH.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas *Saccharomyces cerevisiae* Catanduva-1 (CAT-1), linhagem utilizada nos parques industriais brasileiros para produção de etanol. A linhagem Red Star (RED) uma linhagem francesa. Essas linhagens se encontram disponíveis no Laboratório do Centro de Pesquisa em Recursos Naturais – CERNA, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul-UEMS.

3.2 Coleta do mosto e pré-inoculo

O mosto foi coletado em uma usina no Estado de Mato Grosso do Sul. A coleta foi realizada utilizando frascos estéreis e transportados à baixa temperatura - 4°C. O mosto foi filtrado em algodão e posteriormente em papel filtro. Para o ajuste do teor de sólido solúvel (Brix) com o auxílio de uma proveta e um sacarímetro o mosto foi calibrado nas concentrações de (18°, 22° e 25°) Brix, para concentrar o mosto utilizou-se sacarose e para diluir água destilada.

No preparo do pré-inoculo, foi utilizado o meio YPD 2% em pH 5,0 contendo (extrato de levedo 1,0% (p/v), peptona 1,0% e glicose 2,0% (p/v), foram esterilizados em autoclave à 120°C por 20 minutos. Foram pesadas 0,10g de levedura e inoculadas no meio líquido YPD 2%, e com auxílio de uma proveta foram adicionadas em frascos de erlenmeyers de 125 mL contendo 25mL do meio. Os frascos foram incubados em “Shaker” por 10 horas na temperatura de 30°C e a 250rpm. Após o crescimento, as amostras foram coletadas e centrifugadas (800g, por 20 minutos), ressuspensa e lavadas por três vezes consecutivas em solução salina (0,85%) estéril e a biomassa celular obtida foi utilizada nos experimentos fermentativos.

3.3 Condições fermentativas

Os experimentos fermentativos foram realizados em mosto a base de caldo de cana, previamente calibrado nas concentrações de (18°, 22° e 25°) Brix, e sem correção do pH, foram adicionados em frascos de erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do mosto e esterilizado a 120°C por vinte minutos. A biomassa obtida foi reinoculada no meio

fermentativo incubados em “shaker” nas temperatura de 30°C e 40°C a 250 rpm. Em tempos determinados de crescimentos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 horas), alíquotas foram retiradas para análises dos parâmetros fermentativos.

3.4 Parâmetros fermentativos

3.4.1 Determinação do crescimento celular

As análises do crescimento celular foram realizadas, através de medidas espectrofotométricas, a 570 nm de uma suspensão de células com diluição conhecida e relacionada com a massa celular, através da seguinte equação:

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

Onde f, é o fator de conversão de absorbância em massa seca; para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é 0,6711. O fator foi determinado a partir das medidas de absorbância e massa seca de suspensões celulares, com diferentes concentrações, correlacionada com uma curva de calibração.

3.4.2 Determinação de açúcar residual

O consumo dos açúcares redutores totais (ATR) foi determinado através do método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico – DNS (MILLER, 1959).

Para a dosagem do açúcar, foram diluída 20 µL da amostra em 3 mL de água destilada, para hidrólise da sacarose foi adicionado 500µL da amostra diluída e 200µL de ácido clorídrico, incubada a 60°C por 7 minutos, e logo após adicionou-se 1,0 mL de reagente DNS nos respectivos tubos de ensaio. Os tubos foram aquecidos a 100°C por 5 minutos. Em seguida, foram transferidos para um banho de gelo para resfriamento e as leituras de absorbância foram realizadas a 546 nm,

3.4.3 Determinação do pH

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

3.4.4 Determinações da viabilidade celular

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

Na determinação da viabilidade celular, 10 μ L das amostras foram transferidos para um tubo contendo 90 μ L da solução padrão de azul de metileno e agitados. Após 10 minutos, tempo necessário para que as células absorvessem o corante, procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentaram-se incolores, enquanto as não viáveis coloridas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ação do estresse fermentativo da *Saccharomyces cerevisiae* na temperatura de 30°C

Na análise da ação do estresse fermentativo em leveduras industriais, os resultados mostraram desempenho fermentativo eficiente nas condições estudadas. A levedura Catanduva-1 cultivada em sacarose na concentração de 18°Brixna temperatura de 30°C, apresentou produção de biomassa 11mg/mL a partir de 25 horas de fermentação, a taxa de viabilidade celular foi de 80% em relação as demais condições, e o pH de 4,0 que se manteve a partir de 20 horas de fermentação como observado em todas as concentrações, e o consumo de açúcar de 10%. Podemos observar que nas concentrações de (22° e 25°) de Brix a levedura Catanduva-1 apresentoumelhor desempenho fermentativo, tal como biomassa de 12mg/mL e taxa de viabilidade em torno de 84% (Figura 1 A).

A levedura Red Star, apresentou maior produção de biomassa de 19 mg/mL no transcorrer do tempo de 25 horas de fermentação, mostrou viabilidade celular em torno de 85%, e pH 4,0 em 20 horas de fermentação e o consumo de açúcar de 10%, cultivada nas concentrações de (18° e 22°) Brix. Podemos observar que na concentração de 25° Brix a levedura mostrou perda de biomassa de 17mg/mL e viabilidade de 80% restando mais açúcar no mosto em torno de 20% (Figura 1 B).

Na avaliação Moreira et al. (2015) utilizando linhagens de leveduras industriais cultivadas em mosto nas concentrações graus Brix (12°, 15°, 24° e 30°) na temperatura de 30°C por 8 horas de fermentação, os dados mostraram que ocorreu maior produção de

biomassa de 5,5 mg/mL, viabilidade celular taxa de 96% e etanol 8,5% (v/v) ocorreu no substrato de 15° Brix para as leveduras industriais analisadas, bem como a perda, desses parâmetros em substratos mais concentrados. Podemos observar que este estudo corrobora com a literatura mostrando que em substratos mais concentrados e tempos mais prolongados da fermentação, as leveduras analisadas sofreram a ação do estresse celular.

Estudos realizados por Batistote et al. (2010) avaliaram os parâmetros fermentativos das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas em usinas do estado de Mato Grosso do Sul, na safra 2009/2010, cultivadas em 50 mL de mosto em 15°Brix na temperatura 30°C por 16 horas de fermentação. A linhagem Catanduva-1 apresentou biomassa de 14mg/mL, viabilidade de 88% e produção etanol de 16%(v/v), a levedura 16 mg/mL Fleischmann, viabilidade de 66% e concentração 5% (v/v) de etanol. Podemos observar que a levedura Catanduva-1 se mostrou superior a levedura de panificação, sendo a Catanduva-1 uma levedura selecionada por apresentar uma performance fermentativa mais eficiente e por ser uma das leveduras mais utilizadas para a produção de etanol nas usinas brasileiras.

As concentrações adequadas de nutrientes no mosto são importantes, pois em altas concentrações ou baixas, podem refletir no processo fermentativo. Alta concentração de açúcares, conseqüentemente eleva a velocidade de fermentação, resultando em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menor quantidade de álcool (SOUZA & MONTEIRO, 2012).

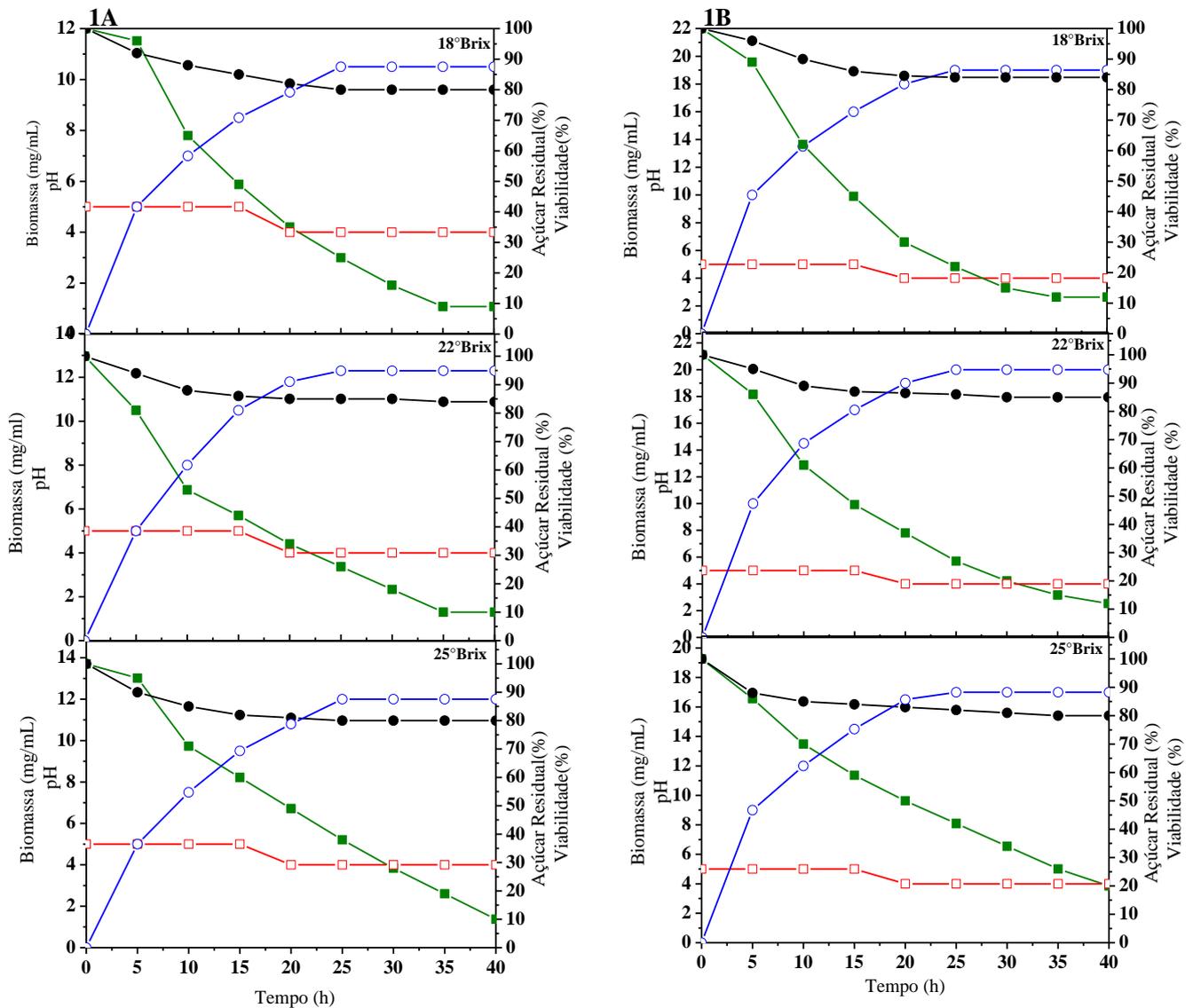


Figura 1- Determinação dos parâmetros fermentativos das leveduras Catanduva-1 (A) e Red Star (B) nas concentrações de Brix (18°, 22° e 25°), os símbolos estão representados (●) viabilidade celular, (■) açúcar residual, (○) biomassa e (□) pH. Condições de cultivo de 30°C, em diferentes tempos de fermentação a 250 rpm.

4.2 Ação do estresse fermentativo da *Saccharomyces cerevisiae* na temperatura de 40°C

A análise na temperatura de 40°C em diferentes condições de cultivo Catanduva-1 cultivada em 18° Brix apresentou biomassa de 13 mg/mL no tempo de 25 horas de fermentação, e uma viabilidade celular de 80%, o pH em torno de 4,0 em 20 horas de

fermentação e o consumo de açúcar 10%. No entanto, na concentração de 22° Brix ocorreu a maior produção de biomassa de 15mg/mL, viabilidade celular de 75% e o consumo de 10% de açúcar. Podemos observar que a levedura cultivada em 25°Brix apresentou uma perda gradativa nos parâmetros fermentativos analisados (Figura 2A).

Para a levedura Red Star, cultivada no mosto na concentração de 18°Brix, a produção de biomassa foi de 15mg/mL no tempo de 20 horas de fermentação, mostrou uma viabilidade de 33%, um pH de 4,0 em 15 horas de fermentação e um consumo de açúcar de 20% ao final da fermentação. Podemos observar que em nas concentrações de (18°, 22° e 25°) Brix a levedura apresentou perda acentuada da viabilidade celular e consumo de açúcar (figura 2B). Podemos observar que na temperatura de 30°C, as leveduras não mostraram sofrer a ação do estresse, no entanto, na temperatura de 40°C principalmente a Red Star apresentou uma queda acentuada nos parâmetros analisados, no entanto a Catanduva-1 mostrou uma melhor capacidade de fermentação.

As temperaturas ideais para fermentação industrial ocorrem entre a faixa de 30°C a 35°C, no entanto, estas temperaturas podem ser superiores levando em conta o tempo de fermentação e a região (BATISTOTE et al., 2010). O tempo de fermentação também é um fator estressante, na qual tempos prolongados podem ocasionar contaminações, baixa viabilidade celular e excesso de açúcares no mosto (SANTOS et al.,2013).

Estudos foram realizados por Ramos et al. (2013), utilizando sessenta e seis cepas de *Sacchormyces cerevisiae* isoladas de destilaria e de frutos. Estas leveduras foram avaliadas em relação a faixa de temperatura variando entre (30°, 37° e 42°C), a osmolaridade entre (0,5, 0,7 e 1 mol/L⁻¹NaCl) e tolerância ao etanol nas concentrações de (6%, 12% e 18% v/v) foram obtidos dois grupos de leveduras, um composto por vinte e uma cepas, as quais, se mostraram mais resistentes as condições submetidas, e quarenta e cinco leveduras se mostraram mais sensíveis, na temperatura de 42°C, na concentração de 1 mol/L⁻¹ de NaCl em 12% de etanol (v/v).

Na literatura encontram-se dados de que nos processos fermentativos, a temperatura pode ter uma ampla faixa variando de (30°, 37° e 42°C), e mosto pode ser constituído por diferentes concentrações dos substratos.Os dados obtidos em nossos estudos mostraram que na temperatura de 40°C e em elevadas concentrações dos substratos, ocorreu o comprometimento da capacidade fermentativa, principalmente a linhagem Red Star.

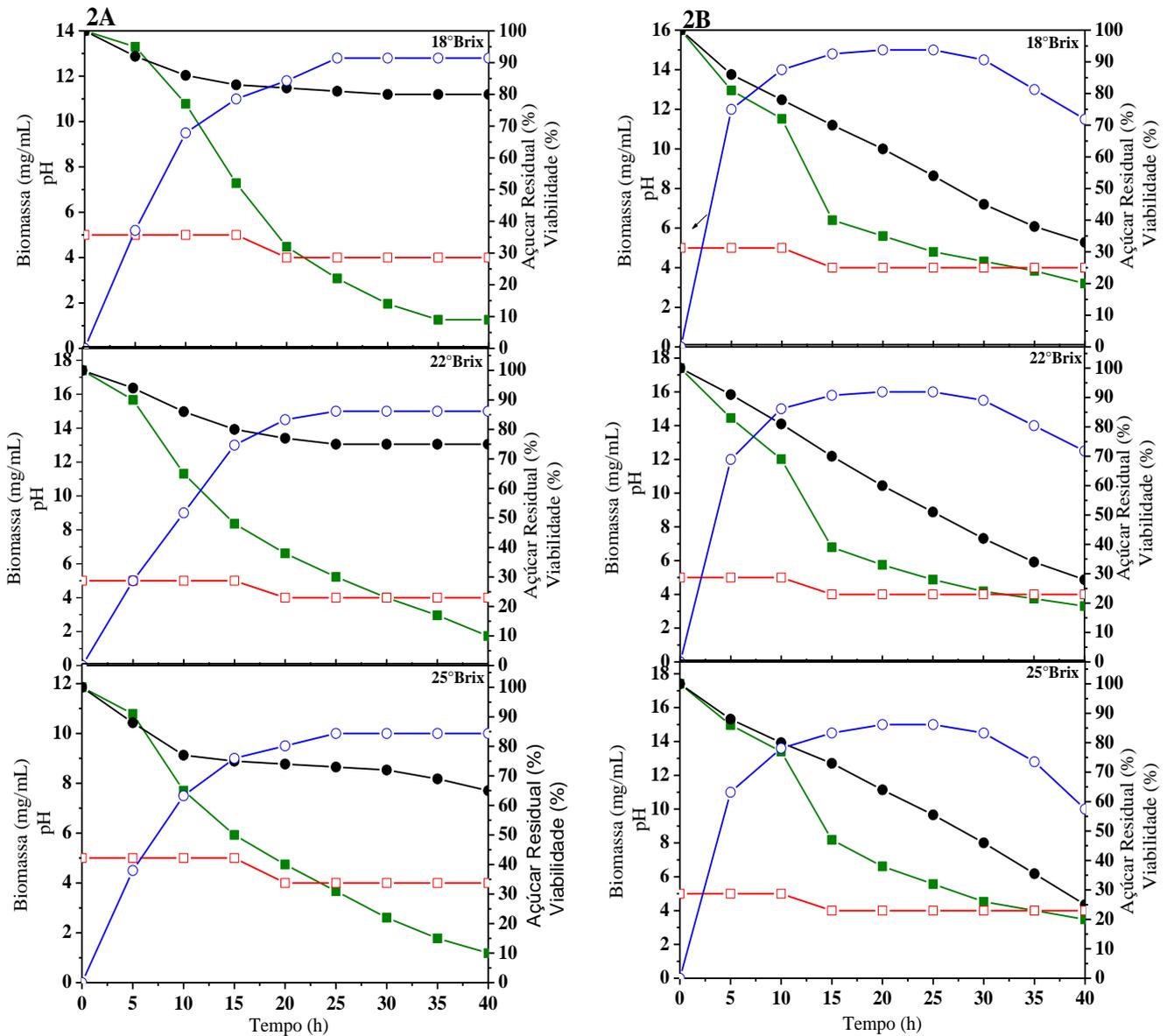


Figura 2-Determinação dos parâmetros fermentativos das leveduras Catanduva-(2) (A) e Red Star (B) nas concentrações de Brix (18°, 22° e 25°), os símbolos estão representados (●) viabilidade celular, (■) açúcar residual, (○) biomassa e (□) pH. Condições de cultivo de 40°C, em diferentes tempos de fermentação a 250 rpm.

5 - CONCLUSÕES

Através dos resultados descritos neste estudo, conclui-se que as linhagens de leveduras industriais avaliadas, sofreram ação do estresse fermentativo, as quais são

submetidas durante o processo, comprometendo a performance fermentativa e conseqüentemente a produção de etanol.

Dentro das condições de estudo, os parâmetros fermentativos analisados mostraram ser uma ferramenta importante de análise durante o processo fermentativo. E estes parâmetros mostraram que a levedura Red Star sofreu a ação do estresse fermentativo em relação a Catanduva-1 principalmente na temperatura de 40°C e altas concentrações osmóticas. A eficiência fermentativa da levedura durante o processo fermentativo é uma característica de suma importância para selecionar as leveduras para o setor industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, E. M. B.; MOTTA, C. M. S.; WALTER, B. S.; SANTOS, R. M. P.; MARQUES, O. M.; QUEIROZ, L. A. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.819-824, 2009.

BASSO, T.O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPÍRITO-SANTO, J.C.A.; MULHER, G.; SCHLONG, P.S.; SILVA, C.P.; TONSO, A.; DARAN, J.; GOMBERT, A.K, MARIS, A.J.A.V, PRONK, J.T.; STAMBUK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v.13, p.694–703, 2011.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, A. C.; ERNANDES, J. R.; DOFFINGER, R. D. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias do Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto à base de caldo de cana. **Revista Ciência e Natura**, v.32, p. 83-95, 2010.

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. 177p. Dissertação Mestrado em Faculdade de Ciência de alimentos) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba –SP, 2009.

CRUZ, M.L.; RAMINHO, M. F.; CASTRO, A.L.M.; GUIDINI, C.Z.; RESENDE M.M., RIBEIRO, E.J. **Estudo da influência da temperatura na resistência ao etanol da levedura *Saccharomyces cerevisiae* 904**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis-SC, 2014.

FERRI, A.; COSTA, M. A. S.; BATISTOTE, M.; NAKA, M. H. Análise do perfil de produção de etanol em usinas localizadas na região da Grande Dourados – MS. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 251-268, 2014.

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

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

MOREIRA, S. C.; SANTOS, M. S. M.; BARROS, N.S.; CARDOSO, A. C.; BATISTOTE, M. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Revista Ciência e Natura**, v.3, p.55-63, 2015

NASCIMENTO, V. M. **Fisiologia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e da bactéria *Burkholderia sacchari* LFM 101 em diferentes condições de cultivo**. 2016. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal da Grande Dourados – MS, 2016.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F.S.; PINTO, O.G.; NAVES, P.L.F.; Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, p.1-16, 2010.

RAMOS, C. L.; DUARTE, W.F.; FREIRE, A.L.; DIAS, R.D.; ELEUTHERIO, E.C.A.; SCHWAM, R.F. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, p.935-944, 2013.

RIBEIRO, F. A. M. Fermentação Alcoólica. Processamento na indústria sucroalcooleira. Apostila – Modulo II. Uberaba – MG, 2010.

SANTOS, E. F.; SCHAUTZ, L. C. A.; CARDOSO, A. L.; ERNANDES, J.R.; BATISTOTE, M.; O efeito da complexidade estrutural de fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. **Ciência e Natura**, v.35, p.09-14, 2013.

SOUSA, J.L.U.; MONTEIRO, R.A.B. Fatores Interferentes na Fermentação Alcoólica para a Produção de Etanol. **FAZU em Revista**, v.2, p. 100-107, 2012.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae***. 2009.155f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantã São Paulo-SP, 2009.

ZULIM, C.; F.; ROCHA, J.S.; BUDEL, L. **Fermentação de Pães**. FAMESP- Faculdade de São Paulo, 2014.

3-CAPÍTULO-PRODUÇÃO DE METABÓLITOS EM *Saccharomyces cerevisiae* SOB AÇÃO DE ESTRESSE FERMENTATIVO

1-INTRODUÇÃO

Os metabólitos desempenham papel extremamente importante na interação entre os diversos componentes celulares, estes ocorrem através de mecanismos de regulação direta e/ou indireta. Os metabólitos intracelulares são uma consequência direta das concentrações e propriedades dos processos enzimáticos, cuja quantidade e atividade podem estar relacionados diretamente com o conteúdo de um determinado metabólito. No meio intracelular à cada instante, inúmeras moléculas são produzidas e apresentam funções complexas de diferentes processos regulatórios, tais como, regulação da transcrição e de transdução, regulação de interações proteína-proteína e regulação metabólica das proteínas pelos metabolitos (VILLAS-BÔAS et al., 2004; MASHEGO et al., 2007).

A avaliação dos metabólitos secundários, bem como, dos mecanismos de regulação, é essencial para uma compreensão do metabolismo celular. Segundo Lambrechts & Pretorius (2000), metabólitos secundários não apresentam função no crescimento dos organismos, seriam moléculas essenciais para a sobrevivência dos mesmo, porém, derivados dos produtos do metabolismo primário.

A *Saccharomyces cerevisiae* contém aproximadamente 600 metabólitos identificados, enquanto que as plantas possuem 200.000 metabólitos primários e secundários (PATTI et al., 2012, ZHOU et al., 2012) Estes compostos químicos são transformados durante o metabolismo celular atuando como intermediários e produtos das reações metabólicas, além de serem necessários para manutenção, crescimento e funcionamento das células (ROCHFORD, 2005).

As leveduras apresentam inúmeras reações fisiológicas, o metabolismo de açúcar como a glicose, pode ocorrer de forma anaeróbia ou aeróbia. Durante o processo fermentativo prepondera o metabolismo anaeróbio, cujos produtos finais são etanol e gás carbônico (WIESIOLEK, 2007). A via glicolítica é a soma de todas as reações bioquímicas pelos quais a glicose é convertida a piruvato, no entanto, em altas concentrações de açúcares ocorre a conversão do piruvato a acetaldeído e etanol.

Os fatores estressantes ocasionam alterações no metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo, tais como, quantidade de nutrientes, temperatura, concentração do substrato, pH, contaminantes, etanol, glicerol e acidez ocasionando alterações na produção de seus metabólitos para Basso et al. (2008). Estudos realizados por Basso et al. (2011), a tolerância ao etanol é um fator importante pois, afeta a fluidez da membrana plasmática, em altas concentrações o etanol atua profundamente nesta estrutura celular. Já para Ferri et al. (2014) fermentações que ocorrem na concentração de 18°Brix em temperaturas variando na faixa de 30°C a 35°C propiciam altas conversões do substrato em etanol.

O glicerol é o terceiro maior subproduto importante da fermentação alcoólica após a produção de CO₂, sendo produzido em resposta à pressão osmótica, que pode ocorrer durante o processo fermentativo (GOMBERT & MARIS, 2015). A formação de glicerol pode inibir ou ser um fator limitante da produção de etanol durante o processo fermentativo. Quando ocorre um aumento deste metabólito no mosto, há um decréscimo lento e linear da produtividade alcoólica (BASSO et al., 2008).

Uma compreensão qualitativa e quantitativa dos metabólitos intracelulares e extracelulares em levedura e sua regulação *in vivo*, não é uma tarefa fácil, pois as análises dos metabólitos são relativamente complexas, e envolvem diversas etapas e dedicação. Diante deste cenário, o estudo visou analisar importantes metabólitos produzidos pelas leveduras sob a ação do estresse fermentativo, visando compreender como a produção de metabólitos podem intervir na produção de etanol, este importante produto biotecnológico.

2 OBJETIVO

O estudo visou analisar a produção de glicerol e etanol de linhagens de leveduras para a produção de bioetanol, bem como avaliar o pH, condutividade e acidez total do mosto em diferentes condições fermentativas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas *Saccharomyces cerevisiae*: Catanduva-1 (CAT-1), utilizada nos parques industriais brasileiros para produção de etanol. A Red Star (RED) uma linhagem francesa. Essas leveduras se encontram disponíveis no Laboratório do Centro de pesquisa em Recursos Naturais – CERNA, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul-UEMS.

3.2 Coleta do mosto e Pré-inoculo

O mosto foi coletado em uma usina no Estado de Mato Grosso do Sul. A coleta foi realizada utilizando frascos estéreis e transportados a baixa temperatura - 4°C. O mosto foi filtrado em algodão e posteriormente em papel filtro, para o ajuste do teor de sólido solúvel (Brix) com o auxílio de uma proveta e um sacarímetro o mosto foi calibrado nas concentrações de (18°, 22° e 25°) Brix, para concentrar o mosto utilizou-se sacarose e para diluir água destilada.

No preparo do pré-inoculo, foi utilizado o meio YPD 2% em pH 5,0 contendo (extrato de levedo 1,0% (p/v), peptona 1,0% e glicose 2,0% (p/v), foram esterilizados em autoclave à 120°C por 20 minutos. Foram pesadas 0,10g de levedura e inoculadas no meio líquido YPD 2%, e com auxílio de uma proveta foram adicionadas em frascos de erlenmeyers de 125 mL contendo 25mL do meio. Os frascos foram incubados em “Shaker” por 10 horas na temperatura de 30°C a 250rpm. Após o crescimento as amostras foram coletadas e centrifugadas (800g, por 20 minutos), ressuspensas e lavadas por três vezes consecutivas em solução salina (0,85%) estéril e a biomassa celular obtida foi utilizada nos experimentos fermentativos.

3.3 Condições fermentativas

Os experimentos fermentativos foram realizados em mosto a base de caldo de cana, previamente calibrado nas concentrações de (18°, 22° e 25°) Brix, e sem correção do pH, foram adicionados em frascos de erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do mosto e esterilizado a 120°C por vinte minutos. A biomassa obtida foi reinoculada no meio fermentativo incubados em “shaker” nas temperaturas de 30°C e 40°C a 250 rpm. Em tempos determinados da fermentação (20, 40 e 60 horas), alíquotas foram retiradas para análises do consumo de aminoácidos.

3.4 Determinação do Glicerol

Para analisar a quantificação de glicerol, as alíquotas foram obtidas em diferentes tempos da fermentação e centrifugadas a (800g, por 20 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para obtenção do glicerol. A concentração de glicerol foi determinada a partir do kit enzimático para análise de triglicerídeos (Laborlab®, Guarulhos, SP), A metodologia consistiu em adicionar 10 µL de amostra, 500 µL de água destilada e 1 mL do reativo enzimático a um tubo de ensaio que foi incubado em banho-maria a 37°C durante 10 min. Após este período, a absorbância da amostra foi determinada a 505 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi obtida com soluções de glicerol PA na faixa de concentração de 0,05 a 0,80 g L⁻¹.

3.5 Determinação do etanol

A concentração do etanol foi determinada por cromatografia gasosa CG 3900, com detector de ionização de chama (Varian), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida, de 30 m de comprimento, 0,28 µm (ZB-5). A condição cromatográfica empregada foi: volume de injeção 1,0 mL, razão de split 1:20 com temperatura inicial de 90°C. Temperatura de injeção a 240°C e do detector a 240°C. As amostras foram filtradas em ultra-filtro de 0,22 µm.

3.6 Avaliação da condutividade

A condutividade foi analisada por condutivímetro de banca da marca Lucadema.

3.7 Análise do pH

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

3.8 Quantificação da acidez total

A acidez total do mosto foi realizada pelo método de titulação, sendo que para cada titulação utilizou-se 1,0 mL da amostra diluída em 50 mL de água destilada, adicionando 10 gotas de fenolftaleína, segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (1985).

A titulação foi realizada com a solução padrão de 0,1M de NaOH. Determinou-se a acidez total a partir da fórmula abaixo:

$$AcT = \frac{M \cdot Vg \cdot MM}{Va}$$

AcT- Acidez total

M-concentração molar do NaOH

Va- Volume da amostra titulada

Vg- Volume gasto na titulação de NaOH

MM-Massa molar de ácido acético- 60,05g mol^{-1}

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da produção de metabólitos durante a fermentação

A análise dos metabólitos secundários etanol e glicerol durante o processo fermentativo é uma prática importante de monitoramento, os quais são indicativos de que o processo está ocorrendo de forma eficiente ou se as leveduras não estão sofrendo a ação do estresse fermentativo (Tabela 1). A linhagem Catanduva-1 cultivada na temperatura de 30°C apresentou a maior produção de etanol 4,60% (v/v), no tempo de 40 horas de fermentação, na concentração de 22°Brix. Na análise de glicerol podemos observar que em (18° e 22°) Brix a produção de glicerol praticamente se manteve, no entanto, a maior produção deste metabólito foi de 0,44 g.L⁻¹ no substrato de 25°Brix no tempo de 60 horas de fermentação. A levedura Red Star apresentou a maior concentração de etanol 4,70%(v/v), no substrato de 18°Brix, no tempo de 40 horas de fermentação. Entretanto, podemos observar que ocorreu um acréscimo gradativo na produção de glicerol em todos os substratos analisados, apresentando a maior produção de 0,46 g.L⁻¹ na concentração de 25°Brix, no tempo mais prolongado da fermentação.

Na temperatura de 40°C a Catanduva-1 apresentou a maior produção de etanol 4,00% (v/v) em 18°Brix em 40 horas de fermentação, podemos observar que a concentração de glicerol praticamente manteve a produção nas concentrações de Brix analisadas. A levedura Red Star apresentou melhor desempenho fermentativo nos substratos de (22° e 25°) Brix com concentração de 5,0%(v/v) de etanol em 40 horas de fermentação. No entanto, podemos observar que ocorreu um aumento gradativo da produção

de glicerol entre 0,45 e 0,60 g.L⁻¹ em relação as concentrações de Brix e o tempo de fermentação.

Se comparar a produção dos metabólitos gerados pelas leveduras neste estudo observou-se que a linhagem Red Star, apresentou uma maior produção de etanol de, quando comparada com a levedura Catanduva-1, no tempo de 40 horas de fermentação nas temperaturas analisadas. No entanto podemos observar que em temperaturas mais elevadas e tempos mais prolongados da fermentação a Red Star apresentou maior produção de glicerol mostrando ser sensível a ação do estresse fermentativo.

As concentrações adequadas de nutrientes no mosto são importantes, pois, em quantidades insuficientes ou exageradas, pode refletir na produção de metabólitos e ocasionando perda no processo fermentativo. O aumento da concentração de açúcares, consequentemente, eleva a velocidade de fermentação, resultando em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menor quantidade de álcool (SOUZA & MONTEIRO, 2012). Na avaliação Moreira et al.(2015) utilizando linhagens de leveduras industriais cultivadas em mosto nas concentrações Brix (12°, 15°, 24° e 30°) na temperatura de 30°C por 8 horas de fermentação, os dados mostraram que ocorreu maior produção de etanol 8,5% (v/v), no substrato de 15° Brix para as leveduras industriais analisadas, bem como a perda, desse parâmetro nos substratos mais concentrados.

Segundo Masson et al. (2015) a produção de glicerol no processo fermentativo pode ser influenciado por vários fatores, tais como, a levedura utilizada, concentração de Brix, pH, temperatura e contaminação do meio. Estudos realizados em meio composto por melaço e caldo de cana na temperatura de 30°C, sendo o inóculo uma cultura mista de bactéria e uma levedura rugosa como contaminante (PE-2/52, PE-2/L. *fermentum*) e (PE-2/52/L. *fermentum*) com reciclo celular, os resultados mostraram que a produção de glicerol ocorreu na cultura mista e no meio melaço, de 3,3 g/mL(REIS, 2016). Possivelmente, os contaminantes e o melaço apresentaram maior concentração de Brix, tendo contribuído para a maior produção de glicerol, no entanto, valores alterados deste metabólico, é um dos indicativos de estresse celular.

Estudos realizados por Pereira et al.(2011), a produção de glicerol pode constituir vários mecanismos de adaptação, na qual permite que as células de leveduras possa lidar com o estresse que ocorre durante a fermentação. O glicerol é o osmorregulador mais

efetivo, presente em *S. cerevisiae* é produzido conseqüentemente em situação de estresse osmótico, pois, sua produção é aumentada em meios com baixa atividade de água e alta pressão osmótica determinada pela presença de soluto, tais como açúcares, e sais (GOMBERT & MARIS, 2015).

Os dados corroboram com a literatura, uma vez que as leveduras estudadas apresentaram pequenas diferenças na produção dos metabólitos analisados, sendo possível observar que a levedura Red Star mostrou ser mais sensível à ação do estresse fermentativo apresentando um acréscimo gradativo na produção de glicerol.



Tabela 1- Análise dos valores médios para etanol e glicerol em mosto a base de caldo de cana em diferentes condições de cultivo.

Temperatura 30°C		Catanduva-1			Red Star		
Variáveis	Tempo (h)	18°Brix	22°Brix	25° Brix	18° Brix	22° Brix	25° Brix
Etanol (%)	20	2,02 ± 0,11	3,20 ± 0,08	2,81 ± 0,08	2,81 ± 0,10	3,12 ± 0,08	2,91 ± 0,05
	40	4,15 ± 0,14	4,60 ± 0,05	4,02 ± 0,08	4,70 ± 0,22	4,50 ± 0,15	4,15 ± 0,13
	60	3,01 ± 0,14	3,10 ± 0,05	3,01 ± 0,08	3,01 ± 0,21	3,01 ± 0,08	2,91 ± 0,13
Glicerol (g.L ⁻¹)	20	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,44 ± 0,01
	40	0,42 ± 0,00	0,43 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,45 ± 0,00	0,45 ± 0,01
	60	0,43 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,45 ± 0,00	0,46 ± 0,00
Temperatura 40°C							
Etanol (%)	20	2,53 ± 0,08	2,81 ± 0,08	2,53 ± 0,19	2,42 ± 0,21	3,02 ± 0,12	3,01 ± 0,18
	40	4,00 ± 0,12	2,50 ± 0,08	3,50 ± 0,17	4,00 ± 0,27	5,00 ± 0,13	5,00 ± 0,23
	60	2,51 ± 0,08	2,51 ± 0,10	2,47 ± 0,18	2,01 ± 0,14	2,02 ± 0,14	2,03 ± 0,17
Glicerol (g.L ⁻¹)	20	0,42 ± 0,03	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,00	0,46 ± 0,02	0,47 ± 0,01
	40	0,42 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,48 ± 0,00	0,50 ± 0,01
	60	0,44 ± 0,01	0,46 ± 0,00	0,46 ± 0,00	0,45 ± 0,02	0,50 ± 0,00	0,60 ± 0,01

± = média de três leituras, seguida, do desvio padrão das amostras

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 Avaliação química do mosto em diferentes condições de cultivo

A condutividade, acidez e pH estão diretamente relacionados com o controle fermentação. Quanto ao pH, não diferiram entre as leveduras estudadas, apresentando pH 4,0 constante em todas as condições de fermentação analisadas. Já nas análises de acidez e condutividade, podemos observar que ocorreu diferença, no mosto durante a fermentação (Tabela 2).

A levedura Catanduva-1 cultivada na temperatura de 30°C apresentou a maior condutividade de 2,41 mS/cm pode-se observar que ocorreu um aumento gradativo em relação ao tempo de fermentação. Em relação à acidez o maior valor foi de 4,35g/L⁻¹ em 25°Brix em 60 horas de fermentação, no entanto, ocorreu aumento um aumento gradativo em relação ao substrato e tempo de fermentação. A levedura Red Star apresentou aumento gradativo para a condutividade e a acidez obtendo a maior concentração de 3,38mS/cm e 4,74g/L⁻¹, respectivamente, no substrato à 25°Brix e nos tempos mais prolongados de fermentação. Os dados mostraram que no mosto onde estas leveduras foram cultivadas ocorreram um maior transporte de ânions e cátions em todos os Brix e tempo de fermentação.

Na análise na temperatura de 40°C a Catanduva-1, apresentou maior aumento da condutividade de 3,28 mS/cm e acidez, de 4, 67g.L⁻¹ nas concentrações mais altas do substratos e no tempo de 60 horas de fermentação. A levedura Red Star apresentou uma queda na condutividade de 1,79mS/cm, e aumento da acidez de 4, 84g.L⁻¹, pode-se observar que isto ocorreu em todos os Brix e tempos de fermentação estudados.

No estudo destes parâmetros no mosto analisados pode observar que a linhagem Catanduva-1 cultivada a 30°C mostrou-se condutividade inferior do que quando cultivada a 40°C, apresentando maiores transportes de íons no mosto. No entanto, a levedura Red Star apresentou um comportamento diferenciado obtendo menores valores de condutividade, quando cultivada a 40°C. Já para a acidez a Catanduva-1 apresentou um aumento gradativo desta variável em relação aos substratos e tempos de fermentação. Isso pode ser observado para ambas as temperaturas, no entanto quando cultivada a 40°C ocorreu um maior aumento desta íons. A levedura Red Star mostrou um perfil semelhante a Catanduva-1, no que diz respeito a este comportamento.

Segundo Mora et al. (2006) a variação de ácidos e sais que compõem a solução do mosto pode determinar a condutividade, sendo que o aumento do transporte de cargas positivas e negativas, permite aumento da passagem de correntes elétrica durante a fermentação.

A condutividade indica a quantidade de mineral presente no mosto, no entanto a condutividade aceitável para a fermentação deve ser abaixo de $3,50 \mu\text{S/m}$ (PASCHOAL et al., 2011). Ainda de acordo com o mesmo autor a condutividade é influenciada pelo pH, sendo que se ocorrer um pH básico a condutividade poderá aumentar radicalmente. Desta forma a condutividade elétrica, acidez e o pH, estão diretamente relacionados com o controle fermentação.

Em estudos realizados por De Carvalho &Monteiro (2011), que compararam o teor de acidez com o grau de contaminação, em caldo de cana, os dados mostraram que tanto a acidez, como a contaminação em níveis elevados afetam o rendimento fermentativo. Já para Gomes et al. (2013) altas concentrações de açúcar, promovem o aumento da acidez e consequentemente, afetam o produto final.

Na avaliação da acidez em mosto de caldo de cana e de sorgo sacarino foi utilizada a concentração de 16° Brix com o inóculo da levedura FT-858 na temperatura de 30°C . Os resultados mostraram que o caldo de cana apresentou menor valor de acidez de $1,06 \text{ g.L}^{-1}$ e o maior sorgo $1,71 \text{ g.L}^{-1}$ (MASSON et al., 2015).

Os resultados estão de acordo com a literatura, observou-se que ocorreram diferenças entre a condutividade e a acidez no mosto durante o processo fermentativo, sendo que a condutividade variou entre, $1,37 \mu\text{S/m}$, foi relatado na literatura de $3,50 \mu\text{S/m}$, a acidez variou de $3,24$ a $4,84 \text{ g.L}^{-1}$, pode-se observar que isso ocorreu em altas concentrações de Brix e tempo prolongado da fermentação. No entanto, os índices dessas variáveis sofrem influência de inúmeros fatores durante o processo fermentativo, como temperatura contaminante, matéria prima substrato, entre outros, refletindo diretamente em maior ou menor quantidade, podendo alterar a composição do mosto e consequentemente a capacidade fermentativa das leveduras.



Tabela 2- Análise de condutividade, acidez total e pH, do mosto em diferentes condições de fermentativa

Temperatura 30°C		Catanduva-1			Red Star		
Variáveis	Tempo (h)	18°Brix	22°Brix	25° Brix	18° Brix	22° Brix	25° Brix
Condutividade (mS/cm)	20	1,85 ± 0,19	1,77 ± 0,07	1,52± 0,10	1,73 ± 0,35	1,62 ± 0,29	2,26 ± 0,20
	40	1,95 ± 0,11	1,90 ± 0,04	1,69 ± 0,23	1,84 ± 0,14	2,27 ± 0,21	2,31 ± 0,14
	60	2,41 ± 0,11	2,28 ± 0,07	1,78 ± 0,72	2,97 ± 0,07	3,00 ± 0,04	3,38 ± 0,02
Acidez total (g.L ⁻¹)	20	3,24 ± 0,09	3,62 ± 0,15	4,01 ± 0,14	3,26 ± 0,11	4,00 ± 0,16	3,99 ± 0,20
	40	3,58 ± 0,04	3,71 ± 0,23	4,14 ± 0,05	3,56 ± 0,04	4,17 ± 0,11	4,36 ± 0,08
	60	4,00 ± 0,18	4,14 ± 0,06	4,35 ± 0,13	4,25 ± 0,09	4,50 ± 0,20	4,74 ± 0,11
Temperatura 40°C							
Condutividade (mS/cm)	20	2,49 ± 0,21	2,71 ± 0,11	2,94 ± 0,07	1,46 ± 0,17	1,37 ± 0,06	1,21 ± 0,43
	40	2,68 ± 0,74	3,22 ± 0,06	3,06 ± 0,11	1,52 ± 0,21	1,62 ± 0,21	1,63 ± 0,13
	60	2,99 ± 0,41	3,19 ± 0,21	3,28 ± 0,13	1,84 ± 0,14	1,89 ± 0,11	1,79 ± 0,11
Acidez total (g.L ⁻¹)	20	3,50 ± 0,16	3,82 ± 0,13	4,01 ± 0,15	3,96 ± 0,05	4,05 ± 0,25	4,13 ± 0,02
	40	4,00 ± 0,15	4,35 ± 0,08	4,44 ± 0,05	4,41 ± 0,16	4,50 ± 0,20	4,42 ± 0,14
	60	4,32 ± 0,06	4,44 ± 0,09	4,67 ± 0,07	4,51 ± 0,12	4,64 ± 0,38	4,84 ± 0,05

± = média de três leituras, seguido desvio padrão das amostras

Fonte: Elaborada pelo autor

5 CONCLUSÕES

Em relação à produção de metabólitos, a levedura Catanduva-1 produziu menos etanol e manteve a produção de glicerol. Já a levedura Red Star apresentou melhor produção de etanol, no entanto, obteve um aumento gradativo da produção de glicerol, mostrando ter sofrido a ação do estresse fermentativo.

No que diz respeito aos parâmetros do mosto, concluiu-se que as leveduras Catanduva-1 e Red Star apresentaram maior acidez na temperatura de 40°C e nos tempos prolongados da fermentação e nas altas concentrações de Brix. Para a análise da condutividade, os resultados mostraram que no mosto cultivado com a Cantanduva-1 na temperatura de 40°C apresentaram a maiores valores, e menores para levedura a Red Star de íons no meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, T.O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPÍRITO-SANTO, J.C.A.; MULHER, G.; SCHLONG, P.S.; SILVA, C.P.; TONSO, A.; DARAN, J.; GOMBERT, A.K, MARIS, A.J.A.V, PRONK, J.T.; STAMBUK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v.13, p.694–703, 2011.

DE CARVALHO, G.G.; MONTEIRO, R.A.B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para a produção de etanol. **FAZU em Revista**, v.2, p. 47-54, 2011.

FERRI, A.; COSTA, M. A. S.; BATISTOTE, M.; NAKA, M. H. Análise do perfil de Q \[\[produção de etanol em usinas localizadas na região da Grande Dourados – MS. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 251-268, 2014.

GOMBERT, A.K.; MARIS, A.J. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**, v.33, p.81–86, 2015.

GOMES, F.; TAHARA, E. B.; BUSSO, C.; KOWALTOWSKI, A. J.; BARROS, H. 1 nde1 deletion improves mitochondrial DNA maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* coenzyme Q mutants. **Biochemical Journal**, v. 3, p.595-603, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25.

LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Yeast and its Importance to Wine Aroma. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 98- 128, 2000.

MASHEGO, M. R., RUMBOLD, K., DE MEY, M., VANDAMME, E., SOETAERT, W. & HEIJNEN, J. J. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. **Biotechnol Lett**,v. 29, p.1-16, 2007.

MASSON, I. D.S.; COSTA. G.H.G.; RAVIERO.J.P; FREITA. L.A.; MUTTON, M.A.; MUTTON, M.J.R.Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, v.45, p.1695-1700, 2015.

MOREIRA, S. C.; SANTOS. M. S. M.; BARROS, N.S.; CARDOSO, A. C.; BATISTOTE, M. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Revista Ciência e Natura**, v.3, p.55-63, 2015.

MORA, D.N.; SIHVENGER. J. C.; LUCAS, J. F R. **Apostila de Química Geral**. Paraná-PR. 2006. 4-6 p.

PASCHOAL, L.R.; TADEU, R.; DESTEFANO. Redução da acidez acética do etanol empregando bauxita termoativada. **Revista Alcool brás**, p.1-6, 2011.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. "Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular cellbiology**, v.13, p. 263-269, 2012.

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

REIS, V. R. **Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum***. 2016.132f. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP,2016.

ROCHFORT, S. Metabolomics reviewed: a new "Omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1813-1820, 2005.

SOUSA, J.L.U.; MONTEIRO, R.A.B. Fatores Interferentes na Fermentação Alcoólica para a Produção de Etanol.**FAZU em Revista**, v.2, p. 100-107, 2012.



VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; JORN, S.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spect**, v.24, p.613-646, 2004.

WIESIOLEK, C. C. **Alterações fisiológicas em *Saccharomyces cerevisiae* submetida a campo eletromagnético estático.** 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

ZHOU, B.; XIAO, J.F.; TULI, L.; RESSOM, H.W. LC-MS- Based Metabolomics, **Molecular BioSystems**, v.8, p.470-471, 2012.

4-CAPÍTULO-PERFIL DE ASSIMILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM *Saccharomyces cerevisiae* EM RESPOSTA AO ESTRESSE FERMENTATIVO

1 INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis têm sido utilizados visando diminuir o uso dos combustíveis fósseis. O processo de produção de etanol no Brasil a partir da cana-de-açúcar tem sido uma forma de bioprocessamento bem sucedida em larga escala, proporcionando um biocombustível a preços competitivos e de menor impactos ambientais (DELLA-BIANÇA & GOMBERT, 2013).

Para a produção de etanol no Brasil utiliza o mosto de melão, que é consumido como fonte de carbono pela levedura para a fermentação alcoólica, composto de 45 a 60% de sacarose e 5 a 20% de glicose e frutose. Sendo constituídos por água, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, proteínas e minerais (BASSO et al., 2011). No entanto, o mosto a base de caldo de cana também são os mais utilizados nas usinas para a produção de álcool, anidro ou hidratado.

Para a produção de etanol o mosto a base de caldo de cana, contribui para um menor custo de produção e apresenta uma alta concentração de sacarose, sendo de processamento fácil e rápido (CRAGO et al., 2010). Segundo Butzke & Park(2011), os compostos presentes no caldo são os carboidratos glicose, frutose e sacarose, e vitaminas (A, B1 e B6), dentre os aminoácidos presentes estão o ácido aspártico e glutâmico, as proteínas que sofrem hidrólise formando vários aminoácidos, tais como alanina, leucina, glicina, lisina, tiroxina, valina, isoleucina, entre outros.

No início da fermentação de mosto de uva, as leveduras de vinícola utilizam o nitrogênio dos sais de amônio para crescimento, e posteriormente nitrogênio dos aminoácidos livres. Dentre estes, particularmente, arginina, ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina, treonina e serina, são preferentemente assimilados (MORENO-ARRIBAS & POLO, 2009). É importante salientar que a presença de aminoácidos presentes no mosto depende de vários fatores tais como cultivar, clima, região geográfica, armazenamento e etapas de processamento (BARRADO et al., 2009).

No mundo, a produção de etanol é estimada em torno de 75 bilhões de litros anuais, perfazendo cerca de 95% é produzido através da hidrólise da sacarose presente na cana-de-açúcar, beterraba, milho por leveduras (SILVA, 2012; TIBAYRENC et al., 2011). No Brasil tem sido utilizadas leveduras selecionadas para serem as iniciadoras do processo fermentativo. Para Figueiredo (2012), os maiores rendimentos durante o processo ocorrem naqueles que utilizam linhagens de leveduras selecionadas para obtenção do etanol.

Estudos realizados por Amorim e Lopes (2013), apontam que 70% de todo o etanol do Brasil é produzido por linhagens selecionadas, ou seja, 16 bilhões de litros por ano. Dentre as leveduras industriais destacam-se PE-2, CAT-1, FT-858, BG-1 e SA-1. Estas leveduras foram selecionadas por apresentarem características de persistência e dominância nas fermentações industriais com reciclo de células ao longo da safra, e por apresentar alta capacidade fermentativa.

Nos processos biotecnológicos onde as *Saccharomyces cerevisiae* estão presentes, os meios de crescimento devem conter fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais minerais e vitaminas. Os principais compostos utilizados como fonte de carbono por levedura são os monossacarídeos (frutose, glicose e galactose) e os dissacarídeos (maltose e sacarose) e como fontes de nitrogênio, peptídeos, aminoácidos e sais de amônia (SANTOS et al., 2013). Uma mesma levedura pode apresentar diferentes comportamentos dependendo da composição do substrato utilizado durante o processo fermentativo (SANTOS et al., 2013).

Devido às inúmeras rotas metabólicas utilizadas pelas leveduras para a assimilação de nutriente durante o processo fermentativo, e como as condições de estresse quais são submetidas os agentes da fermentação durante o processo, interfere na captação destes nutrientes. Diante deste contexto estudos são necessários para avaliar a interação entre estas fontes de carbono e nitrogênio para um melhor entendimento do metabolismo das leveduras. Para tal é preciso conhecer melhor como cada levedura se comporta frente a assimilação destas fontes visando entender seus mecanismos e o que isto reflete na produção de etanol.

2 OBJETIVO

Analisar o perfil do consumo de aminoácidos presentes no mosto sob ação de estresse fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas *Saccharomyces cerevisiae*: Catanduva-1 (CAT-1), linhagem utilizada nos parques industriais brasileiros para produção de etanol. A levedura Red Star (RED) uma linhagem francesa. Essas linhagens se encontram disponíveis no Laboratório do Centro de Pesquisa em Recursos Naturais – CERNA, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul-UEMS.

3.2 Coleta do mosto e Pré-inoculo

O mosto foi coletado em uma usina no Estado de Mato Grosso do Sul. A coleta foi realizada utilizando frascos estéreis e transportados a baixa temperatura - 4°C. O mosto foi filtrado em algodão e posteriormente de papel filtro, para o ajuste do teor de sólido solúvel (Brix) foi realizado em uma proveta com o auxílio de um sacarímetro o mosto foi calibrado nas concentrações de (18°, 22° e 25°) Brix, para concentrar o mosto utilizou-se sacarose e para diluir água destilada.

No preparo do pré-inoculo, foi utilizado o meio YPD 2% em pH 5,0 contendo (extrato de levedo 1.0% (p/v), peptona 1.0% e glicose 2.0% (p/v), foram esterilizados em autoclave à 120°C por 20 minutos. Para o pré-inoculo foram pesadas 0,10g das linhagens e inoculadas no meio líquido YPD 2%, e com auxílio de uma proveta foram adicionadas em frascos de erlenmeyers de 125 mL contendo 50mL do meio. Os frascos foram incubados em “Shaker” por 10 horas na temperatura de 30°C a 250rpm. Após o crescimento as amostras foram coletadas e centrifugadas (800g, por 20 minutos), ressuspendidas e lavadas por três vezes consecutivas em solução salina (0,85%) estéril e a biomassa celular obtida foi utilizada nos experimentos fermentativos.

3.3 Condições fermentativas

Os experimentos fermentativos foram realizados em mosto à base de caldo de cana, previamente calibrado nas concentrações de (18°, 22° e 25°) Brix, e sem correção do pH, foram adicionados em frascos de erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do mosto e esterilizado a 120°C por vinte minutos. A biomassa obtida foi reinoculada no meio

fermentativo incubados em “shaker” nas temperatura de 30°C e 40°C e a 250 rpm. Em tempos determinados da fermentação (20, 40 e 60 horas), alíquotas foram retiradas para análise do consumo de aminoácidos.

3.4 Determinação dos aminoácidos

A identificação dos aminoácidos foi realizada empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e comparando os espectros de luz ultravioleta dos picos encontrados na análise do mosto, com os espectros padrões, analisados sob as mesmas condições. A técnica de CLAE foi realizada, a partir de um cromatógrafo líquido (LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de arranjo de diodos (DAD), usando uma coluna ODS HYPERSIL (C-18, 150 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro, Thermo Electron Corporation). O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel A constituída por uma solução 25Mm de ácido acético e 0,02% de azida de sódio em água ultra-pura, com ajuste de pH 6. A fase móvel B acetonitrila. As fases foram filtradas em membranas de nylon 0,20 µm. A coluna foi mantida a temperatura constante de 20°C e operada em fluxo de 0,9 ml/min. Os padrões foram analisados para obtenção das curvas analíticas, pelo método do padrão externo, nas mesmas condições empregadas para as amostras reais. Os dados obtidos nas análises padrões, em diferentes concentrações, foram utilizados para a construção das curvas analíticas e obtenção dos valores de A, B, R, respectivamente, coeficiente de correlação, coeficiente angular e coeficiente linear (Tabela 1).

Tabela 1. Gradiente de eluição para análises de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	96	4
3	88	12
13	88	12
30	69	31
35	69	31
40	96	4

Fonte: Elaborada Pelo Autor.

3.5 Análise estatística

Os dados foram expressos com a média dos grupos de análise dos aminoácidos. A análise estatística entre as diferenças significativas entre dois grupos foi obtida pelo teste (*Discriminant Function Analysis*). Para isso foram utilizados os valores das concentrações dos 7 aminoácidos encontrados no mosto. Esta análise é indicada porque revela um conjunto de variáveis que melhor diferenciam os grupos analisados (QUINN & KEOUGH, 2002) o que neste caso é representado pelos aminoácidos.

A diferença entre os tempos de fermentação e a temperatura foi indicada pelo valor de Wilks's Lambda, no qual, valores próximos a zero indicam que os grupos não se sobrepõem, e valores próximos a um indicam elevada sobreposição entre os grupos, com inexistência de diferença significativa entre eles.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil assimilação de aminoácidos por *Saccharomyces cerevisiae* sob condições de estresse fermentativo

Na análise do perfil de consumo de aminoácidos presentes no mosto em diferentes condições de cultivo, pode-se observar que as leveduras estudadas apresentaram diferenças em relação as concentrações e assimilação dos aminoácidos analisados (Tabelas 1e 2).

Observou-se que os aminoácidos presentes no mosto foram serina, treonina, alanina, valina, metionina, isoleucina e triptofano, no entanto, as concentrações mostraram-se diferentes entre as leveduras e estes foram consumidos nos tempos mais prolongados da fermentação. Sugere-se que as alterações ocorridas no consumo dos aminoácidos analisados estejam relacionadas a síntese de novos compostos à base de fontes nitrogenadas, uma vez que, estes nutrientes são fundamentais para o metabolismo das leveduras.

Durante o processo fermentativo os aminoácidos presentes no mosto são utilizados como nutrientes para o crescimento das leveduras, os quais são consumidos como fontes de nitrogênio durante o processo (SOUFLEROS et al., 2003). No entanto, em ambientes naturais as leveduras encontram uma grande diversidade de fontes de nitrogênio, as quais

podem ser consumidas, amônia, prolina, arginina e nitratos (CONTERNO et al., 2006; GODARD et al., 2007).

A levedura *Dekkera bruxellensis* contaminante do processo apresenta baixa capacidade fermentativa em relação a *S. cerevisiae*, é capaz de metabolizar inúmeras fontes de carbono glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose, celobiose e trealose, no entanto *D. bruxellensis* destaca-se pela capacidade de assimilar nitrato e nitrito como fontes de nitrogênio presente no mosto. Desta forma, os compostos nitrogenados são assimilados por *D.bruxellensis* para seu crescimento (PITA, 2009). Resultados obtidos por De Barros Pita et al. (2011) no que diz respeito a competição entre *D. bruxellensis* e *S.cerevisiae* mostrou que *D. bruxellensis* é capaz de superar a população de *S. cerevisiae* em meios contendo uma maior concentração denitrato.



Tabela 2- Concentração de aminoácidos, presente em mosto a base de caldo de cana em diferentes condições fermentativas da linhagem Catanduva-1.

Catanduva-1 Código	M ± DP*						
	Serina (10 ⁻⁴ g/L)	Treonina (10 ⁻⁵ g/L)	Alanina (10 ⁻⁵ g/L)	Valina (10 ⁻⁵ g/L)	Metionina (10 ⁻⁵ g/L)	Isoleucina (10 ⁻⁵ g/L)	Triptofano (10 ⁻⁵ g/L)
18°Brix-30°C-20 h	7,75 ± 0,12	3,88± 0,03	8,54 ± 0,08	7,73 ± 0,08	6,73± 0,04	1,74± 0,04	2,82 ± 0,09
18°Brix-30°C-40 h	7,33 ± 0,02	3,38 ± 0,01	8,29 ± 0,02	7,32 ± 0,02	6,32± 0,02	1,41± 0,02	2,47 ± 0,02
18°Brix-30°C-60 h	7,16± 0,08	3,19 ± 0,05	8,24 ± 0,12	7,83 ± 0,11	6,36± 0,09	1,31± 0,04	2,16 ± 0,10
22°Brix-30°C-20 h	7,76± 0,04	3,87 ± 0,03	8,53 ± 0,03	7,71 ± 0,03	6,71 ± 0,03	1,77 ± 0,08	2,82 ± 0,05
22°Brix-30°C-40 h	7,30± 0,05	3,31 ± 0,09	8,28 ± 0,08	7,34 ± 0,05	6,34 ± 0,05	1,43 ± 0,03	2,50 ± 0,05
22°Brix-30°C-60 h	7,19± 0,08	3,20 ± 0,07	8,20 ± 0,09	7,44 ± 0,08	6,44 ± 0,08	1,31 ± 0,05	2,15 ± 0,17
25°Brix-30°C-20 h	7,79± 0,07	3,88 ± 0,05	8,62 ± 0,03	7,73 ± 0,03	6,71 ± 0,02	1,75 ± 0,05	2,83 ± 0,07
25°Brix-30°C-40 h	7,40 ± 0,18	3,45 ± 0,21	8,30 ± 0,20	7,39 ± 0,20	6,38 ± 0,19	1,45 ± 0,12	2,51 ± 0,14
25°Brix-30°C-60 h	7,18± 0,07	3,17 ± 0,05	8,15 ± 0,07	7,36 ± 0,09	6,37 ± 0,06	1,29 ± 0,02	2,18 ± 0,07
18°Brix-40°C-20 h	7,84± 0,00	3,88 ± 0,02	8,48 ± 0,00	7,71 ± 0,04	7,71 ± 0,05	1,81 ± 0,05	2,76 ± 0,02
18°Brix-40°C-40 h	7,39± 0,02	3,38 ± 0,00	8,26 ± 0,02	7,36 ± 0,01	6,34 ± 0,02	1,44 ± 0,02	2,53 ± 0,00
18°Brix-40°C-60 h	7,09 ± 0,02	3,09 ± 0,03	8,09 ± 0,02	7,17 ± 0,06	6,17 ± 0,06	1,19 ± 0,03	2,16 ± 0,02
22°Brix-40°C-20 h	7,85± 0,03	3,85 ± 0,09	8,48 ± 0,00	7,77 ± 0,05	7,75 ± 0,05	1,81 ± 0,03	2,83 ± 0,04
22°Brix-40°C-40 h	7,33 ± 0,02	3,39 ± 0,03	8,30 ± 0,03	7,29 ± 0,01	6,29 ± 0,02	1,39 ± 0,00	2,46 ± 0
22°Brix-40°C-60 h	7,09 ± 0,03	3,11 ± 0,02	8,11 ± 0,02	7,16 ± 0,05	6,17 ± 0,04	1,21 ± 0,05	2,17 ± 0,00
25°Brix-40°C-20 h	7,86± 0,09	3,88 ± 0,04	8,53 ± 0	7,77 ± 0,11	7,77 ± 0,11	1,76 ± 0,11	2,78 ± 0,08
25°Brix-40°C-40 h	7,36± 0,03	3,37 ± 0,06	8,32 ± 0,05	7,34 ± 0,02	6,34 ± 0,02	1,42 ± 0,02	2,51 ± 0
25°Brix-40°C-60 h	7,12± 0,02	3,13 ± 0	8,12 ± 0,02	7,19 ± 0,04	6,18 ± 0,02	1,22 ± 0,03	2,12 ± 0,02

*± = média de três leituras, seguida, do desvio padrão das amostras

Fonte: Elaborada pelo autor



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

Tabela 3- Concentração de aminoácidos, presente em mosto a base de caldo de cana em diferentes condições fermentativas da linhagem Red Star

Red Star Código	M ± DP*						
	Serina (10 ⁻⁴ g/L)	Treonina (10 ⁻⁵ g/L)	Alanina (10 ⁻⁵ g/L)	Valina (10 ⁻⁵ g/L)	Metionina (10 ⁻⁵ g/L)	Isoleucina (10 ⁻⁵ g/L)	Triptofano (10 ⁻⁵ g/L)
18°Brix-30°C-20 h	10,26± 0,01	5,25± 0,04	10,21± 0,02	8,40 ± 0,02	7,40± 0,02	2,93± 0	3,76 ± 0,07
18°Brix-30°C-40 h	10,26 ± 0,01	5,25± 0,04	10,21± 0,02	8,40± 0,02	7,40± 0,02	2,93± 0	3,76± 0,07
18°Brix-30°C-60 h	9,13 ± 0,04	4,19± 0,05	9,10± 0,07	7,27± 0,07	6,27± 0,07	2,26± 0,05	3,31 ± 0,04
22°Brix-30°C-20 h	10,35 ± 0,09	5,25± 0,01	10,19 ± 0	8,40± 0,02	7,38± 0,02	2,98± 0,04	3,74± 0,02
22°Brix-30°C-40 h	9,53± 0,31	4,61± 0,30	9,36 ± 0,16	7,39 ± 0,17	6,40± 0,18	2,47± 0,24	3,47± 0,12
22°Brix-30°C-60 h	8,52± 1,21	4,23± 0,13	9,17± 0,09	7,33± 0,04	6,31± 0,04	2,32± 0,07	3,30± 0,06
25°Brix-30°C-20 h	10,40± 0,22	5,39 ± 0,28	10,29± 0,12	8,52 ± 0,18	7,52± 0,16	2,95± 0,06	3,77± 0,04
25°Brix-30°C-40 h	9,71± 0,03	4,78 ± 0,02	9,45 ± 0,02	7,48± 0,04	6,47± 0,02	2,64± 0,03	3,52± 0,02
25°Brix-30°C-60 h	8,52± 1,06	4,20± 0,09	9,15± 0,07	7,27± 0,01	6,27± 0,02	2,31 ± 0,06	3,35± 0,06
18°Brix-40°C-20 h	10,32± 0,03	5,33 ± 0,04	10,22± 0,04	8,34± 0,05	7,34 ± 0,05	2,89 ± 0,04	3,79± 0,05
18°Brix-40°C-40 h	9,73 ± 0,04	4,82± 0,03	9,44± 0,03	7,47± 0,03	6,51± 0,02	2,66± 0,02	3,56 ± 0,01
18°Brix-40°C-60 h	9,31± 0,03	4,27± 0,01	9,23± 0,02	7,37± 0,06	6,37± 0,06	2,32± 0,03	3,37± 0,07
22°Brix-40°C-20 h	10,27± 0,02	5,23± 0,03	10,20± 0,03	8,37± 0,03	7,40± 0,03	2,93 ± 0	3,73± 0,02
22°Brix-40°C-40 h	9,52± 0,23	4,65± 0,34	9,40± 0,11	7,41± 0,10	6,77± 0,45	2,57 ± 0,19	3,46 ± 0,08
22°Brix-40°C-60 h	9,31± 0,05	4,30 ± 0,05	9,28± 0,01	7,30± 0,005	6,64± 0,57	2,36± 0,04	3,42± 0,04
25°Brix-40°C-20 h	10,32± 0,04	5,33± 0,06	10,24± 0,05	8,35 ± 0,03	7,37± 0,05	2,88± 0,06	3,77 ± 0,10
25°Brix-40°C-40 h	9,73± 0,02	4,81± 0,04	9,44± 0,02	7,51± 0,02	6,53± 0,05	2,66 ± 0,02	3,55 ± 0,02
25°Brix-40°C-60 h	9,32± 0,05	4,30± 0,03	9,28± 0,00	7,36 ± 0,08	6,34 ± 0,03	2,38 ± 0,06	3,42± 0,04

*± = média de três leituras, seguida, do desvio padrão das amostras

Fonte: Elaborada pelo autor

A partir das análises dos dados brutos foi possível identificar que a concentração apresentou valores muito similares, fazendo com que esta não fosse um parâmetro para diferenciar os grupos. Sendo assim, para avaliar se a concentração dos aminoácidos, influenciam na separação dos grupos, foi levado em conta somente o tempo de fermentação e a temperatura do mosto para cada uma das linhagens de leveduras analisadas.

Para a linhagem Catanduva-1, a análise discriminante demonstra diferenças significativas na concentração de aminoácidos ao longo do tempo de fermentação (Wilks' lambda=0,000; F=53,028; p<=0,0000) no qual, é possível observar nítida separação dos grupos (Figura1) em função do tempo, a variável temperatura foi determinante, exceto para o tempo de 20 horas de fermentação que houve separação nítida dos grupos. A primeira raiz canônica explicando 90,7% da separação dos grupos e a segunda 0,9% e os aminoácidos significativos para a separação foram a valina, metionina e a serina.

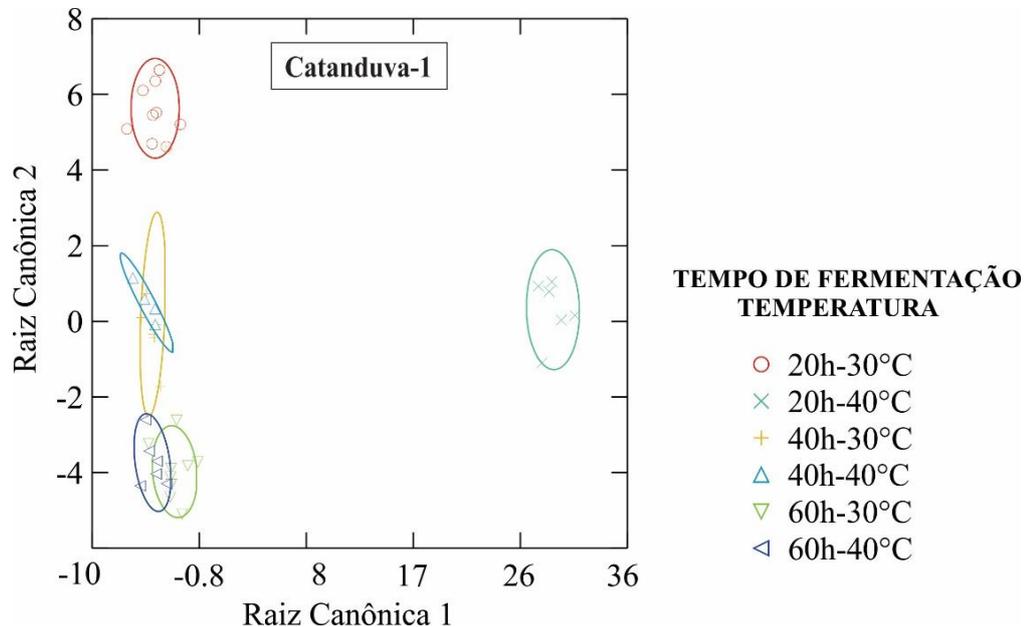


Figura 1. Diagrama de dispersão dos resultados das análises discriminantes mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação entre os tempos de fermentação e a temperatura da linhagem Catanduva-1, de acordo com as concentrações de aminoácidos.

Podemos observar que o mesmo ocorreu para a linhagem Red Star (Wilks' $\lambda=0,001$; $F=41,936$; $p \leq 0,0000$) apresentando diferença significativa, no qual as elipses do gráfico de dispersão se apresentam nitidamente separadas em função do tempo de fermentação (Figura. 2), em nenhum momento a temperatura influenciou no desempenho dos aminoácidos nessa linhagem de levedura. A primeira raiz canônica explicou 97% da separação e a segunda 0,2%, sendo a concentração dos seguintes aminoácidos responsáveis por essa separação: alanina, treonina e o triptofano.

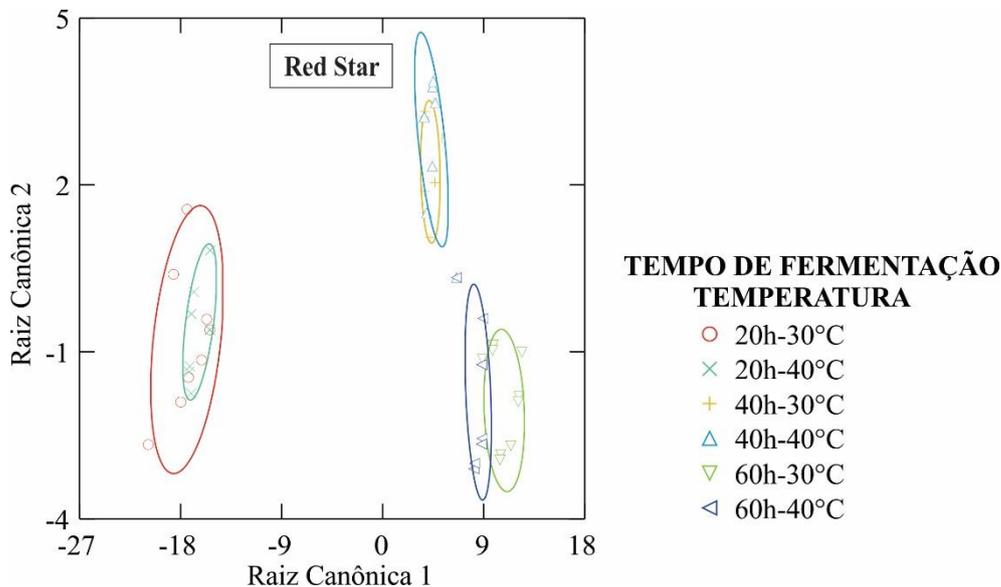


Figura 2. Diagrama de dispersão dos resultados das análises discriminantes mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação entre os tempos de fermentação e a temperatura da linhagem Catanduva-1, de acordo com as concentrações de aminoácidos.

Estudos realizados por Lei et al. (2013) analisando o efeito da assimilação de aminoácidos livres em mosto de produção de cerveja suplementado por três proteases e livre de suplementação utilizando a levedura *Saccharomyces pastorianus*, mostraram que os aminoácidos triptofano e asparagina foram assimilados tanto para a fermentação livre de suplementação e para a suplementada, porém, a glicina e alanina não foram consumidos pela levedura nas condições analisadas.

Estudos realizados por Simancas et al. (2015) em mosto sintético de uva ao qual foram adicionados vinte aminoácidos, dois grupos de leveduras foram testadas, as selvagens (W16, W34 e W35) e as comerciais (C5 e C11). Para tal análise utilizou-se a técnica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e os resultados mostraram que as leveduras comerciais apresentaram maior consumo de aminoácidos em relação as selvagens. Os nossos resultados corroboram com a literatura mostrando que técnica CLAE tem sido uma importante ferramenta de análise qualitativa e quantitativa no que diz respeito a assimilação de aminoácidos por levedura presente no mosto.

Estudos realizados por Pereira et al. (2015) em mosto de produção de cachaça, avaliou a influência de duas linhagens de levedura (Saflager) de baixa fermentação e (Safbrew) de alta fermentação em três fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, peptona e caseína), sendo as amostras analisadas por cromatografia gasosa. Os dados mostraram que levedura Saflager produziu menor concentração de etanol na presença de sulfato de amônio. No entanto, na presença das fontes nitrogenadas peptona e caseína a levedura Safbrew obteve maior produção de etanol. Os autores observaram que a levedura de alta fermentação não assimilou estes mesmos nutrientes. Isto nos leva a concluir que as leveduras assimilam as fontes nitrogenadas de formas diferentes em função de seu metabolismo, e esse fato está diretamente relacionados com a produção de etanol.

Pode-se observar através dos relatos da literatura e dos estes resultados que a assimilação das fontes de carbono e nitrogênio são mecanismos complexos no que diz respeito a leveduras de mesmo gênero e espécie, bem como, de gênero e espécies diferentes, que estas utilizam inúmeras fontes de carbono bem como aminoácidos livres e inúmeros compostos nitrogenados, visando manter seu metabolismo e sua integridade viva.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que os aminoácidos encontrados em maior concentração no mosto foram: a serina, alanina, valina e a metionina, no entanto o perfil de assimilação dos aminoácidos ocorreu de forma semelhante para ambas as linhagens, no final da fermentação.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, mostrou ser uma eficiente ferramenta para detectar a concentração de aminoácidos no mosto a base de caldo de cana. A análise discriminante apresentou diferenças metabólicas significativas na concentração dos aminoácidos, em relação ao tempo de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ciências e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol, Simpósio Micro-organismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos. **Anais** Embrapa Agroenergia. Brasília, novembro, 2013.

BARRADO, E.; RODRIGUEZ, J. A.; CASTRILLEJO, Y. Determination of primary amino acids in wines by high performance liquid magnet-chromatography. **Talanta**, Seattle, v. 78, p. 672-675, 2009.

BASSO, T.O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPÍRITO-SANTO, J.C.A.; MULHER, G.; SCHLONG, P.S.; SILVA, C.P.; TONSO, A.; DARAN, J.; GOMBERT, A.K, MARIS, A.J.A.V, PRONK, J.T.; STAMBUK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improve dethanol yield. **Metabolic Engineering**, v.13, p.694–703, 2011.

BUTZKE, C. E., PARK, S. K. Impact of Fermentation Rate Changes on Potential Hydrogen Sulfide Concentrations in Wine. **Journal Microbiol Biotechnol**, v. 21, p. 519–524, 2011.

CRAGO, C. L.; KHANNA, M.; BARTON, J.; GIULIANI, E.; AMARAL, W. Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. **Energy Policy**, v. 38, p. 7404-7415, 2010.

CONTERNO, L.; JOSEPH, C.; ARVIK, T. J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, p. 139-147, 2006.

DELLA-BIANCA, B.E.; GOMBERT, A.K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 1083–1095, 2013

DE BARROS PITA, W.; LEITE, F. C. B.; DE SOUZA LIBERAL, A. T.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* and *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.100, p. 99-107, 2011.

FIGUEIREDO, C.M. **Estudo da influência do gene *FLO8* em fenótipos de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em processos de produção de etanol combustível no Brasil.** 2012.113 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de São Paulo-SP, 2012.

GODARD, P.; URRESTARAZU, A.; VISSERS, S.; KONTOS, K.; BONTEMPI, G.; VAN HELDEN, J.; ANDRÉ, B. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, p. 3065, 2007.

LEI, H.; ZHENG, L.; WANG, C.; ZHAO, H. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v.161, p.76-83, 2013.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Special wines production.** Wine Chemistry and Biochemistry. Madrid: Springer. Springer-Verlag Nova Iorque 2009, 59p.

PEREIRA, A. F.; SILVA, P. H. A.; PINHEIRO, P. F.; BRAGA, L. M.; BRAGA, PINHEIRO, C. A. Adição de fontes de nitrogênio e de duas linhagens de levedura na fermentação alcoólica para produção de cachaça. **Revista de Engenharia Química e Química**, v. 1, p.45-59, 2015.

PITA, W. D. B. **Análise da expressão dos genes relacionados à assimilação do nitrato na levedura *Dekkera bruxellensis*.** 2009. 69f Dissertação (Mestrado Genética) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

QUINN, G.; KEOUGH, M. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists.** Cambridge, UK: Cambridge University Press, 509p, 2002.

SANTOS, E.F. S.; SCHAUTZ, L.C.A.; CARDOSO, C.A.L.; ERNANDES, JR.; BATISTOTE, M. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. **Ciência e Natura**, v. 2, p.09-014, 2013.

SILVA, D.F.C. **Análise por técnica de RDA (Representation al Difference Analysis) da expressão gênica diferencial, para a identificação de fatores genéticos associados à produção de etanol em linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara-SP, 2012.

SOUFLEROS, E. H.; BOULOUMPASI, E.; TSARCHOPOULOS C.; BILIADERIS C.G. Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. **Food Chemistr Reading**, v. 80, p. 261-273, 2003.



SIMANCAS, N.B.; GIESE, E.; ARÉVALO-VILLENA, M.; ÚBEDA, J.; BRIONES, A. Amino acid uptake by wild and commercial yeasts in single fermentations and co-fermentations. **Food Chemistry**. v. 127, p. 441–446, 2015.

TIBAYRENC, P.; BELLOY, L.P.; GHOMMIDH, C. Single-cell analysis of *S. cerevisiae* growth recovery after a sublethal heat-stress applied during an alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 687, 2011.