



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

***SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE TREALOSE E
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO UTILIZANDO ESTRATÉGIAS
SEQÜENCIAIS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL***

Eliane Colla
Doutoranda

Profª Drª Maria Isabel Rodrigues
Orientadora

**Tese de doutorado
apresentada à comissão de pós-
graduação da Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de Doutor
em ENGENHARIA DE ALIMENTOS.**

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C683s	Colla, Eliane Seleção de leveduras produtoras de trealose e otimização da produção utilizando estratégias sequenciais de planejamento experimental / Eliane Colla. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientador: Maria Isabel Rodrigues Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos 1. Produção de trealose. 2. Leveduras. 3. Estresse térmico. 4. Substratos industriais. 5. Planejamento experimental. I. Rodrigues, Maria Isabel. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.
-------	--

(cars/fea)

Titulo em inglês: Screening for trehalose producing yeasts and optimization of production following a sequential strategy of experimental design

Palavras-chave em inglês (Keywords): Trehalose production, Yeast, Thermal stress, Raw materials, Experimental design

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Maria Isabel Rodrigues

Eliana Setsuko Kamimura

Helen Treichel

Maria da Graça Stupiello Andrietta

Lúcia Regina Durrant

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Maria Isabel Rodrigues
Orientadora – FEA/UNICAMP

Profª Drª Eliana Setsuko Kamimura
Membro Titular – FZEA/USP

Profª Drª Lúcia Regina Durrant
Membro Titular – FEA/UNICAMP

Profª Drª Helen Treichel
Membro Titular – URI/Campus de Erechim

Drª Maria da Graça Stupiello Andrietta
Membro Titular – CPQBA/UNICAMP

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves
Membro Suplente – Depto. Ciência dos Alimentos/UFLA

Profª Drª Gabriela Alves Macedo
Membro Suplente – FEA/UNICAMP

Drª Saartje Hernalsteens
Membro Suplente – FEQ/UNICAMP

“Não vos ensoberbais do que sabeis, porquanto esse saber tem limites muito estreitos no mundo em que habitais”.

Evangelho Segundo o Espiritismo – “Missão do homem inteligente na terra”.

“Temei em permanecer indiferentes, quando puderdes ser úteis. A tranqüilidade comprada a custo de uma indiferença é aquela do mar morto, que esconde no fundo de suas águas o esgoto fétido e a corrupção”

Evangelho Segundo o Espiritismo – “Capítulo XIII - A Piedade”.

“O que se tem, pode-se perder; normalmente passa de mão, preocupa e desaparece. Todavia, o que se é, quanto às conquistas morais e aos títulos espirituais, tem sabor de eternidade”.

(Joanna de Angelis - Divaldo Pereira Franco)

Se buscas a paz do coração e a alegria de viver, aprende a compreender os objetivos da tua existência, servindo sempre. Sempre que se te enseje oportunidade de servir, de construir, de auxiliar, de olvidar os prejuízos que te hajam causado, não te detenhas ante o prazer de realizá-los, disputando a honra de ser aquele que sempre está à disposição de todos na aduana da fraternidade”.

(Joanna de Angelis- Divaldo Pereira Franco)

Aos meus pais, Antônio e Ana

A minha irmã Luciane

Ao meu marido Dani

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela valiosa oportunidade de aprimoramento desta existência;

A minha família, pelo apoio constante e, em especial ao Dani, pelo incentivo diário;

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela acolhida no meu desenvolvimento profissional e pessoal e as agências de fomento a pesquisa, em especial ao CNPq, pelas bolsas de doutorado e de iniciação científica;

A Bel (Prof^a Dr^a Maria Isabel Rodrigues), minha amiga, por orientar este trabalho, pela confiança em mim depositada e, especialmente, por ser um exemplo de força, determinação e coragem no amparo às crianças carentes de Campinas, necessitadas de carinho, afeto e dignidade;

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri, pela prontidão eu auxiliar, pela convivência, pelo exemplo de vida e virtudes;

A Fifa (Dr^a Fátima A. de Almeida Costa), pelo auxílio no laboratório, paciência e respeito;

A doce Angélica, por me auxiliar como aluna de iniciação científica, nos longos dias de trabalho no laboratório... Pela paciência nos dias de cansaço;

Aos componentes da banca de avaliação deste trabalho, Prof^a Dr^a Eliana Kamimura, Prof^a Dr^a Helen Treichel, Prof^a Dr^a Lúcia Regina Durrant, Dr^a Maria da Graça Stupiello Andrietta, Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves, Prof^a Dr^a Gabriela Alves Macedo, Dr^a Saartje Hermalsteens, por aceitarem fazer parte da banca examinadora e pelas correções e sugestões pertinentes ao aprimoramento deste trabalho;

Aos colegas do LEB: Daniel, Bernardo, Guilherme, Abraão, Olga, Geraldo, Elizama, Mônica, Lílian, Remi, Pedro, Andrea, Felipe, Marcus, Saartje, em especial ao Geraldo, pela sua disposição em me ajudar.... Obrigada pelos doces momentos de convívio, pelo aprendizado diário, amizade e companheirismo;

Aos amigos Bia e Machadinho, Camila, Lucielen, Raquel, Rosana, Cris e Rodi, Mylene e Rodrigo, Veri e Flávio, Nirse e Wangles, pela companhia em Campinas, pela amizade, pelos dias felizes...

Obrigada a todos que de alguma forma me auxiliaram nos momentos de desânimo e cansaço, aos quais não conseguirei nomear, mas que deixaram suas marcas de amizade e companheirismo.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 BIODIVERSIDADE E MICRORGANISMOS.....	7
3.2 LEVEDURAS EM BIOPROCESSOS	8
3.3 TREALOSE: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E OCORRÊNCIA.....	11
3.4 MECANISMOS DE PROTEÇÃO E APLICAÇÕES DA TREALOSE.....	13
3.5 METABOLISMO DA TREALOSE EM LEVEDURAS.....	17
3.6 PRODUÇÃO DE TREALOSE E FATORES QUE FAVORECEM O ACÚMULO	21
3.7 EXTRAÇÃO DA TREALOSE DE CÉLULAS DE LEVEDURAS.....	24
3.8 USO DE TÉCNICAS SEQUENCIAIS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DE PROCESSOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 MICRORGANISMOS.....	30
4.2 OBTENÇÃO DOS INÓCULOS.....	31
4.3 SELEÇÃO DAS LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE TREALOSE	31
4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	32
4.5 ESTRATÉGIA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DE TREALOSE...32	
4.5.1 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DAS LEVEDURAS.....	33
4.5.2 PRODUÇÃO DE TREALOSE SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO	34
4.5.3 ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA	36
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
4.6.1 CONCENTRAÇÃO DE MASSA SECA	36
4.6.2 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA TREALOSE - MÉTODO DE ANTRONA.....	37
4.6.3 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA TREALOSE - MÉTODO ENZIMÁTICO	37
4.6.4 AÇÚCARES REDUTORES E TOTAIS	38

4.6.5 pH.....	38
4.6.6 VIABILIDADE CELULAR.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE TREALOSE.....	39
5.1.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS: CEPAS AAQ ₇ E AAG ₁₂	46
5.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE PELA LEVEDURA <i>Rhodotorula dairenensis</i>	51
5.2.1 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR – <i>Rhodotorula dairenensis</i>	51
5.2.1.1 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO	51
5.2.1.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	54
5.2.2 DEFINIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE TREALOSE POR <i>Rhodotorula dairenensis</i>	58
5.2.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE POR <i>Rhodotorula dairenensis</i> EM FRASCOS AGITADOS	61
5.2.3.1 PRIMEIRO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE – <i>Rhodotorula dairenensis</i>	61
5.2.3.2 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE TREALOSE – <i>Rhodotorula dairenensis</i>	68
5.2.3.3 SEGUNDO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE – <i>Rhodotorula dairenensis</i>	73
5.2.3.4 ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA – <i>Rhodotorula dairenensis</i>	76
5.3 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE PELA LEVEDURA <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	81
5.3.1 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR - <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	81
5.3.1.1 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO	81
5.3.1.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL.....	83
5.3.2 DEFINIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE TREALOSE POR <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	89
5.3.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE POR <i>Rhodospiridium paludigenum</i> EM FRASCOS AGITADOS	92
5.3.3.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE TREALOSE – <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	97
6 CONCLUSÕES.....	103
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição do meio GYMP.....	31
Tabela 4.2 - Composição aproximada dos substratos industriais.....	33
Tabela 4.3 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fracionário.....	34
Tabela 4.4 - Variáveis do DCCR para o estudo da produção de trealose (níveis reais e codificados)	35
Tabela 5.1 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 0 - 1% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).....	39
Tabela 5.2 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 1 - 5% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).....	41
Tabela 5.3 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 5 - 10% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).....	42
Tabela 5.4 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 15 - 20% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).....	42
Tabela 5.5 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 20 - 30% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).....	43
Tabela 5.6 - Ocorrência observada para as 209 leveduras testadas ^a em diferentes faixas de produção de trealose (%) (g/100g massa seca).....	44
Tabela 5.7 - Seqüências de nucleotídeos obtidas na identificação das cepas AAQ ₇ e AAG ₁₂	46
Tabela 5.8 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2 ⁵⁻¹ (valores reais e codificados) com as respostas de M.S (g/L) para a levedura <i>Rhodotorula dairenensis</i>	52
Tabela 5.9 - Efeito dos fatores estudados no planejamento fracionário 2 ⁵⁻¹ sobre a concentração de M.S (g/L) da levedura <i>Rhodotorula dairenensis</i>	52
Tabela 5.10 - Matriz do DCCR com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de M.S (g/L), valores preditos pelo modelo e desvios relativos, para a levedura <i>Rhodotorula dairenensis</i>	55
Tabela 5.11 - Coeficientes de regressão para a resposta de M.S (g/L) da levedura <i>Rhodotorula dairenensis</i>	55
Tabela 5.12 - ANOVA do modelo quadrático para predição da M.S (g/L) de <i>Rhodotorula dairenensis</i>	56
Tabela 5.13 - Resultados de M.S (g/L) e trealose (%) para os ensaios 1, 4 e central do DCCR realizado para otimização do crescimento celular de <i>Rhodotorula dairenensis</i>	59
Tabela 5.14 - Matriz do primeiro DCCR para otimização da produção de trealose por <i>Rhodotorula dairenensis</i> - níveis reais e codificados das variáveis e respostas de trealose (%)... ..	61
Tabela 5.15 - Coeficientes de regressão para a resposta de trealose intracelular (%) para <i>Rhodotorula dairenensis</i> obtidos no primeiro DCCR.	62
Tabela 5.16 - ANOVA do modelo quadrático para predição de trealose (%) por <i>Rhodotorula dairenensis</i> obtido no primeiro DCCR.....	63
Tabela 5.17 - Resultados obtidos para a aplicação do estresse térmico em 15 horas de fermentação.....	69
Tabela 5.18 - Resultados obtidos para a aplicação do estresse térmico em 20 horas de fermentação.....	69

Tabela 5.19 - Resultados obtidos para a aplicação do estresse térmico em 25 horas de fermentação.	70
Tabela 5.20 - Resultados obtidos para a aplicação do estresse térmico em 30 horas de fermentação.	70
Tabela 5.21 - Matriz do segundo DCCR para otimização da produção de trealose por <i>Rhodotorula dairenensis</i> - níveis reais e codificados das variáveis e respostas de trealose (%)...	74
Tabela 5.22 - Coeficientes de regressão para a resposta de trealose intracelular (%) para <i>Rhodotorula dairenensis</i> obtidos no segundo DCCR.....	75
Tabela 5.23 - ANOVA do modelo quadrático para predição de trealose (%) por <i>Rhodotorula dairenensis</i> obtido no segundo DCCR.....	75
Tabela 5.24 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} (valores reais e codificados) com as respostas de M.S (g/L) para a levedura <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	82
Tabela 5.25 - Efeitos dos fatores estudados no planejamento fracionário 2^{5-1} sobre a concentração de M.S (g/L) da levedura <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	82
Tabela 5.26 - Matriz do DCCR com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de M.S (g/L), valores preditos pelo modelo e desvios relativos, para a levedura <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	84
Tabela 5.27 - Coeficientes de regressão para a resposta de M.S (g/L) da levedura <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	85
Tabela 5.28 - ANOVA do modelo quadrático para predição da M.S (g/L) de <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	85
Tabela 5.29 - Ensaios para definição da concentração de AMM no cultivo de <i>Rhodospiridium paludigenum</i> com os resultados de M.S. (g/L).....	87
Tabela 5.30 - Resultados de M.S (g/L) e trealose (%) dos ensaios realizados para definição do meio de cultivo para produção de trealose por <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	90
Tabela 5.31 - Matriz do DCCR realizado para otimização da produção de trealose por <i>Rhodospiridium paludigenum</i> com níveis reais e codificados das variáveis e respostas de trealose (%).....	92
Tabela 5.32 - Coeficientes de regressão para a resposta de trealose intracelular (%) para <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	93
Tabela 5.33 - ANOVA do modelo quadrático para predição de trealose (%) por <i>Rhodospiridium paludigenum</i>	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 - Esquema estrutural da molécula de Trealose.....	12
Figura 3.2 - Mecanismo de proteção das proteínas pela trealose.....	14
Figura 3.3 - Biosíntese da trealose em leveduras.....	19
Figura 4.1 - Fluxograma das etapas desenvolvidas.....	29
Figura 4.2 - Regiões em que foram coletadas as amostras para isolamento, com respectivos números de leveduras testadas para cada região.....	30
Figura 5.1 - Distribuição do número de leveduras testadas nos biomas de origem e ocorrência nas faixas de produção de trealose (g/100g de massa seca) observadas.....	44
Figura 5.2 – Colônias de <i>Rhodotorula dairenensis</i> em agar GYMP (a) e microscopia ótica (b) após 3 dias de cultivo.....	47
Figura 5.3 - Colônias de <i>Rhodospiridium paludigenum</i> em agar GYMP (a) e microscopia ótica das células (b) após 3 dias de cultivo.....	47
Figura 5.4 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para Massa Seca (g/L) em função das concentrações de melação e AMM, para a levedura <i>Rhodotorula dairenensis</i>	57
Figura 5.5 - Acompanhamento do crescimento celular (massa seca), pH e consumo de açúcares redutores (AR) e totais (ART) para o cultivo de <i>Rhodotorula dairenensis</i> em meio com 50 g/L de melação e AMM, a 30°C.....	60
Figura 5.6 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a trealose (%) em função da temperatura (°C) e tempo de exposição (min) ao estresse térmico para <i>Rhodotorula dairenensis</i> , obtidas no primeiro DCCR.....	63
Figura 5.7 – Acompanhamento do acúmulo de trealose, crescimento celular (massa seca), pH e consumo de açúcares redutores (AR) e totais (ART) para o cultivo de <i>Rhodotorula dairenensis</i> simultâneo ao cultivo utilizado nos ensaios do DCCR.....	67
Figura 5.8 – Esquema dos ensaios realizados para a cinética de produção de trealose por <i>Rhodotorula dairenensis</i>	68
Figura 5.9 – Variação no teor de trealose (%) da levedura <i>Rhodotorula dairenensis</i> em função da temperatura (°C) e do tempo de exposição ao estresse térmico (min) para os tempos de fermentação de: (a) 15 horas; (b) 20 horas; (c) 25 horas; (d) 30 horas.....	72
Figura 5.10 - Trealose (%) em função do tempo de fermentação (h) na condição de estresse térmico de 45°C e tempos de exposição de 60, 90 e 120 min para <i>Rhodotorula dairenensis</i>	72
Figura 5.11 – Acompanhamento do crescimento celular (M.S) (g/L) em função do tempo(h) para o cultivo de <i>Rhodotorula dairenensis</i> utilizado nos ensaios da cinética.....	73
Figura 5.12 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a trealose (%) em função da temperatura (°C) e tempo de exposição (min) ao estresse térmico para <i>Rhodotorula dairenensis</i> , obtidas no segundo DCCR.....	75
Figura 5.13 – Cinética da produção de trealose por <i>Rhodotorula dairenensis</i> em fermentador de bancada, para a Fermentação 1 . Condições: 30°C, 400 rpm, aeração de 1,0 vvm, 50 g/L de melação e 50 g/L de AMM.....	77
Figura 5.14 – Cinética da produção de trealose por <i>Rhodotorula dairenensis</i> em fermentador de bancada, para a Fermentação 2 . Condições: 30°C, 400 rpm, aeração de 1,0 vvm, 50 g/L de melação e 50 g/L de AMM.....	77

Figura 5.15 – Cinética da produção de trealose por <i>Rhodotorula dairenensis</i> em fermentador de bancada, para a Fermentação 3 . Condições: 30°C, 400 rpm, aeração de 1,0 vvm, 50 g/L de melação e 50 g/L de AMM.....	78
Figura 5.16 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para Massa Seca (g/L) em função das concentrações de melação e AMM, para a levedura <i>Rhodospordium paludigenum</i>	86
Figura 5.17 – Acompanhamento da Massa Seca (g/L) da levedura <i>Rhodospordium paludigenum</i> em função da concentração de AMM. As barras de erro indicam o erro padrão de triplicatas.....	88
Figura 5.18 - Acompanhamento do crescimento celular (massa seca), pH e consumo de açúcares redutores (AR) e totais (ART) para o cultivo de <i>Rhodospordium paludigenum</i> em meio com 50 g/L de melação e 140 g/L de AMM, a 25°C.....	91
Figura 5.19 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a trealose (%) em função da temperatura (°C) e tempo de exposição (min) ao estresse térmico para <i>Rhodospordium paludigenum</i>	95
Figura 5.20 – Acompanhamento do acúmulo de trealose, crescimento celular (massa seca), pH e consumo de açúcares redutores (AR) e totais (ART) para o cultivo de <i>Rhodospordium paludigenum</i> simultâneo ao cultivo utilizado nos ensaios do DCCR.....	95
Figura 5.21 – Esquema dos ensaios realizados para a cinética de produção de trealose por <i>Rhodospordium paludigenum</i>	97
Figura 5.22 – Efeito da temperatura de estresse térmico sobre o teor de trealose (%) da levedura <i>Rhodospordium paludigenum</i> em função do tempo de fermentação (h).....	98
Figura 5.23 – Efeito da temperatura de estresse térmico sobre a concentração de massa seca (g/L) da levedura <i>Rhodospordium paludigenum</i> em função do tempo de fermentação (h).....	98
Figura 5.24 – Efeito da temperatura de estresse térmico sobre a viabilidade celular (%) da levedura <i>Rhodospordium paludigenum</i> em função do tempo de fermentação (h).....	99
Figura 5.25 – Acompanhamento do acúmulo de trealose, crescimento celular (massa seca), pH e consumo de açúcares redutores (AR) e totais (ART) para o cultivo de <i>Rhodospordium paludigenum</i> utilizado nos ensaios da cinética.....	101

RESUMO

A trealose é um agente natural de proteção em células de leveduras, fungos, bactérias, insetos e plantas, tendo sido indicada como componente essencial para a manutenção da viabilidade celular sob condições de estresse. Em função das diversas possibilidades de aplicação, especialmente em produtos de alto valor agregado como cosméticos e produtos farmacêuticos, onde pode exercer a função de estabilização e de proteção, a produção da trealose tem motivado inúmeras pesquisas. O objetivo principal deste trabalho foi selecionar leveduras potencialmente produtoras de trealose e otimizar as condições de produção utilizando meios de cultivo alternativos para a redução dos custos do processo. A primeira etapa consistiu na seleção de leveduras potencialmente produtoras de trealose, na qual foram testadas cepas isoladas de flores e frutos coletados no Cerrado (GO), Pantanal (MS), Floresta Amazônica (AM) e Mata Atlântica (SP), e também cepas isoladas de dornas de fermentação alcoólica de usinas produtoras de etanol do estado de São Paulo. A partir da gama de leveduras testadas, foram selecionadas duas cepas potencialmente produtoras de trealose, identificadas como *Rhodotorula dairenensis* e *Rhodosporidium paludigenum*, ambas isoladas de flores coletadas no bioma Cerrado. Na segunda etapa do estudo foi realizada a otimização do crescimento celular das leveduras citadas, uma vez que a trealose é um produto intracelular. Utilizou-se uma estratégia seqüencial de planejamento experimental, onde inicialmente foram avaliados os efeitos das concentrações de melaço, água de maceração de milho e extrato de levedura comercial *Prodex Lac®*, pH e temperatura de cultivo, sobre o crescimento celular de ambas leveduras, através de um planejamento fracionário. Posteriormente, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado para a otimização das condições de crescimento celular. Para a levedura *Rhodotorula dairenensis* estas condições corresponderam a 50g/L de melaço e 50g/L de água de maceração de milho, temperatura de cultivo de 30°C e pH inicial de 5,5, obtendo-se resultados de massa seca de aproximadamente 19 g/L. Para *Rhodosporidium paludigenum* a massa seca atingiu 31 g/L em meio de cultivo contendo 50 g/L de melaço e 140 g/L de água de maceração de milho, a 25°C e pH inicial de 5,5. Nestas condições, realizou-se o estudo da produção da trealose sob condições de estresse térmico onde as variáveis estudadas foram a temperatura (33-47°C) e o tempo de exposição (60-120 minutos) dos cultivos ao estresse térmico, pela técnica de DCCR. Ambas cepas estudadas foram negativamente afetadas pelo acréscimo da temperatura de estresse

térmico dentro da faixa estudada. Em temperaturas superiores a 40°C houve diminuição do crescimento celular e viabilidade celular e, conseqüentemente, dos resultados de trealose. Para a levedura *Rhodotorula dairenensis*, o máximo rendimento de trealose intracelular obtido foi de aproximadamente 18% (g trealose/100g massa seca) em condições de temperatura de 34 a 35°C e 70 - 90 minutos para o tempo de exposição ao estresse térmico. A cepa *Rhodospiridium paludigenum* apresentou rendimentos de aproximadamente 14 a 16% (g trealose/100g massa seca) na faixa de temperatura entre 35 e 40°C, em qualquer tempo de exposição na faixa estudada (60 - 120 minutos).

Palavras-chave: produção de trealose, leveduras, estresse térmico, substratos industriais, planejamento experimental.

ABSTRACT

Trehalose is a natural cell-protecting agent that has been isolated and characterized from a large variety of plants, insects, fungi and bacteria, and many studies indicate that this disaccharide is an essential component for maintaining cell viability under stress conditions. Due to the potential application of trehalose, especially in cosmetics and pharmaceuticals fields, the interest of many research groups into the development of economically feasible production systems has increased in recent years. The present study reports on the screening for high trehalose production by yeasts and the optimization of the conditions for trehalose production using an industrial medium composed by molasses and corn steep liquor, to reduce costs of the cultivation medium. Initially, a technical screening was applied to select yeasts with a potential for trehalose production; strains isolated from pollen of flowers and fruits collected in different microhabitats in Brazil, and from alcoholic fermentation tanks were tested. Two potentially producing strains were selected and identified as *Rhodotorula dairenensis* and *Rhodospiridium paludigenum*, both isolated from flowers collected in Cerrado. Sequentially, a study for the cell growth optimization of the selected yeasts was performed, since trehalose is an intracellular product. A sequential strategy of experimental design was used; initially, the effects of the concentrations of sugar cane molasses, corn steep liquor and a commercial yeast extract *Prodex Lac SD*[®], and of pH and temperature on the biomass were studied using a fractional design, which was followed by a central composite rotatable design (CCRD). For the yeast *Rhodotorula dairenensis*, the optimum values for cell growth were 50 g/L for the molasses and corn steep liquor concentrations, initial pH of 5.5 and temperature of 30 °C, with no yeast extract, reaching values around 19 g/L for biomass. For the yeast *Rhodospiridium paludigenum*, biomass concentration obtained was 31 g/L in cultivation medium containing 50 g/L of molasses and 140g/L of corn steep liquor, initial pH of 5.5 and temperature of 25 °C, with no yeast extract. Under these conditions, the production of trehalose was studied using a CCRD to optimize the temperature (33 to 47 °C) and exposition time (60 to 120 minutes) of the cultures to the thermal stress. For both strains studied, the variable temperature presented a negative effect on trehalose accumulation, in the range studied. In conditions of temperature above 40 °C there was a decrease of the cell growth and cell viability and, consequently, a decrease of trehalose yields. For the yeast *Rhodotorula dairenensis* the maximum intracellular trehalose content reached was 18% (g trehalose/100g dry cell) at temperatures of 34 and 35 °C and

ABSTRACT

between 70 and 90 min of exposition time to the thermal stress. For the strain *Rhodospordium paludigenum* the statistical methodology led to maximum contents of intracellular trehalose in the range of 14 -16% (g trehalose/100g dry cell) under thermal stress temperatures of 35 - 40 °C in all exposition time to the thermal stress in the range studied.

Keywords: trehalose production; yeast; thermal stress; raw materials; experimental design.

1 INTRODUÇÃO

A trealose é um dissacarídeo não redutor sintetizado por organismos procarióticos e eucarióticos, sendo encontrado em leveduras, bactérias, fungos, algas, plantas, insetos e invertebrados (GONZÁLES-HERNÁNDEZ et al., 2005). Estudos recentes têm demonstrado que além da função de carboidrato de reserva, a trealose é um protetor altamente eficiente, aumentando a resistência dos componentes celulares (proteínas e fosfolipídeos) frente a condições adversas como altas temperaturas, congelamento, desidratação, alta concentração de etanol e pressões osmóticas (CHI et al., 2001; OHASHI et al., 2007). Estas propriedades de proteção da trealose a tornam um composto interessante para muitas aplicações, a citar a crioproteção de células nas áreas de medicina e microbiologia, a estabilização de cosméticos e produtos clínicos e a preservação de alimentos desidratados.

Segundo Ohashi et al. (2007), a trealose vem apresentando aceitação como aditivo alimentício, sendo que, atualmente, aproximadamente 30.000 toneladas/ano de trealose são utilizadas no Japão, por indústrias de cosméticos e alimentos.

Vários métodos para a produção industrial de trealose têm sido avaliados, havendo, no entanto, duas possibilidades de produção: o acúmulo em células de leveduras em processos de fermentação e a síntese enzimática, que pode ser realizada a partir da glicose ou outros sacarídeos pela ação de enzimas específicas (CHI et al., 2001). Muitas pesquisas têm sido realizadas para o processo de acúmulo em leveduras (SCHIRALDI et al., 2002), em virtude de que a trealose extraída é extremamente pura quando comparada à obtida via síntese enzimática, sendo particularmente indicada para o uso em produtos de alto valor agregado (CHI et al., 2001). Um dos métodos mais estudados para a indução do acúmulo de trealose em leveduras é a aplicação de estresse térmico na fase exponencial de crescimento, por um período de tempo determinado, através do qual o complexo enzimático responsável pela sua síntese é ativado (BLOMBERG, 2000).

Objetivando a viabilização da produção comercial, microrganismos efetivamente produtores de trealose têm sido isolados e aplicados para a produção pela via fermentativa (SETO et al., 2004). Tendo em vista a diversidade biológica dos ecossistemas brasileiros, torna-se interessante a aplicação de técnicas de seleção de novas linhagens para a obtenção biotecnológica da trealose, especialmente de ambientes

tropicais como os que são encontrados no ecossistema brasileiro, uma vez que leveduras que colonizam estes ambientes são constantemente submetidas a variações de temperatura entre o dia e a noite e, por isso, espera-se que tenham desenvolvido mecanismos de proteção para sobreviver a este estresse (RIBEIRO et al., 1999).

Em função das possibilidades de aplicação da trealose no desenvolvimento de novos produtos e estratégias de preservação, pesquisas têm sido realizadas e novas tecnologias de produção sugeridas para diminuir o preço comercial. No início da década de 1990 o preço comercial da trealose era de aproximadamente US\$ 700/Kg (PAIVA e PANEK, 1996). Desde então, muitos processos têm sido propostos para reduzir os custos de produção, sendo que um grupo de pesquisadores brasileiros desenvolveu um método para o acúmulo de trealose em células de *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a condições de estresse, alcançando um conteúdo de 20% (g/100g de massa seca) do dissacarídeo (MELEIRO et al., 1993). Esta tecnologia contribuiu para diminuir o preço final da trealose em aproximadamente 50%, no entanto, este custo ainda é considerado alto, gerando grande interesse na exploração de processos de produção que proporcionem uma redução maior no preço comercial da trealose (SCHIRALDI et al., 2002). Segundo Chi et al. (2001), muitas aplicações da trealose são limitadas pelo alto preço comercial, que é consequência dos métodos utilizados para a extração do dissacarídeo e, principalmente, pelo custo da glicose, que é utilizada como fonte de carbono nos processos fermentativos

Neste sentido, o desenvolvimento de processos de produção a partir de substratos industriais de custo reduzido aparece como alternativa para a produção a um menor custo. Somado a isto, a utilização de métodos de otimização de processos, nos quais é possível estudar a influência de vários parâmetros e sua interação sobre o rendimento da trealose em células de leveduras, não tem sido reportada para a produção deste dissacarídeo.

De acordo com Carpinelli et al. (2006), a trealose é atualmente produzida em escala industrial pela conversão direta de malto-oligossacarídeos em trealose, usando duas enzimas obtidas de culturas de *Rhizobium* sp. ou *Arthrobacter* sp.. Higashiyama (2002) cita que a produção de trealose por métodos convencionais, como a extração de leveduras, tem alto custo para serem usados em processos industriais. No entanto, a conversão enzimática resulta em baixos níveis de rendimento de trealose, devido à

dificuldade em manter a estabilidade do sistema reacional (SCHIRALDI et al., 2002; MUKAI et al., 1997).

Em função destas considerações, este trabalho tem como foco a produção de trealose pela via microbiológica, a qual consiste na indução do acúmulo do dissacarídeo e a posterior extração das células de leveduras. Além disto, a utilização de meios de cultivo de custo reduzido, compostos por resíduos industriais como o melaço da cana de açúcar e a água de maceração de milho (utilizados neste trabalho), não tem sido reportada na literatura; os substratos mais utilizados são a glicose e o extrato de levedura. No Brasil, a produção de sacarose é principalmente realizada a partir do caldo da cana-de-açúcar e o melaço é um resíduo abundante, utilizado como fonte de carbono para alimentação de animais, biofertilizantes e como matéria-prima para a indústria de fermentações. De acordo com Sirianuntapiboon et al. (2004) o melaço é um dos resíduos de baixo custo mais adequados para a utilização em processos fermentativos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Diante da necessidade de estudo de processos para a redução dos custos de produção da trealose e da potencialidade deste dissacarídeo para o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, o objetivo geral deste trabalho foi o estudo da produção de trealose a partir de leveduras isoladas de distintos biomas brasileiros, em meios de cultivo compostos por resíduos agro-industriais (meios complexos), utilizando estratégias seqüenciais de planejamento experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a seleção de leveduras efetivas no processo de acúmulo intracelular de trealose a partir de cepas isoladas de materiais coletados em distintos biomas brasileiros;
- Estudar a otimização do crescimento celular das leveduras selecionadas em meio complexo (fontes alternativas de nutrientes), utilizando estratégias seqüenciais de planejamento experimental, onde as variáveis estudadas foram as concentrações de Melaço, Água de Maceração de Milho e extrato de levedura comercial *Prodex Lac®*, o pH e a temperatura de cultivo;
- Com as condições de crescimento celular otimizadas, estudar o efeito da temperatura e do tempo de exposição dos cultivos ao estresse térmico, sobre o acúmulo de trealose nas células de leveduras selecionadas, utilizando a técnica de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIODIVERSIDADE E MICRORGANISMOS

Devido a sua dimensão continental de 8,5 milhões de quilômetros quadrados e à grande variação geomorfológica e climática, que contribuem para as diferenças ecológicas, o Brasil possui zonas biogeográficas distintas (biomas). O país abriga sete biomas, 49 ecorregiões e incalculáveis ecossistemas. A variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileira, tornando-as as mais diversas do mundo. Diversidade biológica, ou Biodiversidade inclui a variedade genética dentro das populações e espécies, a variedade de espécies de flora, fauna e de microrganismos, a variedade de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas e a variedade de comunidades, habitats e ecossistemas formados pelos organismos (*Geo Brasil 2002 - IBAMA*).

A composição total da biodiversidade brasileira não é conhecida, sabendo-se, entretanto que o número de espécies ainda não identificadas pode alcançar a ordem de dezena de milhões. Apesar da grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes na Terra, tenham sido descritos. Isso porque os esforços dos centros de pesquisa estão focados principalmente nos macro-organismos (mamíferos, répteis, anfíbios, aves, peixes e plantas), resultando no conhecimento de 80 a 90% destes seres. No entanto, os microrganismos, mesmo exercendo funções vitais nos ecossistemas e na biosfera em geral, foram pouco estudados, tanto devido à falta de interesse quanto à dificuldade nas pesquisas destes seres microscópicos (*Geo Brasil 2002 - IBAMA*).

É importante considerar os imensos avanços científicos e econômicos obtidos a partir de estudos de microrganismos, resultando não somente na biotecnologia moderna, como em melhorias na qualidade de vida dos seres humanos em geral. Mesmo sendo ainda pouco conhecida, a biodiversidade microbiana é responsável pela produção de centenas de substâncias industriais, como vacinas, enzimas, antibióticos, anti-cancerígenos, além de ser fonte de alimentos. Com o advento da biologia molecular e outras técnicas avançadas de estudo de microrganismos, a atenção dos pesquisadores

está se voltando a estes organismos. Estas pesquisas estão começando a dar uma idéia da grandeza deste mundo desconhecido, sabendo-se que sua diversidade fisiológica, metabólica e genética não encontra paralelo em nenhuma outra classe de seres vivos (HAWKSWORTH, 2002).

Atenção particular deve ser dada a microbiota silvestre residente no território brasileiro, que pode ser de grande interesse à indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e química. Segundo Lewinsohn et al. (2000), ambientes como a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica abrigam grande número de espécies endêmicas, e mesmo os biomas que apresentam condições bioclimáticas mais rigorosas, como o Cerrado e a Caatinga, têm flora e fauna caracterizadas como das mais ricas do mundo, comparadas às das regiões que apresentam as mesmas condições em outros países e continentes. As coleções de culturas são fontes de materiais para estudos científicos e para triagem de produtos com propriedades biotecnológicas. São importantes, especialmente, como a única opção para a manutenção, em longo prazo, da diversidade genética.

Neste contexto, torna-se interessante o estudo da produção de bioprodutos de interesse comercial por novas linhagens de microrganismos isolados de materiais coletados nos distintos biomas brasileiros. De acordo com Lewinsohn et al. (2000), diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada há muitos anos, sendo que a participação dos produtos oriundos das atividades microbianas no mercado global pode atingir de 35 a 40 bilhões de dólares ao ano; porém, os mesmos autores afirmam que esta exploração ainda é incipiente.

3.2 LEVEDURAS EM BIOPROCESSOS

As leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares amplamente distribuídos no ecossistema. São comuns no solo, nas superfícies de órgãos dos vegetais, principalmente em flores e frutos, no trato intestinal de animais, em substratos contendo açúcares e também em solos, águas, ar e tecidos de alguns animais e insetos (SOUZA, 1969). Diferenciam-se dos bolores por apresentarem-se, usual e predominantemente, sob forma unicelular. Uma levedura típica consta de células ovais, que se multiplicam assexuadamente, comumente por gemulação (brotamento) onde a célula mãe, após um

período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula (PITT e HOCKING, 1999; JAY, 1992).

Sendo microrganismos eucariontes, as leveduras apresentam membrana celular bem definida, pouco espessa em células jovens e rígida em células adultas, de constituição variável, com predominância de carboidratos e menor concentração de proteínas e lipídios. Internamente, delimitando o citoplasma, existe a membrana citoplasmática, de natureza lipoprotéica, a qual é constituída por uma camada dupla de fosfolipídios e um arranjo de proteínas que penetram na bicamada lipídica (TRABULSI et al., 1999).

As paredes celulares das leveduras apresentam entre 200 e 600 nm de espessura e consistem de estruturas estratificadas compostas por várias camadas de microfibrilas de quitina embebidas em uma matriz de polissacarídeos complexos, glicoproteínas, sais inorgânicos e pigmentos; as proporções destes componentes variam entre as leveduras. A quitina é um polissacarídeo, polímero de N-acetil-D-glicosamina, típico da estrutura das carapaças de insetos, aracnídeos e crustáceos. Os principais polissacarídeos da matriz da parede celular consistem de glicanos não-celulósicos tais como compostos glicogenóides, mananas (polímeros de manose), quitosana (polímeros de glicosamina) e galactanos (polímeros de galactose). Pequenas quantidades de ramnose, xilose e ácidos urônicos podem estar presentes (TRABULSI et al., 1999).

Sendo unicelulares, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente em relação aos bolores. A reprodução por gemulação, formando novas células simples, leva ao rápido aumento da população em ambientes líquidos, que favorecem a dispersão de microrganismos unicelulares; entretanto, restringe a penetração ou distribuição em superfícies sólidas, onde os fungos filamentosos se destacam (PITT e HOCKING, 1999). De maneira geral, pode-se dizer que os bioprocessos realizados pela intervenção de leveduras são operacionalmente mais interessantes, uma vez que as mesmas são mais eficientes na realização de alterações químicas, em comparação aos bolores e bactérias, devido à sua maior relação área/volume (JAY, 1992).

Em relação aos fungos filamentosos apresentam maior tolerância a altas concentrações de substrato, maior taxa de conversão, maior produtividade e permitem maior controle do processo por serem de natureza unicelular. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude das suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas. Sendo organismos heterotróficos, as leveduras reproduzem-

se mais lentamente do que a maioria das bactérias e assim, não competem em ambientes que as favorecem, isto é, em valores de pH próximos à neutralidade ou em temperaturas elevadas. As células típicas de leveduras apresentam diâmetro de 5 a 8 μm , podendo ser menores em cultivos velhos. Em comum com os fungos filamentosos, muitas leveduras são tolerantes a condições ácidas e a altas concentrações de etanol (até 18%). Algumas leveduras crescem em concentrações de sacarose de 55-60% e produzem pigmentos, cuja cor varia do amarelo claro ao vermelho, passando pelo rosa (PITT and HOCKING, 1999; JAY, 1992).

As leveduras crescem mais lentamente em culturas não agitadas em comparação ao cultivo realizado sob agitação. Em aerobiose, crescem de modo a favorecer a produção de biomassa. Em anaerobiose ou baixas tensões de oxigênio, a produção de etanol, por exemplo, é mais favorecida que o crescimento (JAY, 1992).

Os estudos para a produção de trealose a partir do cultivo de células de leveduras devem seu progresso à facilidade de cultivo e de manipulação de suas células. O ciclo de cultivo curto, a baixa possibilidade de contaminação e as melhores condições de extração (não formam hifas), são fatores que justificam o uso de leveduras na produção de trealose. De acordo com Chi et al. (2001), as leveduras são os microrganismos mais estudados para a produção de trealose pela via fermentativa em função do alto grau de pureza do produto obtido a partir da extração das células desses microrganismos.

As leveduras são capazes de utilizar diversas fontes de nitrogênio, inclusive amônia, e têm habilidade para crescer em resíduos orgânicos industriais ricos em açúcares e matéria orgânica (PHAFF, 1990), o que também justifica o estudo da produção de trealose a partir de células de leveduras, utilizando resíduos industriais como componentes do meio de cultivo. De acordo com Hahn-Hägerdal et al. (2005), economias significativas podem ser obtidas na produção em larga escala através do uso de fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, como o melaço e a água de maceração de milho, que são resíduos industriais da fabricação de açúcar e amido, respectivamente.

Em relação à seleção de leveduras com potencial biotecnológico, Panchal (1990) indica que o desenvolvimento de estratégias de seleção para o isolamento de linhagens de leveduras mais adequadas para um processo ou outro, implica no reconhecimento da existência de forças seletivas que agem nas leveduras no seu habitat natural. De acordo com o mesmo autor, a seleção é um problema mais ecológico do que técnico, uma vez

que existem diversos fatores que afetam a sobrevivência de espécies de leveduras na natureza.

As populações de leveduras de centenas de espécies estão continuamente aparecendo e desaparecendo, nos ambientes terrestre e aquático. Elas exercem funções na dinâmica das transformações biológicas e químicas do solo, plantas, animais e água, onde competem por nutrientes, são antagonistas ou associam-se simbioticamente (PANCHAL, 1990).

Embora não tenham motilidade, as leveduras podem ser dispersas como aerossóis e distribuídas por animais diversos, assim como outros microrganismos, o que pode implicar que quase todas as espécies podem ser obtidas a partir de variados substratos, usando as técnicas adequadas. Entretanto, numerosos estudos têm demonstrado que as leveduras apresentam a característica de especialização por determinados habitats (PHAFF e STARMER, 1980). Ao contrário das bactérias, as leveduras são relativamente modestas em suas habilidades fisiológicas; são estritamente organotróficas (obtem elétrons a partir de substratos orgânicos), o que restringe a escala dos habitats a partir dos quais podem ser recuperadas (PANCHAL, 1990).

3.3 TREALOSE: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E OCORRÊNCIA

A trealose (α -D-glicopiranosil- α -D-glicopiranosídeo) é um dissacarídeo não redutor composto por duas moléculas de glicose unidas por uma ligação glicosídica do tipo α,α -1,1, resultando na estrutura demonstrada na Figura 3.1 (ZHOU et al., 2006; MIYAZAKI et al., 1996).

A ligação glicosídica entre o oxigênio e as duas hexoses apresenta baixa energia de ligação (1,0 Kcal/mol), motivo pelo qual o dissacarídeo é fortemente estável e não reativo, sendo resistente a altas temperaturas, pHs extremos e à reação de Maillard (SETO et al., 2004). Para comparação, a sacarose, apresenta energia de ligação de 27 Kcal/mol. Assim a trealose não se dissocia em seus dois monossacarídeos constituintes a menos que seja exposta a condições hidrolíticas extremas ou à ação da trealase (PAIVA e PANEK, 1996; SCHIRALDI et al., 2002).

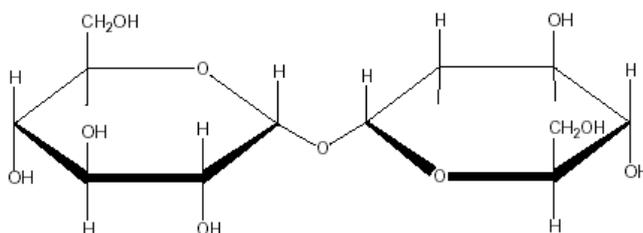


Figura 3.1 - Esquema estrutural da molécula de Trealose.

A trealose é amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada e caracterizada a partir de uma grande variedade de organismos procarióticos e eucarióticos como leveduras, bactérias, fungos, algas, plantas, insetos e invertebrados (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005; DONG et al., 2007). Suas funções variam desde o fornecimento de energia, requerida, por exemplo, para o vôo de insetos, à proteção contra a dessecação extrema em plantas desérticas, ocorrendo em altas concentrações nos organismos anidrobióticos (sobrevivem com 4-9% de água corpórea), que são capazes de tolerar a escassez de água devido a sua habilidade de sintetizar trealose, a qual exerce função essencial na estabilização das membranas celulares e outras macromoléculas sob condições ambientais extremas; nestes organismos, a trealose é sintetizada durante a desidratação e degradada quando os mesmos são novamente hidratados (SINGER e LINDQUIST, 1998; HIGASHIYAMA, 2002).

Originalmente a trealose, juntamente como o glicogênio, era considerada somente como uma substância de reserva energética para células de leveduras, mas estudos recentes têm mostrado altas correlações entre o conteúdo de trealose e a manutenção da viabilidade celular sob condições de estresse como altas temperaturas, desidratação, processos de congelamento/descongelamento, estresse osmótico ou oxidativo e depleção de nutrientes (DINIZ-MENDES et al., 1999; RIBEIRO et al., 1999; PATIST e ZOERB, 2005; DONG et al., 2007), o que evidencia que a função primária da trealose em leveduras não é a de reserva energética, e sim a de proteção das proteínas e membranas celulares sob condições de esgotamento da água intracelular (MIYAZAKI et al., 1996). De acordo com Lillie e Pringle (1980), para que um composto seja considerado de reserva ele deve ser acumulado quando as fontes externas de nutrientes são abundantes, para utilização em períodos desfavoráveis. A trealose apresenta um comportamento diferente, acumulando-se quando o meio está quase exaurido em glicose.

Em relação às propriedades, a trealose apresenta doçura moderada (45% da doçura da sacarose) e por ser apenas parcialmente digerida no intestino humano, é considerada como um açúcar dietético (CARDOSO et al., 2004). As bactérias da flora bucal, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius*, não são capazes de transformar a trealose em ácidos, por fermentação, o que confere a este dissacarídeo um reduzido potencial cariogênico (HUGENHOLTZ et al., 2002).

Outras propriedades são a estabilidade em altas temperaturas (>99% a 120°C por 90 minutos) e em ampla faixa de pH (>99% em pH de 3,5 - 10, a 100°C por 24h), especialmente em condições de pH ácido, onde outros dissacarídeos normalmente sofrem várias reações, como a hidrólise em seus monossacarídeos constituintes. A resistência ao pH ácido minimiza reações de caramelização e escurecimento, típicas de alimentos com baixo pH que passam por processamentos térmicos, resultando na retenção de aroma e cor. A trealose é incolor em solução e apresenta solubilidade de 68,9 g/100g água a 20°C, não distorce a cor natural dos produtos nos quais deseja-se adicioná-la e também apresenta baixa higroscopicidade (HIGASHIYAMA, 2002).

3.4 MECANISMOS DE PROTEÇÃO E APLICAÇÕES DA TREALOSE

A trealose tem sido atualmente reconhecida pelo mecanismo de defesa que estabiliza proteínas e membranas biológicas sob variadas condições de estresse, incluindo o aumento da temperatura, congelamento e descongelamento, dessecação, depleção de nutrientes, estresse oxidativo ou osmótico e exposição a compostos tóxicos (VOIT, 2003).

Em relação à ação do calor sobre as células, o efeito mais marcante é o rompimento da integridade das membranas e a desnaturação e agregação das proteínas. A trealose é capaz de estabilizar as proteínas na sua conformação nativa e diminuir a formação de agregados de proteínas desnaturadas (rearranjo), minimizando os efeitos da ação do calor (SINGER e LINDQUIST, 1998; CARDOSO et al., 2004), como esquematizado na Figura 3.2.

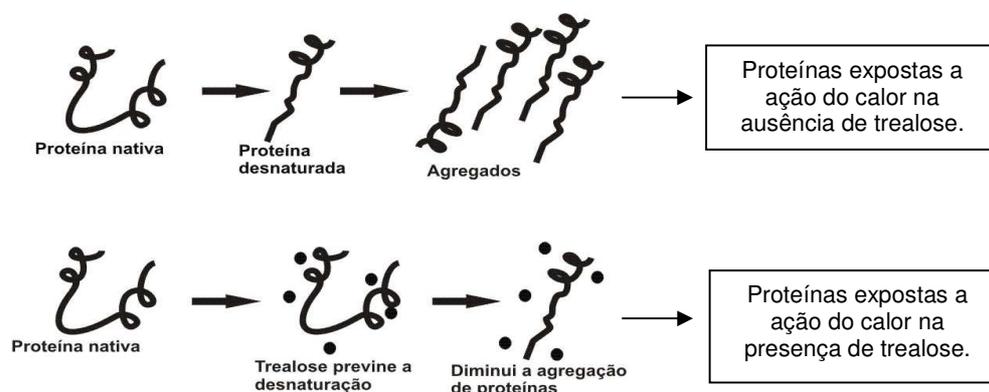


Figura 3.2 - Mecanismo de proteção das proteínas pela trealose.
(SINGER e LINDQUIST, 1998).

A preservação de sistemas biológicos através da liofilização resulta em danos celulares devido a mudanças no estado físico da membrana lipídica e a mudanças na estrutura de proteínas sensíveis. Tem sido demonstrado que a trealose pode atuar na proteção de ambas estruturas durante o congelamento e subsequente desidratação (liofilização) (DINIZ-MENDES et al., 1999).

O efeito de estabilização de proteínas, prevenindo a desnaturação, é consequência da formação de pontes de hidrogênio entre a trealose e as proteínas, quando a água é removida, juntamente com as características de vitrificação da trealose (NAGASE et al., 2002). Ambos eventos, ou seja, a interação direta da trealose com a biomolécula e a formação de rede vítrea do dissacarídeo, são necessários para o efeito de estabilização (CROWE et al., 1984).

A habilidade de soluções de trealose para formar uma rede vítrea, ao invés de cristais, tem sido sugerida como um elemento importante na proteção de macromoléculas frente à desidratação. Nos estágios finais da liofilização a trealose excede seu limite de solubilidade na pequena quantidade de água residual e solidifica-se em um estado vítreo estável ao calor. A trealose apresenta elevada temperatura de transição vítrea ($T_g = 115^\circ\text{C}$, para a forma anidra) quando comparada a outros dissacarídeos (84°C para maltose e 60°C para a sacarose). No estado vítreo, a trealose é um material amorfo, mas a temperatura é baixa o suficiente para que a mesma apresente um aspecto sólido e rígido. A vitrificação segue a conformação das moléculas, as quais, envolvidas na rede vítrea, são fisicamente impedidas de efetuar movimentos translacionais e de relaxação,

não ocorrendo distorções. Para as proteínas, esta restrição impede a desnaturação (PATIST e ZOERB, 2005; MORANA et al., 2002).

Entretanto, de acordo com Nagase et al. (2002), as propriedades especiais de proteção da trealose não podem ser explicadas baseando-se somente na formação da rede vítrea e na sua capacidade de interação com proteínas e membranas, visto que outros carboidratos também apresentam estas características. Estes mesmos autores verificaram que, após a hidratação da trealose em sua forma amorfa e mantendo-se em repouso por 5 h a 65°C, toda ou alguma fração da trealose amorfa poderia ser transformada em trealose di-hidratada. Assim, as propriedades especiais da trealose na estabilização de biomoléculas tem sido atribuídas a sua habilidade para formar cristais di-hidratados, o que leva a um aumento na temperatura de transição vítrea da trealose amorfa remanescente. Segundo Hubálek (2003), a trealose é o único dissacarídeo que apresenta duas moléculas de água em seus cristais.

Portanto, no caso das membranas celulares, o modelo de estabilização mais aceito ainda é o proposto por Crowe et al. (1984), pelo qual a trealose interage com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas e grupos funcionais das proteínas da bi-camada da membrana, intercalando-se entre as bicamadas através de pontes de hidrogênio e formando complexos fosfolipídicos estequiometricamente. Com esta interação, a trealose substitui as moléculas de água que estariam ligadas aos fosfolipídios em condições favoráveis e que seriam perdidas no processo de estresse, mantendo as estruturas hidrofílicas na sua orientação hidratada mesmo após a remoção da água (PATIST e ZOERB, 2005). Assim, as interações hidrofílicas necessárias são mantidas e evita-se a fusão dos grupos polares dos fosfolipídeos, não ocorrendo transição de fase da membrana da fase líquida cristalina para a fase de gel durante os processos de congelamento/descongelamento e hidratação/desidratação, mantendo-se a integridade e a fluidez da membrana, e, portanto, a viabilidade celular (NAGASE et al., 2002; LIU et al., 2006).

Diniz-Mendes et al. (1999) estudaram o efeito da trealose na preservação de células de leveduras submetidas a congelamento. Após sete dias de estocagem na ausência da trealose como crioprotetor, o número de células viáveis diminuiu drasticamente, chegando a zero para algumas cepas. No entanto, quando o tratamento a baixa temperatura (-20°C) foi realizado na presença de 10% de trealose (solução) houve um acréscimo de até 53% na manutenção da viabilidade celular.

As propriedades da trealose como estabilizante de proteínas e membranas sugerem vastas possibilidades de aplicação, em diversas áreas, incluindo cosméticos, produtos farmacêuticos e o setor agro-alimentício (SCHIRALDI et al., 2002; CARPINELLI et al., 2006). Neste último setor a trealose poder ser aplicada como agente umectante (mantém a água remanescente do alimento próxima às moléculas de proteínas), como agente de preservação de alimentos desidratados e como adoçante suave e de baixas calorias (HUGENHOLTZ et al., 2002). A alta estabilidade da ligação glicosídica entre os monômeros da trealose a torna não reativa frente a aminoácidos e proteínas, prevenindo a ocorrência da Reação de Maillard durante o processamento (CROWE et al., 2003).

Segundo Schiraldi et al. (2002) e Maruta et al. (1995), as características de suave adoçante (45% da doçura da sacarose), alta solubilidade, baixa higroscopicidade, baixo poder cariogênico e alta estabilidade durante o processamento e estocagem tornam possível o uso da trealose em diversos tipos de alimentos, como bebidas, chocolates e açúcar de confeitaria, alimentos congelados e desidratados, produtos de panificação, cereais matinais e produtos lácteos. Ohashi et al. (2007), indicam que a trealose vem apresentando aceitação como aditivo alimentício e que, atualmente, aproximadamente 30000 toneladas de trealose são utilizadas no Japão, por indústrias de alimentos e cosméticos.

Como aplicação na área de alimentos, tem sido proposto também que a trealose exerce um efeito supressor sobre os processos de autoxidação de ácidos graxos insaturados; ensaios com ácido linolênico demonstraram a diminuição da formação de hidroperóxidos, que são os primeiros produtos formados na reação de decomposição, de modo que a trealose poderia estar interagindo diretamente com o ácido graxo testado (HIGASHIYAMA, 2002).

Uma das áreas mais interessantes de aplicação inclui a estabilização de vacinas durante a estocagem à temperatura ambiente, a adição em sangue e posterior liofilização, facilitando o transporte sem a necessidade de refrigeração, e o uso como crioprotetor em órgãos e tecidos para transplantes cirúrgicos (PATIST e ZOERB, 2005). Também são aplicações da trealose a preservação de enzimas e a aplicação em cosméticos para a estabilização de liposomas, para prevenir a desidratação da pele exposta ao sol (SCHIRALDI et al., 2002).

Recentemente, Tanaka et al. (2005) sugeriram o uso da trealose no tratamento de doenças neuro-degenerativas, como a Doença de Huntington (HD). Os pesquisadores

procuraram moléculas pequenas que pudessem inibir a agregação de proteínas formadas por poliglutaminas, causa de tais doenças. Estudos realizados *in vitro* indicam que o efeito benéfico resulta da habilidade da trealose em ligar e estabilizar as proteínas poliglutaminadas, sendo que a administração oral diminuiu a formação de agregados de poliglutaminas no cérebro de ratos. Por ser não tóxica, altamente solúvel e de fácil administração oral, a trealose foi considerada pelos mesmos pesquisadores como uma substância promissora para o tratamento das doenças estudadas.

3.5 METABOLISMO DA TREALOSE EM LEVEDURAS

Quando leveduras são expostas a condições de estresse, ocorrem diferentes tipos de adaptações para a sobrevivência celular, as quais envolvem rotas metabólicas para a síntese de compostos osmoticamente ativos, crioprotetores ou termoprotetores, para favorecer a sobrevivência até que as condições ambientais tornem-se favoráveis novamente. Entre estes compostos estão os polióis como manitol e sorbitol, alguns aminoácidos (prolina e ácido glutâmico) e dissacarídeos, como a sacarose e a trealose (AVONCE et al., 2006).

Muitas funções tem sido descritas para a trealose, sendo que em bactérias é freqüentemente utilizada como um soluto compatível para conter estresses osmóticos e pode ser usada como fonte de carbono externa; em vários gêneros é encontrada na parede celular glicolipídica. Em células de leveduras, pode ser usada como fonte de energia e para a adaptação frente a diferentes tipos de estresse (AVONCE et al., 2006).

Dependendo das condições ambientais, a concentração celular de trealose pode variar de 1% a mais de 25% (g/100g massa seca). Esta variação é um indicativo de que o metabolismo da trealose é governado por um complexo sistema regulatório (LILLIE e PRINGLE, 1980).

Os resultados de várias pesquisas indicam que os níveis de trealose em células de leveduras são estritamente regulados de acordo com as fases de crescimento e com a presença de glicose como fonte de carbono (ARGÜELES, 1997). Na fase exponencial, a presença de trealose é praticamente indetectável se existe glicose no meio, porém, após exposição a elevações de temperatura fora das faixas ótimas, as células acumulam grandes conteúdos do dissacarídeo e, paralelamente, adquirem a capacidade de resistir a

condições mais severas de temperatura (DE VIRGILIO et al., 1994; PIPER, 1993). No entanto, se as células são expostas ao crescimento em fontes de carbono não fermentescíveis, o acúmulo de trealose ocorre em ambas fases exponencial e estacionária (VAN DIJCK et al., 1995; SINGER e LINQUIST, 1998).

Em contraste a estas observações, a síntese fisiológica da trealose ocorre no início da fase estacionária e posteriormente permanece na célula em altas concentrações (maiores que 20% em relação ao peso seco da célula); conseqüentemente, células em fase estacionária de crescimento apresentam elevada e intrínseca termotolerância (ARGÜELES, 1997; RIBEIRO et al., 1999).

Nas células de leveduras, as enzimas que catalisam a síntese de trealose localizam-se no citoplasma, onde a produção do dissacarídeo ocorre através de um sistema de fosforilação, na presença de glicose como substrato (VOIT, 2003). A Figura 3.3 representa um esquema da biosíntese de trealose em células de leveduras, que ocorre basicamente em duas etapas catalisadas enzimaticamente. Inicialmente a glicose é convertida em glicose-6-fosfato e sob a ação da enzima trealose-6-fosfato sintetase (*tps1*) ocorre a condensação com a UDP-glicose, resultando na trealose-6-fosfato e UDP. Em seguida o grupo fosfato da trealose-6-fosfato é removido por uma fosfatase específica, a trealose-6-fosfato fosfatase (*tps2*), resultando na trealose e fosfato inorgânico. Na ausência das enzimas *tps1* e *tps2* a síntese é bloqueada nas etapas representadas pelas setas, na Figura 3.3 (EASTMOND e GRAHAM, 2003; VOIT, 2003).

Existem outras cinco rotas metabólicas conhecidas para a biosíntese da trealose, de ocorrência em bactérias, fungos superiores, insetos e plantas, visto que as enzimas necessárias ao processo são amplamente distribuídas na natureza; além disso, muitos organismos apresentam mais de uma rota metabólica para a síntese da trealose. No entanto, em leveduras, somente a rota descrita na Figura 3.3 está presente (AVONCE et al., 2006).

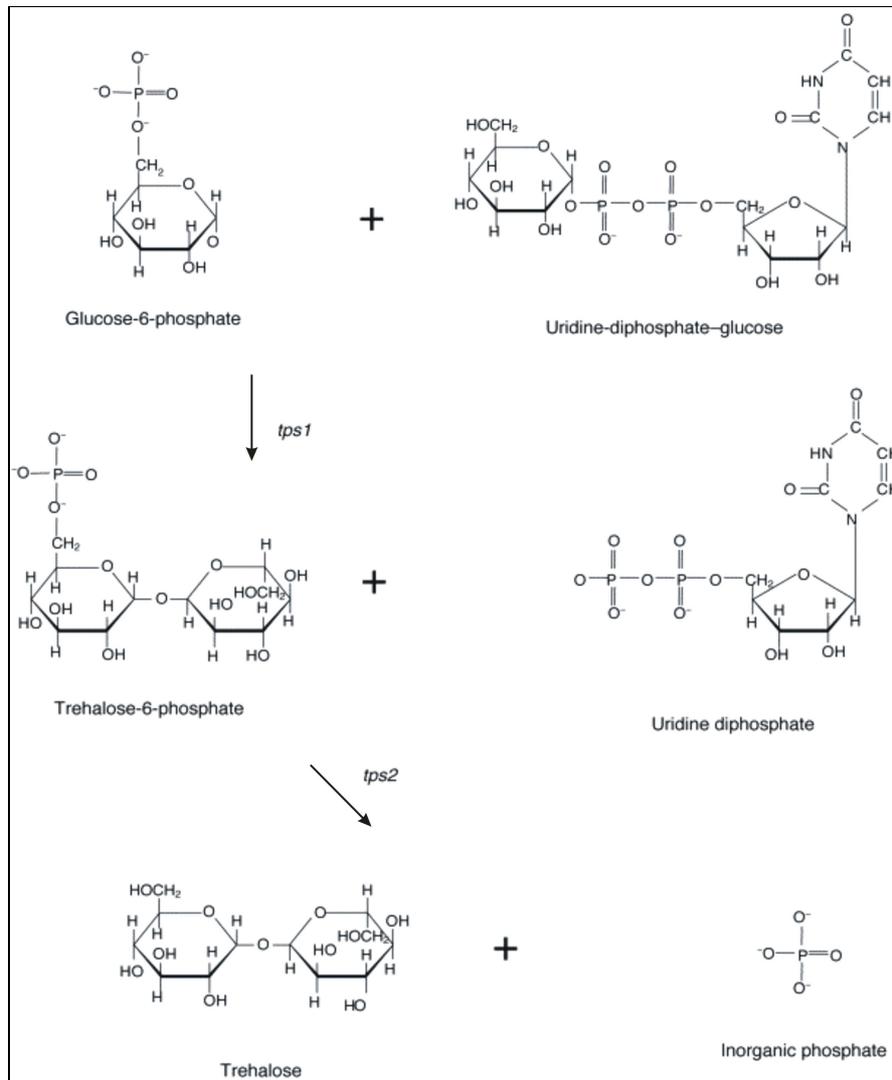


Figura 3.3 - Biosíntese da trealose em leveduras.

Fonte: (SINGER e LINDQUIST, 1998).

A degradação da trealose sintetizada nas células de leveduras é realizada através de reação de hidrólise catalisada por outro complexo enzimático, as trealases, que degradam a trealose em duas moléculas de glicose, completando o ciclo (VOIT, 2003). As trealases são estritamente específicas para a trealose como substrato (JORGE et al., 1997).

Embora a trealose seja detectada exclusivamente no citoplasma, as trealases podem ser encontradas nesta região e também no vacúolo. As trealases vacuolares são

constitutivas, com pH ótimo de 4,5 (trealases ácidas), enquanto a atividade das proteínas no citoplasma é máxima em pH 7,0 (trealases neutras), sendo reguladas pela fosforilação (FRANÇOIS e PARROU, 2001). De acordo com Lucio et al. (2000), as trealases neutras são enzimas regulatórias responsáveis pela degradação da trealose endógena (localizada no citoplasma), enquanto as trealases ácidas controlam a repressão catabólica, sendo capazes de utilizar a trealose externa à célula como fonte de carbono, após um processo de internalização da trealose para o vacúolo, através de transporte ativo.

A explicação para o acúmulo de trealose quando as células de leveduras são submetidas a condições de estresse encontra-se na ativação do complexo enzimático responsável pela sua síntese. Blomberg (2000) e Singer e Lindquist (1998), citam que sob condições limitantes como alta salinidade (estresse osmótico), estresse oxidativo e alta temperatura, a atividade da enzima trealose-6-fosfato sintetase aumenta. Além disso, sob estresse oxidativo, outras enzimas também são induzidas, incluindo as envolvidas na produção de UDP-glicose, o qual é um dos substratos para a produção de trealose-6-fosfato pela enzima trealose-6-fosfato sintetase.

O metabolismo da trealose possui importante função na regulação da glicólise, quando há excesso de glicose na célula, atuando também como reserva de energia após o esgotamento das reservas de glicogênio (SINGER e LINDQUIST, 1998; AVONCE et al., 2006). Evidências indicam que a trealose-6-fosfato, precursora da trealose, tem importante função no controle da entrada de glicose na glicólise. Quando o suprimento de glicose aumenta repentinamente, a enzima trealose-6-fosfato sintetase é ativada, desviando a glicose para o ciclo da trealose e impedindo a estagnação do metabolismo (EASTMOND e GRAHAM, 2003).

Em relação à função da trealose como fonte de energia, tem-se observado que ela não é produzida quando os nutrientes são abundantes, na fase exponencial de crescimento, como ocorre com o glicogênio, sendo sintetizada quando os níveis de glicose se aproximam da exaustão e as células entram no estado estacionário. A síntese continua durante a fase estacionária, na ausência de glicose extracelular, quando a célula utiliza as reservas de glicogênio como fonte de energia. Durante prolongada incubação na fase estacionária, a trealose é metabolizada somente após completo esgotamento das reservas de glicogênio, como último mecanismo de nutrição celular (SINGER e LINDQUIST, 1998).

3.6 PRODUÇÃO DE TREALOSE E FATORES QUE FAVORECEM O ACÚMULO

Vários métodos para a produção industrial de trealose têm sido avaliados objetivando alcançar maiores rendimentos a um menor custo (CHI et al., 2001); existem, no entanto, duas possibilidades de produção: o acúmulo em células de leveduras e posterior extração e a síntese enzimática.

Muitas pesquisas têm sido realizadas para o processo de acúmulo em leveduras, visando especialmente a redução de custos (SCHIRALDI et al., 2002). Este interesse por parte dos pesquisadores ocorre em virtude de que a trealose extraída de leveduras é extremamente pura quando comparada a trealose obtida via síntese enzimática (“in vitro”), sendo particularmente indicada para o uso em produtos de alto valor agregado (CHI et al., 2001).

As leveduras mais estudadas no processo de acúmulo pertencem ao gênero *Saccharomyces*, provavelmente devido a sua intensa utilização em processos industriais de fermentação. Para estas leveduras, Ling et al. (1995) relataram que a trealose atua como agente de proteção frente a repressão ocasionada pela concentração de etanol no meio de fermentação, bem como termoprotetor, uma vez que a sua concentração aumenta quando ocorre elevação da temperatura do meio de cultivo, por exemplo, de 21°C para 37°C. Os mesmos autores também indicaram que a trealose exerce importante papel na manutenção da viabilidade celular durante a fase estacionária de crescimento, visto que o conteúdo de trealose e o número de células viáveis estiveram estreitamente relacionados nesta fase.

A correlação entre a multiplicação celular das leveduras e o conteúdo de trealose também foi observado por Chi et al. (2003). Os maiores teores de trealose foram obtidos na fase estacionária de crescimento da levedura *Saccharomycopsis fibuligera*, cerca de 18% (g/100g massa seca), quando os maiores valores de biomassa foram alcançados.

Miyazaki et al. (1996) realizaram um “screening” para a obtenção de leveduras efetivas no acúmulo de trealose, estudando os efeitos da concentração de glicose e água de maceração de milho no meio de crescimento e do pH e temperatura de processo, sobre o acúmulo de trealose. Os parâmetros mais influentes foram a concentração de glicose e a temperatura do processo, atingindo-se níveis de 19 - 22% (g/100g de massa

seca) de trealose em células de *Filobasidium floriforme*, sob temperatura de 28 - 32°C após 48h de fermentação.

O conhecimento do metabolismo da trealose em leveduras, especialmente o fato de que as enzimas responsáveis pela sua síntese são ativadas quando as células são expostas ao estresse térmico, tem sido foco principal de muitas pesquisas. Argüelles (1997), reportou o acúmulo de trealose em células de *Cândida albicans* através de indução por choque térmico. O autor observou que a pré-incubação das culturas em temperaturas pouco mais elevadas (42°C) que as ótimas para o crescimento normal, induziu a um aumento marcante da resistência das células, que se tornaram capazes de resistir a temperaturas mais severas (52°C); medidas paralelas do conteúdo de trealose intracelular indicaram níveis muito baixos durante a fase exponencial de crescimento a 28°C, porém, após a pré-incubação a 42°C as células acumularam conteúdos marcantes de trealose, ao que se atribuiu a termotolerância observada a 52°C. Este autor aplicou tempos de exposição de 30 a 150 minutos, observando que o maior acúmulo ocorreu após 60 minutos de tratamento.

Ribeiro et al. (1999) observaram acúmulos significativos de trealose em células de leveduras tropicais quando as mesmas foram expostas a um pré-tratamento a 40°C durante 60 minutos. Posteriormente, as mesmas células foram submetidas a 50°C durante 8 minutos, observando-se uma clara correlação entre a viabilidade e os teores de trealose acumulados.

Diniz-Mendes et al. (1999) estudaram o efeito de uma pré-exposição de células de leveduras a 40°C sobre a viabilidade das mesmas frente ao congelamento (-20°C), observando um acréscimo de sete vezes na tolerância (4% para 27%) após sete dias de estocagem.

Carvalho et al. (1999) observaram um aumento de 64% no teor de trealose intracelular de *Saccharomyces cerevisiae* quando o cultivo foi exposto a uma elevação de temperatura de 30 para 44°C, durante 120 minutos. Hottiger et al. (1987) e Ribeiro et al. (1994) citam que, durante o crescimento exponencial em glicose a 28°C, as células de leveduras continham somente traços de trealose. Com o aumento da temperatura para 40°C a trealose acumulou-se imediatamente, a taxas de 1µmol/min/g de células. No entanto, diminuindo a temperatura para 28°C, o teor de trealose retornou para seus níveis iniciais.

De acordo com Biswas e Ghosh (1998), isto ocorre porque a atividade da trealase citossólica (trealases neutras) é alta em células sob crescimento exponencial em meio com açúcares fermentescíveis, dado o caráter regulatório destas enzimas, diminuindo rapidamente quando a célula entra na fase estacionária, coincidindo com o início da biosíntese da trealose. Entretanto, na ausência de fontes de carbono fermentescíveis o ciclo da trealose é ativado durante as fases exponenciais de crescimento, ocorrendo o acúmulo na célula para utilização após o esgotamento das reservas de glicogênio (SINGER e LINDQUIST, 1998).

Os efeitos da aplicação de estresse osmótico sobre o acúmulo de trealose em células de leveduras também tem sido extensivamente estudados. Quando submetidos a um estresse osmótico, os microrganismos devem ser capazes de ajustar o volume e a pressão osmótica da célula pelo acréscimo da osmolaridade interna; muitos microrganismos respondem a tais mudanças ambientais através do acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular, como a trealose (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005).

Liu et al. (2006), avaliaram o efeito da adição de NaCl ao meio de cultivo de células de *Cândida krusei*, na concentração final de 0,34 M, durante a fase lag, exponencial e estacionária de crescimento, observando um acúmulo de 16% de trealose nas células em fase exponencial de crescimento; para as células submetidas ao estresse durante a fase lag, o teor de trealose foi inferior ao controle (meio não adicionado de NaCl). Os autores concluíram que a resposta ao acúmulo de trealose está intimamente relacionada à pressão osmótica do meio e ao estado fisiológico das células.

Dong et al. (2007) avaliaram o efeito da aplicação de altas pressões ao meio de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* sobre o acúmulo de trealose, em um reator com controle de pressurização. As pressões estudadas foram de 0,1 – 2,5 MPa. Os autores observaram que, como um fator de estímulo externo, pressões elevadas têm grande efeito sobre a morfologia e crescimento das células; a aplicação de pressões abaixo de 1,0 MPa não foi suficiente para induzir a máxima produção de trealose, que foi de 15%, e as pressões superiores a 1,0 MPa ocasionaram lise celular.

No que se refere à síntese da trealose pelo método de conversão enzimática, Aisaka e Masuda (1995), estudaram a produção da enzima trealose fosforilase por *Catellatospora ferruginea* em meio contendo trealose como fonte de carbono. A trealose fosforilase catalisa a reação: Trealose + fosfato \Leftrightarrow β -D-glicose 1-fosfato + D-glicose. O

intuito dos autores na produção da enzima foi a possibilidade de utilizá-la na produção de trealose em sistema “in vitro”. Por sua vez, Sukhoon et al. (2003) realizaram um estudo para a conversão de maltose em trealose pela ação da enzima trealose-sintetase de *Thermus caldophilus* GK24, indicando que o processo seria apropriado para o uso em escala industrial.

De acordo com Carpinelli et al. (2006), a trealose é atualmente produzida em escala industrial utilizando o método patenteado por Hayashibara Biochemical Laboratories (MARUTA et al., 1995), baseado na conversão direta de malto-oligossacarídeos em trealose usando duas enzimas obtidas de culturas de *Rhizobium* sp. ou *Arthrobacter* sp. O mesmo laboratório (HIGASHIYAMA, 2002) também desenvolveu um sistema de produção utilizando amido como matéria prima. O amido é convertido em amilose por um sistema enzimático (alfa-amilase e isoamilase) a qual é convertida em trealose (etapa não demonstrada). Higashiyama (2002) cita que a produção de trealose por métodos convencionais, como a extração de leveduras, tem alto custo para serem usados em processos industriais. No entanto, a conversão enzimática resulta em baixos níveis de rendimento de trealose, devido à dificuldade em manter o sistema reacional estável (SCHIRALDI et al., 2002).

3.7 EXTRAÇÃO DA TREALOSE DE CÉLULAS DE LEVEDURAS

Em células de leveduras, os níveis de trealose intracelular são controlados por um balanço entre sua síntese e sua hidrólise, a qual é causada pela atividade das trealases. A extração da trealose é afetada pela atividade das trealases, de modo que se torna necessário realizar a inativação destas enzimas antes da extração; a inativação das trealases pode ser alcançada pelo ajuste da concentração de etanol, pH e temperatura de extração (CHUANBIN et al., 1998). Baseando-se nesta informação, vários métodos de extração têm sido utilizados e dependem fundamentalmente da técnica de quantificação da trealose, a ser aplicada após a extração.

A extração com etanol a quente é indicada quando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com sistema Dionex (coluna de troca iônica e detector de índice de refração) é aplicada para quantificação (FERREIRA et al., 1997; MIYAZAKI et al., 1995; YOSHIKAWA et al., 1994). Realiza-se a homogeneização de uma

fração de massa seca em etanol (2 mL de etanol/40 mg de massa seca), e leva-se à ebulição seguida da separação do etanol por evaporação ou centrifugação.

Quando se utilizam métodos enzimáticos, a extração com água em ebulição é aplicada, de modo a não alterar o pH do sistema e facilitar o ajuste do pH ótimo de atividade da enzima utilizada na quantificação. Neste método, as células de um determinado volume de meio fermentado são homogeneizadas com água destilada e incubadas a 95°C por 20 minutos; após o resfriamento, o sobrenadante recebe a adição de trealase, a qual hidroliza a trealose a glicose; a glicose gerada é quantificada por kits enzimáticos (KIENLE et al., 1993; BLÁZQUEZ et al., 1994; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005).

O tratamento das células com microondas, para a extração da trealose, também é indicado quando se utiliza o método enzimático (trealases) e a técnica de HPLC para a quantificação (LIU et al., 2005; CHUANBIN et al., 1998). A abundância de moléculas de água livre em células de leveduras recém coletadas do meio de cultura consiste no princípio do tratamento das células por microondas. As microondas interagem seletivamente com as moléculas de água livre causando um aquecimento localizado; o resultado é o aumento da temperatura nas regiões celulares onde a água livre encontra-se em maior proporção. No caso de células de leveduras, os vacúolos correspondem ao maior reservatório de água livre, sendo que, frente ao tratamento por microondas, esta água entra em ebulição, causando a expansão de seu volume. Nesta situação, a parede celular não suporta o aumento da pressão interna, havendo o rompimento e liberação da trealose intracelular (CHUANBIN et al., 1998).

A extração com ácido tricloroacético é amplamente indicada na literatura (DONG et al., 2007; ARANDA et al., 2004; CHI et al., 2003) e precede a quantificação pelo método de Antrona (STEWART, 1982), no qual se utiliza Ácido sulfúrico concentrado em ebulição. O ácido tricloroacético neutraliza a atividade das trealases, as quais tem pH ótimo de atuação em torno de 7,0 (trealases do citoplasma, onde ocorre a biosíntese da trealose) e promove a desestabilização da parede celular, pela precipitação de proteínas.

3.8 USO DE TÉCNICAS SEQUENCIAIS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DE PROCESSOS

A otimização é um método utilizado para implementar a performance de sistemas e aumentar o rendimento destes sem o aumento dos custos (BAS e BOYACI, 2007). Uma aplicação completa da técnica de planejamento experimental inclui a seleção de variáveis seguida da otimização através de metodologia de superfície de resposta. Esta técnica permite a avaliação dos efeitos de uma série de variáveis sobre uma determinada resposta, ao mesmo tempo, além de permitir a observação das interações (efeito sinérgico ou antagônico) entre as mesmas (COCKSHOTT e SULLIVAN, 2001; NETO et al., 2001; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A metodologia de superfície de resposta (Response Surface Methodology – RSM) consiste em uma técnica matemática e estatística usada no desenvolvimento, implementação e otimização de processos onde a resposta de interesse é influenciada por inúmeras variáveis e o objetivo é a otimização desta resposta. Apresenta importância na formulação de novos produtos, bem como na melhoria dos produtos já existentes e pode ser utilizada para definir a relação entre a resposta e as variáveis independentes. A RSM define o efeito independente de variáveis, sozinhas ou em combinação, sobre o processo, além de possibilitar a geração de um modelo matemático que descreve o processo. A perspectiva gráfica da técnica recebe o nome de superfície de resposta (BAS e BOYACI, 2007).

Geralmente a otimização de um processo depende de uma estratégia seqüencial de planejamentos experimentais, onde o número de planejamentos necessários depende do número de variáveis independentes a serem estudadas inicialmente. No caso de duas ou três variáveis independentes ou fatores, deve-se usar o delineamento fatorial completo e, na seqüência da otimização, o delineamento composto central rotacional (DCCR), também conhecido como metodologia de superfície de resposta. Para o estudo de quatro ou mais variáveis, deve-se utilizar planejamentos fracionários ou planejamentos tipo Plackett-Burman para uma investigação inicial em relação aos efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas desejadas. Para se obter a otimização, será necessário outro planejamento com duas ou três variáveis, dependendo do resultado do planejamento fracionário. O uso de um planejamento composto central sem a realização

prévia de um planejamento fracionado, no caso de muitas variáveis, resultaria em um número muito grande de ensaios sem a garantia da otimização direta. O planejamento fracionário permite a exploração das variáveis previamente à otimização. Segundo RODRIGUES e IEMMA (2005), as etapas que devem ser seguidas objetivando a otimização de um processo são:

- a) Definir claramente os objetivos a serem alcançados com os experimentos, verificando as restrições do processo e definindo as variáveis independentes e dependentes do estudo;
- b) Elaborar procedimento experimental levando em consideração todas as variáveis independentes. Em caso da existência de muitas variáveis, analisar os efeitos principais destas através de um planejamento fracionário ou Plackett Burman. Nesta etapa, o nível de significância fixa poderá ser de 10%. Realizar outro planejamento, seqüencialmente, reduzindo o número de variáveis e alterando as faixas de estudo em função do impacto que elas tiveram sobre as respostas. Ao fim, realizar um planejamento do tipo composto central para elaborar o modelo preditivo;
- c) Realizar a ANOVA para verificar a qualidade e ajuste do modelo. Calcular as respostas através do modelo ajustado e os desvios entre a resposta experimental e a estimada pelo modelo;
- d) Gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno para análise e definir as faixas ótimas operacionais de cada variável do processo;
- e) Validação experimental dos resultados realizando ensaios nas condições otimizadas antes de colocar o processo em escala industrial.

O uso de planejamentos experimentais estatísticos na otimização de processos fermentativos e meios de cultivo tem sido bem documentado. Há uma abundância de aplicações e estudos de caso na literatura. Kalil et al. (2000) estudaram a otimização do rendimento e produtividade de uma fermentação alcoólica contínua. Primeiramente, um Plackett-Burman de 20 ensaios foi utilizado para a seleção de variáveis significativas no processo, tendo sido avaliadas 10 variáveis. Destas, cinco apresentaram significância estatística sobre o processo e foram estudadas, em uma segunda etapa, a partir de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo 32 ensaios referentes ao planejamento fatorial completo (2^5), 10 ensaios referentes à adição dos pontos axiais e 1

ensaio no ponto central (somente um ponto central foi adicionado visto ser um trabalho de simulação).

Souza et al. (2006) realizaram a otimização da composição de um meio de cultivo para a produção de transglutaminase de *Bacillus circulans* BL32. Sete componentes do meio de cultivo foram testados em duas concentrações através um Plackett-Burman de 12 ensaios. Dos sete componentes estudados, apenas dois apresentaram-se como significativos ($p \leq 0,05$) sobre a produção de transglutaminase. Em uma segunda etapa, a concentração destes componentes foi estudada através de um DCCR de duas variáveis, num total de 12 ensaios.

Dutta et al. (2004) utilizaram a metodologia de superfície de resposta associada à técnica de redes neurais para a otimização da produção de proteases extracelulares por *Pseudomonas* sp., sendo estudados os fatores pH, temperatura e volume inicial de inóculo. Utilizando a metodologia de superfície de resposta, a relação entre as variáveis é expressa matematicamente na forma de um polinômio de segunda ordem da resposta em função dos fatores experimentais. A técnica de redes neurais foi aplicada para fornecer um mapeamento não linear entre os dados de entrada (fatores) e a resposta (protease), sendo aplicada aos mesmos dados usados na RSM. As redes neurais são técnicas de modelagem superiores à metodologia de superfície de resposta, pois representa a não linearidade de forma melhor. Todavia, os gráficos de superfície de resposta proporcionam um bom caminho na visualização da interação dos parâmetros sobre a resposta.

Li et al. (2008) aplicaram as técnicas de planejamento experimental para otimizar a produção de fitase por uma levedura isolada de ambiente marinho. Através de um Plackett-Burman de 12 ensaios foram selecionadas três variáveis importantes em relação a composição do meio e condições de cultivo, as quais foram submetidas a otimização através de um DCCR.

O uso de estratégias seqüências de planejamento experimental visando a otimização da produção de trealose não tem sido reportado na literatura científica. Considerando que o uso desta ferramenta tem se apresentado como eficaz e indispensável para o desenvolvimento de processos e produtos, e que as técnicas de tentativa e erro tem sido consideradas ultrapassadas, justifica-se a natureza do presente estudo. A otimização de processos de fermentação em meios de cultivo de custo reduzido surge, portanto, como uma importante alternativa para a redução dos custos de produção da trealose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos utilizados no desenvolvimento do trabalho. A Figura 4.1 representa um esquema das etapas realizadas.

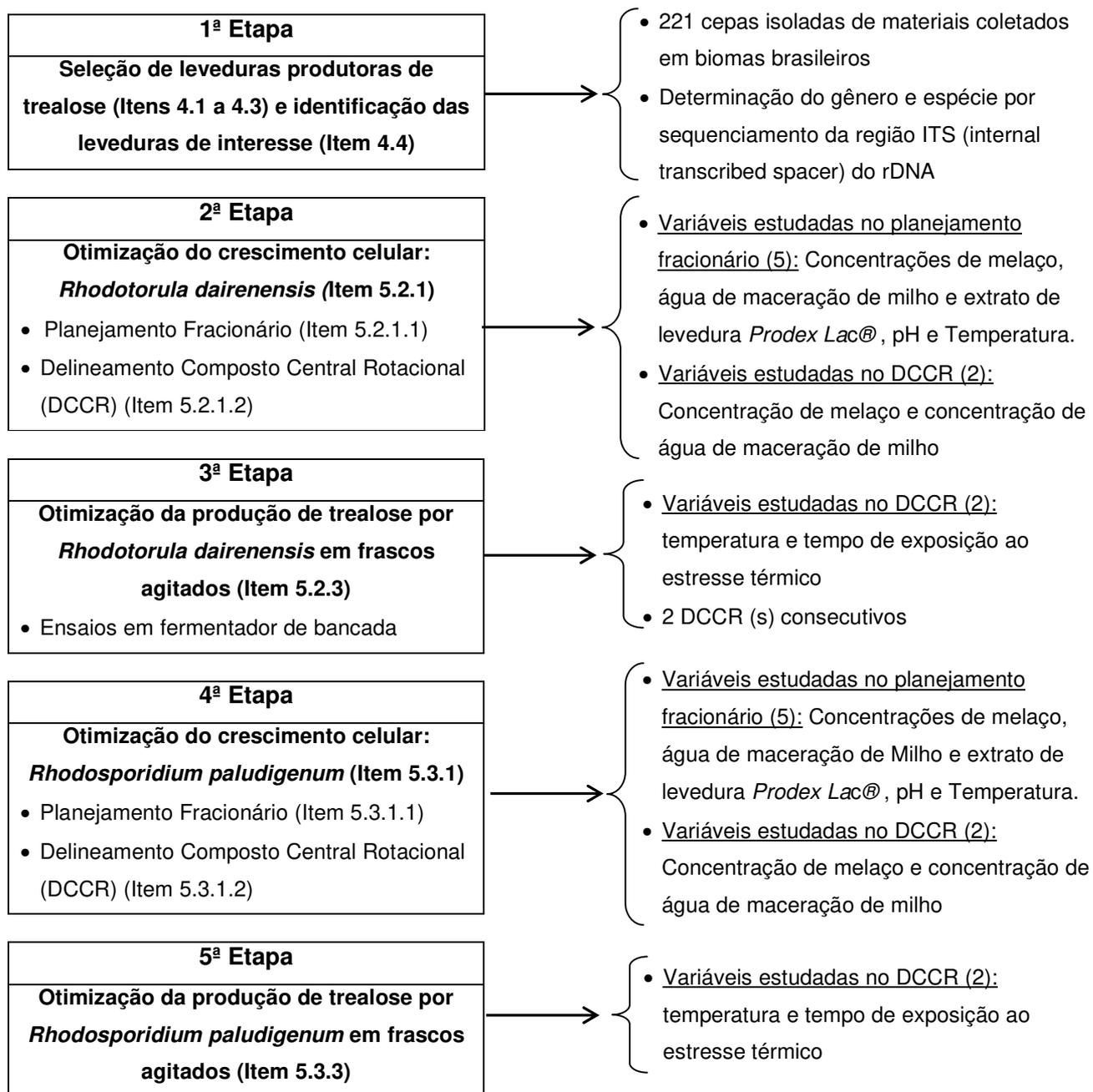


Figura 4.1 – Fluxograma das etapas desenvolvidas.

4.1 MICRORGANISMOS

Na etapa de seleção foram testadas 221 cepas de leveduras pertencentes ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB-DEA-UNICAMP). Destas, 201 foram isoladas de pólen de flores, frutos (em perfeito estado de maturação) e do solo, coletados na Mata Atlântica do estado de São Paulo (regiões próximas ao mar e interioranas), Pantanal (MS), Cerrado (GO) e Floresta Amazônica (AM), por Hernalsteens (2006). Através da Figura 4.2 podem-se observar as regiões de coleta de amostras com os respectivos números de leveduras testadas para cada região. Outras 20 cepas foram isoladas de dornas de fermentação alcoólica, de diversas usinas de produção de etanol do estado de São Paulo, as quais foram obtidas junto ao banco de microrganismos do CPQBA/UNICAMP (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias da UNICAMP).

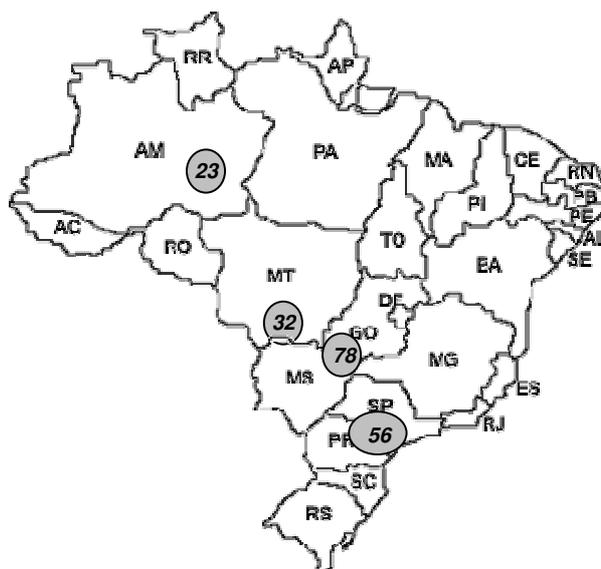


Figura 4.2 – Regiões em que foram coletadas as amostras para isolamento, com respectivos números de leveduras testadas para cada região.

As colônias isoladas foram repicadas em ágar inclinado de extrato de malte e levedura (GYMP), cuja composição é descrita na Tabela 4.1, e incubados a 30°C até seu desenvolvimento. Posteriormente, foram mantidas a 5°C (cultura estoque).

Tabela 4.1 - Composição do meio GYMP.

Componentes	Composição (g/L)
Glicose	20
Extrato de malte	10
Extrato de levedura	5
Fosfato de Sódio Monobásico	2
Agar	20

As leveduras foram submetidas a uma técnica de seleção, descrita no item 4.3, para a seleção das espécies capazes de acumular os maiores conteúdos de trealose.

4.2 OBTENÇÃO DOS INÓCULOS

Para a obtenção de inóculos homogêneos realizou-se a transferência das colônias, mantidas em meio GYMP, para tubos de ensaio com 10mL de caldo (supressão do ágar) do mesmo meio (pH inicial 5,5), os quais foram incubados a 30°C por 24h. Cada tubo foi utilizado como pré-inóculo. Para a obtenção dos inóculos utilizou-se 80mL de meio GYMP em frascos Erlenmeyers de 250mL, realizando-se a esterilização a 121°C por 15 minutos. A cada Erlenmeyer foram adicionados 10mL do pré-inóculo, os quais foram incubados em agitadores orbitais termostatizados (New Brunswick Scientific, modelo Innova 4430, Nova Jersey, EUA) a 150 rpm e 30°C, durante 24 horas.

4.3 SELEÇÃO DAS LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE TREALOSE

Para a seleção utilizou-se a metodologia proposta por Miyazaki et al. (1996), em meio contendo 6,5 g/L de YNB (Yeast Nitrogen Base) (Difco, Michigan, EUA) e 30 g/L de glicose em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 0,3M (pH 5,5). Utilizou-se 80mL deste meio em frascos Erlenmeyers de 250mL, adicionando-se o inóculo em quantidade correspondente a 10% (v/v) do volume inicial de meio, de acordo com o proposto por Carvalheiro et al. (1999). O cultivo aeróbio foi realizado a 30°C/150 rpm em agitadores orbitais termostatizados. No final da fase exponencial de crescimento celular (início da fase estacionária), detectada pela estabilização das medidas de densidade ótica de uma alíquota do meio de cultivo, foi realizada a indução do acúmulo da trealose pela transferência das culturas para a temperatura de 45°C, durante 90 min. A temperatura e tempo de estresse térmico foram definidos em função dos resultados encontrados na

literatura, para trabalhos que realizaram indução do acúmulo de trealose via estresse térmico. Após o estresse térmico as células das leveduras foram testadas em relação ao acúmulo intracelular de trealose, de acordo com a técnica descrita no item 4.6.2.

A duração da fase exponencial não foi semelhante para todas as leveduras e, conseqüentemente, o tempo de fermentação no qual foi aplicado o estresse térmico também foi diferenciado. No entanto, esse tempo não excedeu 24 horas.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

As leveduras de interesse em relação ao rendimento obtido para a trealose foram identificadas em relação ao gênero e espécie por seqüenciamento da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA, no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo). O DNA das leveduras foi extraído de colônias mantidas em ágar GYMP.

As seqüências de nucleotídeos obtidas para cada levedura foram comparadas com as seqüências da base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), através do serviço online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.5 ESTRATÉGIA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A PRODUÇÃO DE TREALOSE

Como primeira etapa para a otimização da produção de trealose, realizou-se um estudo para a otimização do crescimento celular de 2 cepas de leveduras selecionadas na etapa de seleção, em meio de cultivo complexo (composto por resíduos industriais), tendo em vista que, quanto maior o número de células na etapa de produção da trealose, maior é quantidade de trealose obtida após a extração (trealose é um produto intracelular). A segunda etapa consistiu no estudo do efeito da temperatura e do tempo de exposição ao estresse térmico sobre a produção de trealose destas cepas.

4.5.1 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DAS LEVEDURAS

Para a maximização do crescimento celular, inicialmente foi utilizado um planejamento fracionário 2^{5-1} (3 pontos centrais, total de 19 ensaios), para a avaliação do efeito de 5 variáveis sobre a concentração de massa seca, a citar: concentrações de Melaço (adquirido na Usina Éster, na região de Campinas), Água de Maceração de Milho (AMM) (cedida pela Corn Products, Mogi Guaçu) e extrato de levedura comercial *Prodex Lac®* (*Bio Springer* do Brasil - Produtos Especiais para Alimentos), pH e temperatura. Na Tabela 4.2 pode-se verificar a composição aproximada dos substratos industriais citados.

A água de maceração de milho, utilizada como fonte de nitrogênio, é obtida no processo de maceração de grãos de milho para produção de amido, contendo em sua composição química, carboidratos solúveis, aminoácidos e sais minerais, nutrientes necessários ao desenvolvimento de microrganismos, sendo um excelente meio de cultura (HAHN-HÄGERDAL et al., 2005).

O melaço é um resíduo abundante no Brasil, resultante do processo de concentração do caldo de cana (indústria do açúcar) e é utilizado como fonte de carbono para alimentação de animais, biofertilizantes e como componente de meios de cultivo na indústria de fermentações (SIRIANUNTAPIBOON et al., 2004).

O *Prodex Lac®* é um hidrolisado protéico de biomassa de leveduras, de custo reduzido, utilizado em substituição ao extrato de levedura, o qual apresenta custo elevado.

Tabela 4.2 – Composição aproximada dos substratos industriais.

	Nitrogênio total (%)	Açúcares redutores totais (%)	Ácido Lático (%)	Sais (%)	Cinzas (%)
Melaço	0,5	45 - 60	-	-	-
AMM	50	7,5	18	6,1	-
<i>Prodex Lac®</i>	44	-	-	0,5	9,0

Fonte: TREICHEL, 2001.

Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fracionário estão apresentados na Tabela 4.3. Para efeito de comparação, juntamente com os 19 ensaios do planejamento, foram realizados três ensaios com o mesmo meio utilizado na etapa de seleção (30 g/L de glicose e 6,5 g/L de YNB), denominado como “Meio Controle”.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250mL com 80mL de meio, adicionando-se 10% (v/v) de inóculo. O cultivo aeróbio foi realizado nas temperaturas definidas pelo planejamento (Tabela 4.3) em agitadores orbitais termostatizados, sob agitação de 150 rpm. O tempo de fermentação foi diferenciado para cada ensaio, pois os mesmos foram conduzidos até o alcance da fase estacionária de crescimento celular.

Tabela 4.3 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fracionário.

Variáveis / Níveis	Melaço (g/L)*	Água de Maceração de Milho (g/L)**	Prodex Lac® (g/L)	Temperatura (°C)	pH
-1	50	30	2	25	5,0
0	75	50	4	30	5,5
+1	100	70	6	35	6,0

*A concentração de açúcares redutores totais no lote de melaço utilizado foi de 51%.

**A concentração de nitrogênio total no lote de água de maceração de milho utilizado foi de 50%.

A realização dos planejamentos fracionários permitiu a seleção das variáveis estatisticamente significativas em relação ao crescimento celular das cepas de leveduras estudadas. Com estas variáveis, foram realizados planejamentos completos (DCCR de 2³ ensaios com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios para cada levedura) objetivando-se a otimização do crescimento celular através da metodologia de superfície de resposta.

Todos os ensaios dos planejamentos fracionários e completos (DCCR) foram realizados aleatoriamente e os resultados foram tratados com o programa STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). Este programa também foi usado para gerar as superfícies de resposta obtidas a partir da realização do DCCR. A adequabilidade dos modelos foi avaliada através de análise de variância (ANOVA).

4.5.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO

Para o estudo do processo de indução da síntese de trealose foi utilizado um DCCR 2², com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios para cada levedura. As variáveis estudadas foram a temperatura e o tempo de exposição das culturas ao estresse térmico, sendo os níveis reais e codificados de cada variável, apresentados na Tabela 4.4. As faixas estudadas para as variáveis foram inicialmente definidas em função

dos resultados encontrados na literatura, para trabalhos que realizaram indução do acúmulo de trealose via estresse térmico.

A aplicação do estresse térmico foi realizada na fase exponencial de crescimento, pela transferência das culturas da temperatura ótima de crescimento, obtida na etapa de otimização do crescimento celular, para as temperaturas e durante os tempos definidos pelo planejamento experimental (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Variáveis do DCCR para o estudo da produção de trealose (níveis reais e codificados).

Variáveis / Níveis	Temperatura (°C)	Tempo de exposição (min)
$-\alpha$ (-1,41)	33	60
-1	35	69
0	40	90
+1	45	111
$+\alpha$ (+1,41)	47	120

As fermentações para obtenção de meio fermentado para a aplicação do estresse térmico foram conduzidas em frascos Erlenmeyer aletados de 1,0 L, contendo 300mL de meio. Nesta etapa, a composição do meio, pH inicial e temperatura de cultivo corresponderam aos valores otimizados para o crescimento celular de cada levedura. Uma vez atingida a fase exponencial de crescimento, homogeneizou-se o meio fermentado e coletou-se 50mL em frascos de 100mL, incubando-se em banhos termostatizados para a realização do estresse térmico.

Os resultados obtidos foram tratados com o auxílio do programa STATISTICA 7.0 para a obtenção de um modelo quadrático do teor de trealose em função das variáveis temperatura e tempo de exposição ao estresse térmico, dentro das faixas estudadas. A adequabilidade do modelo foi avaliada através de análise de variância (ANOVA), obtendo-se as superfícies de resposta para o teor de trealose em função das variáveis estudadas.

4.5.3 ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA

Para uma das leveduras estudadas, após a otimização das condições de crescimento em frascos agitados, realizou-se o cultivo em fermentador de bancada, em sistema de batelada simples, para a avaliação da cinética de produção de trealose.

Foram realizadas 3 fermentações em fermentador de 3 L com volume útil de 2,2 L (New Brunswick Scientific, Modelo BioFlo III, Nova Jersey, EUA), as quais foram conduzidas nas mesmas condições (triplicata). Para todos os ensaios utilizou-se agitador de pás inclinadas. A composição do meio de cultivo e as condições de pH inicial e temperatura foram definidas conforme as condições otimizadas para o crescimento celular da levedura em estudo. A fermentação foi iniciada com 1,8 L de meio estéril, ao qual foram adicionados 200mL de inóculo. As condições de agitação e aeração foram de 400 rpm e 1 vvm, respectivamente. Durante a fermentação foram retiradas amostras de 5 a 10mL em espaços regulares de tempo, desde o tempo zero até 72 horas de fermentação, para acompanhamento do teor de trealose.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 CONCENTRAÇÃO DE MASSA SECA

A concentração de Massa Seca (M.S) foi determinada através da leitura da densidade ótica (DO) a 600nm de uma alíquota do meio de cultivo, utilizando-se curvas de calibração de densidade ótica *versus* massa seca, de acordo com metodologia proposta por Miyazaki et al. (1996). Para a obtenção das curvas de calibração, foram coletadas alíquotas do meio de cultivo (10mL) e as células foram lavadas três vezes com água destilada, por centrifugação a $3000 \times g$ durante 5 minutos em centrífuga refrigerada SORVALL® (DUPONT modelo RC 187 26 Plus, Wilmington, EUA).

O precipitado foi submetido à secagem em estufa a vácuo (50°C) até peso constante. Através da relação com o volume de meio coletado, determinou-se a concentração total de massa seca. Paralelamente, diluições apropriadas do meio de cultivo foram realizadas e a densidade ótica foi medida a 600 nm. A partir da massa seca total determinaram-se indiretamente as concentrações de massa seca para cada diluição, construindo-se a curva de calibração.

OBS: Na etapa de otimização do crescimento celular a concentração de massa seca foi obtida através do método direto (lavagem das células por centrifugação e secagem a 60°C).

4.6.2 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA TREALOSE - MÉTODO DE ANTRONA

Para a determinação do teor de trealose havia sido proposto no projeto inicial o uso da metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). No entanto, testes iniciais não resultaram em efetiva separação do dissacarídeo com as colunas disponíveis no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (FEA/DEA/UNICAMP). Por este motivo, utilizou-se a metodologia de Antrona (STEWART, 1982), amplamente utilizada e indicada na literatura por diversos autores (DONG et al., 2007; ARANDA et al., 2004; CHI et al., 2003; RIBEIRO et al., 1999).

A extração foi realizada através do método proposto por Chi et al. (2001), utilizando ácido tricloroacético. Uma alíquota de 10mL do meio foi lavada três vezes com água destilada resfriada por centrifugação a $3000 \times g$ durante 5 minutos em centrífuga refrigerada. Em seguida, 4mL de ácido tricloroacético 0,5M resfriado foram adicionados ao precipitado de células, incubando-se a 0°C por 20 min sob agitação freqüente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 5 min, coletando-se o sobrenadante. No precipitado de células resultante desta etapa, a extração foi novamente realizada, por duas etapas sucessivas de adição de 4mL de ácido tricloroacético. Os sobrenadantes foram combinados para perfazer um total de 12mL de extrato.

4.6.3 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA TREALOSE - MÉTODO ENZIMÁTICO

Para fins de comparação com o método de Antrona, realizaram-se algumas determinações da trealose intracelular através do método enzimático, utilizando-se a enzima trealase, de acordo com a metodologia proposta por González-Hernández et al. (2005) e Blázquez et al. (1994). Resultados semelhantes foram obtidos com a utilização de ambos os métodos.

Para a obtenção dos extratos, uma alíquota de 10mL de meio foi lavada três vezes com água destilada resfriada por centrifugação a $3000 \times g$ por 5 min. O precipitado de células foi suspenso em 10mL de água destilada, incubando-se a 95°C por 20 minutos.

Em seguida o sobrenadante foi coletado por centrifugação, obtendo-se os extratos de trealose.

Para a quantificação, 100 μ L do extrato aquoso foram adicionados de 50 μ L de tampão acetato de sódio 25Mm (pH 5.5) e 25 μ L de trealase (α - α -Trealose glucohidrolase de células de rim de suínos, Sigma, Alemanha), incubando-se a 37°C por 14h. Uma amostra de extrato sem adição da enzima (branco de enzima) foi considerada em paralelo para diminuir do total de glicose gerado, a glicose pré-existente em cada amostra. A glicose liberada ao final da reação foi determinada utilizando-se um kit enzimático de glicose-oxidase (Laborlab, São Paulo).

4.6.4 AÇÚCARES REDUTORES E TOTAIS

Após diluições adequadas do meio de cultivo, a quantificação de açúcares redutores foi realizada através do método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Para a determinação de açúcares redutores totais o meio fermentado foi hidrolisado com HCl 2N em ebulição por 15 minutos, seguida de neutralização com solução de NaOH 2N.

4.6.5 pH

Para o acompanhamento do pH do meio, alíquotas foram coletadas e submetidas a leitura direta em potenciômetro.

4.6.6 VIABILIDADE CELULAR

As determinações de viabilidade celular foram conduzidas de acordo com o método de contagem direta utilizando a técnica de coloração com azul de metileno, segundo Lee et al. (1981). A suspensão de células convenientemente diluída (0,1mL) foi misturada com a solução de azul de metileno (0,9mL), transferindo-se uma alíquota dessa mistura para câmara de Neubauer. As contagens de células viáveis foram realizadas em microscópio ótico, contando-se, no mínimo, 300 células por câmara. As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) apresentam-se coloridas de azul. O resultado foi expresso em percentual (%) de células vivas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE TREALOSE

Na etapa de seleção foram testadas 78 leveduras isoladas de material coletado no Cerrado, 56 da Mata Atlântica, 23 da Floresta Amazônica, 32 do Pantanal e 20 de dornas de fermentação alcoólica. Doze leveduras foram eliminadas nesta etapa por terem apresentado baixo crescimento celular, sendo inviável a determinação de trealose a partir da massa celular obtida. Nas Tabelas 5.1 a 5.5 podem ser verificados os resultados obtidos para todas as cepas testadas, separados por faixas de rendimento em trealose. Os maiores resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.5; neste caso, foi aplicado o teste de Tukey baseado na diferença entre médias para verificar a existência de diferença significativa entre os resultados de trealose das leveduras testadas.

Tabela 5.1 – Resultados do rendimento em trealose na faixa de 0 - 1% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).

<i>Cerrado</i>			
<i>Código</i>	<i>% Trealose</i>	<i>Código</i>	<i>% Trealose</i>
AAB 12	0,62 ± 0,01	AAS 5	0,95 ± 0,02
AAA 10	0,81 ± 0,03	AAQ 3	0,86 ± 0,04
AAI 6	0,62 ± 0,02	AAQ 14	0,86 ± 0,01
AAT 1	0,47 ± 0,04	AAT 4	0,67 ± 0,02
AAG 5	0,93 ± 0,02	AAC 8	0,64 ± 0,03
AAC 2	0,82 ± 0,01	AAB 11	0,62 ± 0,01
AAO 13	0,42 ± 0,03	AAT 12	0,74 ± 0,02
AAI 3	0,34 ± 0,01	AAQ 2	0,79 ± 0,05
AAK 12	0,29 ± 0,02	AAT 5	0,19 ± 0,02
AAT 10	0,80 ± 0,02	AAI 4	0,90 ± 0,03
AAB 2	0,87 ± 0,05	AAC 7	0,44 ± 0,02
AAN 1	0,48 ± 0,02	AAA 11	0,89 ± 0,04
AAQ 16	0,70 ± 0,01	AAS 1	0,78 ± 0,03
AAS 8	0,83 ± 0,04	AAR 1	0,59 ± 0,02
<i>Floresta Amazônica</i>			
<i>Código</i>	<i>% Trealose</i>	<i>Código</i>	<i>% Trealose</i>
AL 2	0,32 ± 0,02	AS 5	0,74 ± 0,04
AS 2	0,62 ± 0,04	AG 3	0,96 ± 0,06
AS 8	0,71 ± 0,03	AS 10	0,41 ± 0,02
AO 4	0,40 ± 0,01	AS 5	0,49 ± 0,01
AS 14	0,78 ± 0,03	AJ 10	0,47 ± 0,03

→ Continuação Tabela 5.1

Pantanal			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
J 01	0,45 ± 0,01	D 01	0,68 ± 0,04
O 03	0,49 ± 0,02	C 01	0,94 ± 0,05
H 1	0,30 ± 0,03	H 01	0,66 ± 0,02
F 1	0,69 ± 0,02	Q 01	0,42 ± 0,03
E 03	0,63 ± 0,03	P 01	0,70 ± 0,02
E 01	0,84 ± 0,07	O 04	0,72 ± 0,01
F 01	0,82 ± 0,05	E 2	0,74 ± 0,03
N 02	0,64 ± 0,05	G 1	0,66 ± 0,02
F 03	0,99 ± 0,04	Q 02	0,64 ± 0,05
G 02	0,85 ± 0,03	L 01	0,39 ± 0,02
Mata Atlântica I			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
T 01	0,48 ± 0,02	AA 04	0,45 ± 0,05
T 18	0,39 ± 0,03	AC 06	0,38 ± 0,02
T 11	0,62 ± 0,05	X 08	0,55 ± 0,01
T 10	0,48 ± 0,02	T 16	0,35 ± 0,01
Z 04	0,61 ± 0,01	T 04	0,37 ± 0,02
T 3	0,62 ± 0,03	AB 04	0,49 ± 0,03
AA 03	0,92 ± 0,02	T 02	0,58 ± 0,03
X 05	0,54 ± 0,03	AB 14	0,62 ± 0,02
X 07	0,29 ± 0,01	AA 05	0,38 ± 0,03
Mata Atlântica II			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
AZ 13	0,80 ± 0,02	AY 6	0,41 ± 0,03
AV 4	0,52 ± 0,03	AX 7	0,72 ± 0,02
AX 1	0,40 ± 0,02	AZ 17	0,52 ± 0,02
AY 12	0,45 ± 0,01	AW 4	0,47 ± 0,03
AW 8	0,69 ± 0,05	AZ 9	0,38 ± 0,04
AX 9	0,69 ± 0,03	AZ 11	0,44 ± 0,02
AZ 12	0,99 ± 0,06	AZ 4	0,32 ± 0,01
Dornas de fermentação alcoólica			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
1 –Iracema C2	0,70 ± 0,02	12-Itaiquara	0,44 ± 0,03
2-Clealco Padrao	0,82 ± 0,05	13-São Martinho C1	0,86 ± 0,02
5-São Martinho C2	0,98 ± 0,05	14-Iracema C1	0,65 ± 0,02
9-Iracema C1	0,53 ± 0,02	16-São Francisco C3	0,72 ± 0,04
10-Junqueira C4	0,45 ± 0,01	19-Alcoolvale C6	0,39 ± 0,02
11-Unialco C1	0,46 ± 0,02		

Tabela 5.2 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 1 - 5% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).

Cerrado			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
AAI 5	1,02 ± 0,05	AAK 4	2,42 ± 0,10
AAT 3	1,16 ± 0,06	AAA 9	1,03 ± 0,06
AAQ 10	1,82 ± 0,12	AAA 2	1,09 ± 0,07
AAG 6	3,87 ± 0,11	AAT 2	1,40 ± 0,09
AAB 7	1,50 ± 0,06	AAF 5	4,37 ± 0,12
AAB 1	2,53 ± 0,09	AAF 3	2,78 ± 0,13
AAQ 12	1,07 ± 0,08	AAF 2	2,10 ± 0,09
AAC 9	1,01 ± 0,04	AAG 7	3,94 ± 0,08
AAH 5	1,36 ± 0,05	AAB 5	1,16 ± 0,05
AAO 2	1,22 ± 0,09	AAK 1	4,58 ± 0,07
AAG 1	1,93 ± 0,11	AAC 1	3,47 ± 0,05
AAA 6	1,05 ± 0,03	AAL 4	2,17 ± 0,10
AAA 01	1,54 ± 0,07	AAQ 17	2,92 ± 0,11
AAI 2	1,32 ± 0,05	AAH 1	1,63 ± 0,09
AAS 12	1,30 ± 0,08	AAJ 1	2,66 ± 0,13
AAB 8	1,38 ± 0,07	AAG 14	2,38 ± 0,08
AAA 1	1,48 ± 0,10	AAQ 6	3,10 ± 0,12
AAK 10	1,89 ± 0,11	AAQ 9	1,49 ± 0,06
AAA 7	1,56 ± 0,09	AAF 6	4,10 ± 0,10
AAS 4	1,05 ± 0,04		
Floresta Amazônica			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
AE 1	1,16 ± 0,09	AE 06	1,06 ± 0,10
AJ 6	3,25 ± 0,12	AS 13	1,29 ± 0,06
AS 6 B	3,26 ± 0,07	AJ 7	1,74 ± 0,07
AK 2	4,44 ± 0,06	AQ 1	3,99 ± 0,08
AQ 6	2,91 ± 0,10	AK 2	3,69 ± 0,05
AT 03	1,10 ± 0,07		
Pantanal			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
E 02	1,06 ± 0,10	M 03	1,30 ± 0,09
D 1	1,02 ± 0,06	G 01	1,03 ± 0,10
I 01	1,02 ± 0,05	M 02	1,36 ± 0,06
S 1	1,19 ± 0,07	L 02	1,13 ± 0,05
Q 03	1,17 ± 0,06	M 3	1,37 ± 0,03
Mata Atlântica I			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
AB 11	3,56 ± 0,11	AD 10	4,24 ± 0,11
U 06	2,69 ± 0,09	T 14	3,39 ± 0,10
X 04	1,20 ± 0,10	AB 01	3,46 ± 0,09

→ Continuação Tabela 5.2

Mata Atlântica II			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
AW 2	1,14 ± 0,08	AX 8	4,08 ± 0,10
AV 7	1,10 ± 0,03	AX 6	1,99 ± 0,08
AY 3	3,89 ± 0,12	AY 10	4,51 ± 0,11
AV 5	1,55 ± 0,11	AY 13	4,42 ± 0,12
AW 6	2,41 ± 0,09	AW 3	1,67 ± 0,03
Dornas de fermentação alcoólica			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
3-Equipav C1	1,38 ± 0,06	15-São J. Estiva C2	1,60 ± 0,03
4-São Carlos C2	1,07 ± 0,05	17-Unialco C3	3,63 ± 0,11
6-Nova America C4	1,99 ± 0,09	18-Agrest C1	2,77 ± 0,09
7-Corona C4	3,14 ± 0,13	20-Junqueira C4	4,52 ± 0,12
8-Corona C6	1,75 ± 0,10		

Tabela 5.3 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 5 - 10% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).

Cerrado			
Código	% Trealose	Código	% Trealose
AAQ 8	8,45 ± 0,21	AAG 11	6,47 ± 0,19
AAB 10	8,10 ± 0,18	AAD 5	5,43 ± 0,16
AAR 5	5,10 ± 0,15		
Pantanal			
J 06	7,05 ± 0,22	E 1	5,49 ± 0,19
Floresta Amazônica			
AS 9	9,73 ± 0,25	AF 7	6,25 ± 0,21
Mata Atlântica I			
U 1	8,84 ± 0,26	T 5	6,10 ± 0,15
AB 02	5,70 ± 0,18	Z 7	5,10 ± 0,12
Mata Atlântica II			
AY 9	5,02 ± 0,16		

Tabela 5.4 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 15 - 20% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).

Código	Origem	% Trealose
AAK 5	Cerrado	19,50 ± 1,06
AZ 16	Mata Atlântica II	16,83 ± 1,18
AZ 14	Mata Atlântica II	19,43 ± 0,31

Tabela 5.5 - Resultados do rendimento em trealose na faixa de 20 - 30% (g/100g massa seca) para as leveduras testadas (média de três determinações).

Código	Origem	% Trealose^e	Tempo (h)^f	M.S (g/L)^g
AAA 4	Cerrado	22,80 ± 0,31 a,b	18	2,4
AAF 4	Cerrado	24,50 ± 0,57 b,c	22	1,2
AY 2	Mata Atlântica II	20,79 ± 0,44 a	20	2,4
AAI 1	Cerrado	26,10 ± 1,00 c	17	2,6
AAG 12	Cerrado	26,33 ± 0,15 c	18	2,10
AAQ 7	Cerrado	30,77 ± 1,32 d	15	2,70

^e Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey;

^f Tempo (h) de cultivo até início da fase estacionária;

^g Massa Seca (g/L) no início da fase estacionária.

A levedura para a qual foi detectado o maior percentual de trealose foi isolada de material coletado no Cerrado (codificada como AAQ₇), com um rendimento de 30,8% (g de trealose/100g de massa seca) (Tabela 5.5). Este rendimento foi superior ao indicado em diversos trabalhos citados na literatura, a citar os resultados de Miyazaki et al. (1996), que através de uma técnica de “screening” obtiveram níveis de 19-22% (g/100g de massa seca) de trealose em células de *Filobasidium floriforme*, e de Chi et al. (2003), que indicaram níveis de 18% em células mutantes de *Saccharomycopsis fibuligera*, após 60h de fermentação a 30°C, em meio contendo amido, polipeptona e extrato de levedura.

Na Tabela 5.5 também podem ser visualizados os tempos de cultivo nos quais foi aplicado o processo de estresse térmico para as 6 cepas que apresentaram os maiores rendimentos em trealose, os quais corresponderam ao tempo necessário para o alcance da fase estacionária, bem como as concentrações de massa seca obtidas. Ressalta-se que a levedura que apresentou maior rendimento em trealose (AAQ₇), foi a que apresentou menor tempo de cultivo até o início da fase estacionária (15 h), apresentando portanto, maior velocidade de crescimento celular.

Na Tabela 5.6 pode-se observar o percentual de ocorrência das leveduras testadas nas faixas de produção de trealose observadas. Verifica-se que houve uma ocorrência significativa na faixa de produção inferior a 5%, totalizando 89% das leveduras testadas. Entretanto, 4,3% apresentaram níveis de trealose intracelular superiores a 15%, que pode ser considerado um bom resultado para etapas de seleção de microrganismos.

Tabela 5.6 – Ocorrência observada para as 209 leveduras testadas^a em diferentes faixas de produção de trealose (%) (g/100g massa seca).

Trealose (%)	Nº de Leveduras	Ocorrência (%)
0 - 1	101	48,3
1 - 5	85	40,7
5 - 10	14	6,7
15 - 20	3	1,4
20 - 30	6	2,9

^a Para 12 leveduras testadas o conteúdo de trealose não foi determinado em função do baixo crescimento celular no meio de cultivo usado na etapa de seleção .

Na Figura 5.1 pode-se visualizar a distribuição do número de leveduras testadas nos biomas de origem (áreas de coleta de amostras para o isolamento), com as respectivas faixas de produção de trealose. Pode-se observar que, entre as seis leveduras que apresentaram percentuais de 20 a 30% de trealose, cinco foram isoladas de material coletado no Cerrado, região árida e de baixa incidência de chuvas, onde a trealose pode exercer importante papel na manutenção da viabilidade celular. De acordo com Ribeiro et al. (1999), leveduras que colonizam ambientes tropicais são freqüentemente submetidas a variações de temperatura entre o dia e a noite; as altas temperaturas também aumentam as taxas de evaporação, o que resulta em concentração de solutos e desidratação. Assim, essas condições podem levar ao desenvolvimento de mecanismos de proteção, como o de acúmulo de trealose intracelular.

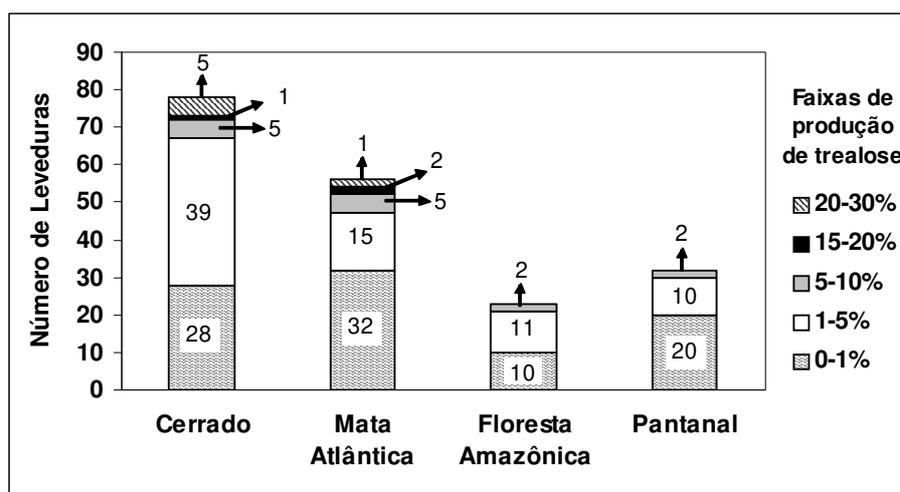


Figura 5.1 – Distribuição do número de leveduras testadas nos biomas de origem e ocorrência nas faixas de produção de trealose (g/100g massa seca) observadas.

Assim, baseando-se nos resultados obtidos para as leveduras testadas (Tabelas 5.1 a 5.5) foram selecionadas duas leveduras para o prosseguimento do estudo de otimização da produção de trealose, as quais foram as leveduras codificadas como **AAQ₇** e **AAG₁₂**. Ambas foram isoladas de flores coletadas no bioma Cerrado (GO).

Os resultados do teste de Tukey apresentados na Tabela 5.5, o qual foi realizado para diferenciar as leveduras que apresentaram maiores rendimentos em trealose (20-30%), demonstram que a cepa AAQ₇ diferiu significativamente em relação às demais ($p \leq 0,05$) no que se refere ao percentual de trealose acumulado. A cepa AAG₁₂ apresentou resultado semelhante ($p \geq 0,05$) às cepas AAI₁ e AAAF₄, sendo selecionada aleatoriamente.

5.1.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS: CEPAS AAQ₇ E AAG₁₂

As seqüências de nucleotídeos do DNA das cepas de leveduras selecionadas, obtidas através da técnica de seqüenciamento da região ITS (internal transcribed spacer) do rDNA, estão demonstradas na Tabela 5.7. Estas seqüências foram comparadas com as seqüências de nucleotídeos da base de dados do NCBI, através do serviço online, obtendo-se os seguintes resultados para a identificação:

Cepa AAQ₇: *Rhodotorula dairenensis*

Cepa AAG₁₂: *Rhodosporidium paludigenum*

Os números de acesso na base de dados do NCBI são **AF444501** para a cepa AAQ₇ e **AB073257** para a cepa AAG₁₂.

Tabela 5.7 - Seqüências de nucleotídeos obtidas na identificação das cepas AAQ₇ e AAG₁₂.

Cepa	Seqüência de nucleotídeos
AAQ ₇	CTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTGTA GATCTAATCTTAAAATGTAGACATTCTGATTAGAAGCTTCCTTTAACCTA ACCCGGCTCTAATCCGAAGATTAGAATTCCTCAGCGAATAGTCTATTACG CCAAGTCAATCCGAAGTTCGATTGCGGATGCTAATGCATTACGAACGAGC TAGACCGTAAGGCCAGCAACGCTCAGAATCCAAACACCTCTTCAATCATT AAGAAAGAGGAGGGTTGAAGTATTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCA CGGAATACCATGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGA ATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTCATCGATG CGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTATTTTGTATAAAATTAA ATACATTCATAGACTTTGTGTTTATAAGTGAATAGGAGTTCGCTCTCTTG CGAGAGTTACTATCCCAAACAAATGCACAGGGTTAGAAAAGTGAGAGTTTCG GACTCCAAGTTAAGTTGGACGTCTATGTTCACTAATGATCCTTCCGCAG GTTACC
AAG ₁₂	GTTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGATCTAATCAAAAGTTAGACT TTTAGGATTAGAAGCTTCCTTTAACCCAACCCGGCTCTGGTACGAGACCA GAATCCTCAGCGAATAGTCTATTACGCCAAGTCAATCCGAAGTTCGATTG CGGATGCTAATGCATTACGAACGAGCTAGGCCGAAGCCAGCAGCGCTCAG GATCCAAGCACCTCTCGATTCACTAAGAAAAGAGAGGGTTGAAGATTTCA TGACACTCAAACAGGCATGCTCTCCGGAATACCAGAGAGCGCAAGGTGCG TTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC ATTTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAA AGTTTTGTTTTGTTATAAATTTTATACATTCATAGACTTTGTGTTTTAAG TGAATGGCGTTCACTCCCGAGAGAGCTACTGACCAGAAACAGATGCACAG GGTTAGAAAAGTGAGAGTTCGGGCTCCAAGTTAAGTTGGACGCCCTAATAT TCACTAATGATCCTTCCGCAGGTTCA

Através das Figuras 5.2 e 5.3 pode-se visualizar o aspecto das colônias das leveduras *Rhodotorula dairenensis* e *Rhodosporidium paludigenum*, no cultivo em placas em agar GYMP e também o aspecto celular geral obtido através de microscopia ótica.

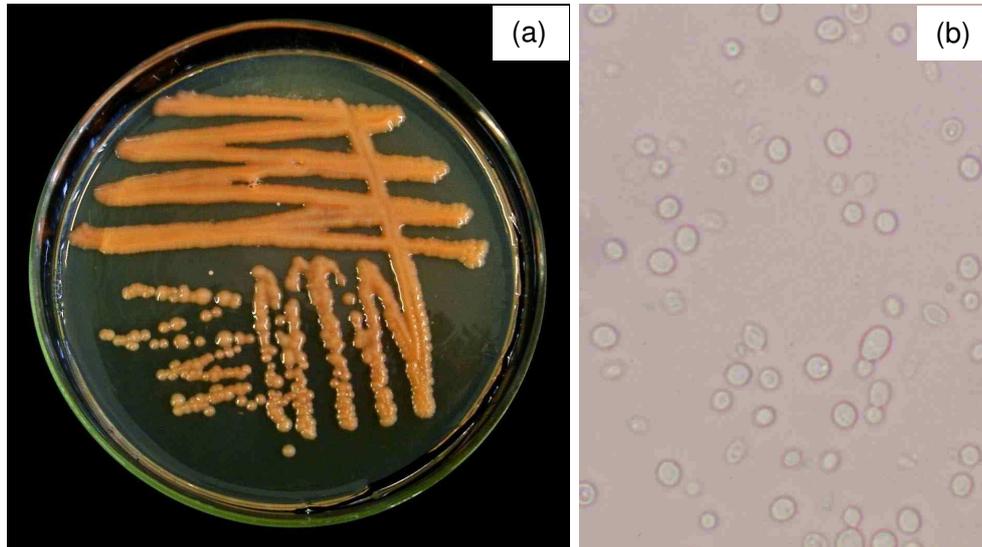


Figura 5.2 – Colônias de *Rhodotorula dairenensis* em agar GYMP (a) e microscopia ótica das células (b) após 3 dias de cultivo em meio líquido GYMP.

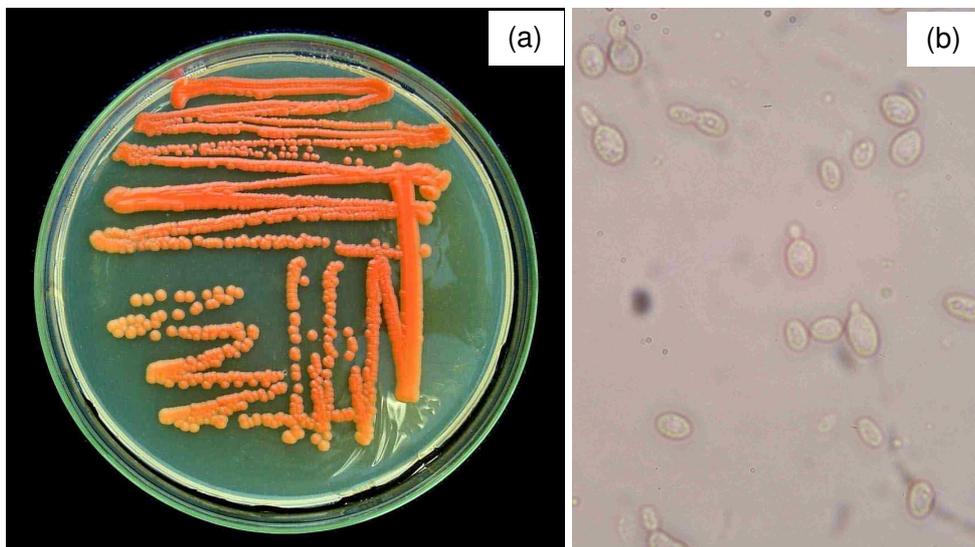


Figura 5.3 – Colônias de *Rhodospordium paludigenum* em agar GYMP (a) e microscopia ótica das células (b) após 3 dias de cultivo em meio líquido GYMP.

Pode-se verificar que a levedura *Rhodotorula dairenensis* apresenta forma celular circular (Figura 5.2 b) e colônias com superfície lisa, textura cremosa e pigmento alaranjado (Figura 5.2 a); estas características são típicas do gênero *Rhodotorula*.

As leveduras do gênero *Rhodotorula* pertencem à classe Basidiomycetes. Algumas linhagens podem produzir pseudomicélios, mas não produzem esporos sexuais, sendo consideradas “leveduras falsas” ou imperfeitas. Apresentam células esféricas, ovóides ou alongadas. Muitas espécies produzem colônias laranja ou rosadas, entretanto a pigmentação das colônias pode variar de amarelo a vermelho escuro. Existem mais de trinta espécies de *Rhodotorula*, sendo que as mais comuns são *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa* (KREGGER-VAN RIJ, 1987).

De acordo com Nagahama et al. (2006), algumas cepas de *Rhodotorula dairenensis* foram classificadas, formalmente, como *Rhodotorula glutinis*, com base na capacidade destas cepas de assimilar nitrito e nitrato. Como indicado pelo nome, o gênero *Rhodotorula* originalmente compreende leveduras vermelhas, devido à presença de pigmentos carotenóides. Leveduras com pigmentos carotenóides amarelos também estão incluídas nesse gênero. Linhagens de *Rhodotorula* podem ser isoladas de várias fontes, incluindo folhas, flores, atmosfera, solo e fontes marinhas (PITT e HOCKING, 1999).

As características visuais da levedura *Rhodospiridium paludigenum* apresentaram-se semelhantes às da *Rhodotorula* (Figura 5.3). Entretanto, a pigmentação laranja mostrou-se mais acentuada para o gênero *Rhodospiridium*, no cultivo em agar e em meio líquido.

O gênero de leveduras *Rhodospiridium* também pertence à classe Basidiomycetes e compreende diversas espécies de larga distribuição ecológica, isoladas de diversas origens, desde água salgada a humanos. Todas as espécies produzem pigmentos carotenóides que conferem às colônias cores avermelhadas ou alaranjadas. Os membros desse gênero são caracterizados pela reprodução assexuada através de brotamento, apresentando uma fase sexuada (ou estado teleomórfico) pela formação de estruturas especializadas denominadas teliósporos. Tal como outras leveduras basidiomicetas, mas em contraste com os correspondentes fungos filamentosos que incluem espécies fitopatogênicas, o ciclo sexuado de *Rhodospiridium* é completado em meios laboratoriais. Trata-se de um ciclo dimórfico que compreende a transição de uma fase haplóide unicelular, por fusão de células complementares, que origina uma fase filamentosa

dicariótica onde são produzidas estruturas especializadas denominadas teliósporos que, por sua vez, dão origem aos basídios e respectivos basidiósporos (HAMAMOTO et al., 2002).

5.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE PELA LEVEDURA *Rhodotorula dairenensis*

5.2.1 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR – LEVEDURA *Rhodotorula dairenensis*

5.2.1.1 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO

Para a otimização do crescimento celular utilizou-se o meio industrial composto por Melaço, Água de Maceração de Milho (AMM) e *Prodex Lac®*, devido aos resultados anteriores encontrados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB/FEA/UNICAMP), a citar os de Kabke (2002) e Treichel (2004). De acordo com estes autores e com Hahn-Hägerdal et al. (2005), o melaço e água de maceração de milho, além de suprir as necessidades de carbono e nitrogênio, fornecem vitaminas e elementos traço necessários ao crescimento celular e produção de metabólitos. Além disto, proporcionam acentuada redução nos custos, uma vez que são subprodutos da indústria de açúcar e do amido, respectivamente. Kabke (2002), indica uma redução de aproximadamente 98% nos custos de um meio industrial para produção de inulinase, quando comparado a um meio sintético composto por sacarose, extrato de levedura, peptona e K_2HPO_4 .

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e respostas de massa seca, assim como os resultados obtidos para o Meio Controle, está apresentada na Tabela 5.8. Comparando-se as respostas do planejamento com os resultados obtidos para o Meio Controle, o qual é composto por glicose e YNB, verifica-se que houve um aumento considerável na concentração de massa seca (M.S) da levedura em estudo, com o uso das fontes alternativas de nutrientes. O menor valor observado entre as respostas do planejamento foi de 4,57 g/L de massa seca, no ensaio 14, e o maior valor foi de 7,84 g/L, no ensaio 7, o que representa um acréscimo de 78% no crescimento celular, em relação ao resultado médio obtido com o Meio Controle (4,42 g/L).

Tabela 5.8 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} (valores reais e codificados) com as respostas de M.S (g/L) para a levedura *Rhodotorula dairenensis*.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d	x_5^e	M.S (g/L) ^f
1	-1 (50)	-1 (30)	-1 (2)	-1 (25)	+1 (6)	7,05 ± 0,02
2	+1 (100)	-1 (30)	-1 (2)	-1 (25)	-1 (5)	6,34 ± 0,06
3	-1 (50)	+1 (70)	-1 (2)	-1 (25)	-1 (5)	7,52 ± 0,03
4	+1 (100)	+1 (70)	-1 (2)	-1 (25)	+1 (6)	7,60 ± 0,09
5	-1 (50)	-1 (30)	+1 (6)	-1 (25)	-1 (5)	7,03 ± 0,01
6	+1 (100)	-1 (30)	+1 (6)	-1 (25)	+1 (6)	6,55 ± 0,07
7	-1 (50)	+1 (70)	+1 (6)	-1 (25)	+1 (6)	7,84 ± 0,02
8	+1 (100)	+1 (70)	+1 (6)	-1 (25)	-1 (5)	7,34 ± 0,04
9	-1 (50)	-1 (30)	-1 (2)	+1 (35)	-1 (5)	5,16 ± 0,06
10	+1 (100)	-1 (30)	-1 (2)	+1 (35)	+1 (6)	5,30 ± 0,11
11	-1 (50)	+1 (70)	-1 (2)	+1 (35)	+1 (6)	6,06 ± 0,07
12	+1 (100)	+1 (70)	-1 (2)	+1 (35)	-1 (5)	4,97 ± 0,06
13	-1 (50)	-1 (30)	+1 (6)	+1 (35)	+1 (6)	5,13 ± 0,09
14	+1 (100)	-1 (30)	+1 (6)	+1 (35)	-1 (5)	4,57 ± 0,14
15	-1 (50)	+1 (70)	+1 (6)	+1 (35)	-1 (5)	5,50 ± 0,13
16	+1 (100)	+1 (70)	+1 (6)	+1 (35)	+1 (6)	5,52 ± 0,02
17	0 (75)	0 (50)	0 (4)	0 (30)	0 (5,5)	6,77 ± 0,16
18	0 (75)	0 (50)	0 (4)	0 (30)	0 (5,5)	6,81 ± 0,09
19	0 (75)	0 (50)	0 (4)	0 (30)	0 (5,5)	6,75 ± 0,10
Meio Controle ^g	-	-	-	-	-	4,40 ± 0,03
Meio Controle ^g	-	-	-	-	-	4,45 ± 0,09
Meio Controle ^g	-	-	-	-	-	4,40 ± 0,17

^a concentração de Melaço (g/L) - 51% de ART para o lote utilizado; ^b concentração de AMM (g/L) - 50% de nitrogênio total para o lote utilizado; ^c concentração de *Prodex Lac®* (g/L); ^d temperatura (°C); ^e pH; ^f Massa Seca ± erro padrão: os resultados representam a média de 3 determinações; ^g 30 g/L de glicose e 6,5 g/L de YNB.

Analisando-se os resultados da Tabela 5.8 foi possível calcular os efeitos das cinco variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Efeito dos fatores estudados no planejamento fracionário 2^{5-1} sobre a concentração de M.S (g/L) da levedura *Rhodotorula dairenensis*.

Fatores	Efeito ^a	Erro Padrão	t (13)	p - valor
Média	6,31	0,07	87,65	< 0,0001*
Melaço	-0,39	0,16	-2,47	0,0279*
A.M.M	0,66	0,16	4,18	0,0011*
<i>Prodex Lac®</i>	-0,06	0,16	-0,41	0,6890
T (°C)	-1,88	0,16	-12,01	< 0,0001*
pH	0,32	0,16	2,07	0,0592

^a Os efeitos são apresentados em g/L; * p<0,05.

Pode-se verificar na Tabela 5.9 que, com exceção do *Prodex Lac®* e do pH, as demais variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) sobre a resposta estudada. O melaço apresentou efeito negativo sobre a resposta de massa seca, indicando que o maior crescimento celular ocorre a menores concentrações deste componente, dentro da faixa estudada (50 - 100 g/L, o que corresponde a aproximadamente 25 - 50 g/L de ART). Este comportamento pode ser justificado pela composição do melaço, que além de minerais (7 - 11%) contém alta concentração de açúcares redutores totais (51%), resultando na possível inibição do crescimento celular. O nível +1 do planejamento, por exemplo, corresponde a concentração de 100 g/L de melaço, que equivale a 51 g/L de açúcares redutores totais. Em relação à composição em minerais, Sirianuntapiboon et al. (2004) indicam que a concentração de metais pesados do melaço inibe o crescimento de microrganismos, influencia o pH e está envolvida na inativação de enzimas. Sendo assim, para a realização do planejamento completo visando a otimização do crescimento celular, a faixa de estudo para o melaço foi redefinida em 20 - 80 g/L, o que corresponde a aproximadamente 10 - 40 g/L de ART.

A variável água de maceração de milho apresentou efeito positivo sobre a resposta de massa seca, provavelmente pelo seu alto teor de nitrogênio (50%) e vitaminas. Neste planejamento a faixa estudada para esta variável foi de 30 - 70 g/L, sendo que para o planejamento completo redefiniu-se a faixa em 20 - 80 g/L (ampliação da faixa).

A concentração de *Prodex Lac®* não exerceu efeito significativo sobre a massa seca. Assim, o uso de qualquer valor dentro da faixa estudada (2 - 6 g/L) resulta em concentrações celulares estatisticamente semelhantes. Assim, no planejamento completo abordou-se a faixa de 0 - 2 g/L, para verificar a possibilidade de suprimir este componente do meio de cultivo.

O pH também não exerceu efeito estatisticamente significativo sobre a resposta em estudo. Assim, foi fixado em 5,5 no planejamento completo para otimização do crescimento celular e na fase de estudo da produção de trealose, para facilitar seu ajuste, uma vez que o pH dos meios preparados para os ensaios do planejamento fracionário (Tabela 5.8) variou entre 4,10 e 4,40, em função do pH do melaço e da AMM (5,9 e 4,1, respectivamente).

A temperatura foi a variável que apresentou maior efeito sobre a resposta de massa seca, sendo este negativo, observando-se um maior crescimento celular com a diminuição da temperatura, dentro da faixa estudada (25 a 35°C). Assim, a melhor

temperatura seria 25°C, no entanto, para o planejamento completo, foi fixada em 30°C, pois é uma temperatura operacionalmente mais interessante na prática industrial, nas condições ambientais brasileiras.

5.2.1.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Em função das considerações expostas no item 5.2.1.1, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado para a otimização do crescimento celular da levedura *Rhodotorula dairenensis*, considerando como variáveis as concentrações de melação, água de maceração de milho e *Prodex Lac@*.

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para a concentração de massa seca estão apresentadas na Tabela 5.10. Para efeito de comparação, novamente foram realizados três ensaios com o “Meio Controle”. Os tempos de cultivo para o alcance da fase estacionária de crescimento celular variaram de 24 a 32 horas, dependendo da composição dos meios.

Pode-se observar na Tabela 5.10 que a massa seca variou de 13,62 a 26,72 g/L (ensaios 11 e 4). Os pontos centrais apresentaram uma pequena variação (erro padrão = $\pm 0,18$), indicando uma boa repetibilidade do processo. Assim como observado no planejamento fracionário 2^{5-1} , os resultados para a massa seca obtida no cultivo em meio industrial foram superiores aos resultados obtidos com o Meio Controle. Para este meio, a média da massa seca obtida foi de 9,4 g/L, enquanto o valor inferior obtido dentre os 17 ensaios do planejamento foi de 13,62 g/L. Ressalta-se ainda que os resultados de massa seca observados para o Meio Controle no planejamento fracionário (Tabela 5.8) foram inferiores aos resultados observados na realização do planejamento completo (Tabela 5.10), o que pode ser atribuído a uma possível ativação das células da levedura em estudo, devido as sucessivas repicagens realizadas para a obtenção de inóculos.

Analisando-se os resultados do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 5.11. Confirmando o resultado obtido no planejamento fracionário 2^{5-1} , a variável *Prodex Lac@* não apresentou efeito significativo, de modo que qualquer valor na faixa de 0 - 2g/L conduziu a resultados semelhantes de concentração de massa seca. Desta forma, este componente foi suprimido do meio de cultivo para os estudos posteriores de produção de trealose.

Tabela 5.10 – Matriz do DCCR com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de M.S (g/L), valores preditos pelo modelo e desvios relativos, para a levedura *Rhodotorula dairenensis*.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	M.S (g/L) ^d	M.S predita ^e	Desvio relativo (%) ^f
1	-1 (32)	-1 (32)	-1 (0,4)	14,35 ± 0,23	14,93	-4,05
2	+1 (68)	-1 (32)	-1 (0,4)	18,88 ± 0,13	19,13	-1,33
3	-1 (32)	+1 (68)	-1 (0,4)	21,92 ± 0,07	20,03	8,62
4	+1 (68)	+1 (68)	-1 (0,4)	26,72 ± 0,43	24,23	9,32
5	-1 (32)	-1 (32)	+1 (1,6)	15,33 ± 0,21	14,93	2,62
6	+1 (68)	-1 (32)	+1 (1,6)	19,37 ± 0,49	19,13	1,24
7	-1 (32)	+1 (68)	+1 (1,6)	22,05 ± 0,02	20,03	9,15
8	+1 (68)	+1 (68)	+1 (1,6)	25,18 ± 0,11	24,23	3,81
9	-1,68 (20)	0 (50)	0 (1)	15,46 ± 0,07	16,82	-8,75
10	+1,68 (80)	0 (50)	0 (1)	22,69 ± 0,40	23,87	-5,22
11	0 (50)	-1,68 (20)	0 (1)	13,62 ± 0,04	12,64	7,17
12	0 (50)	+1,68 (80)	0 (1)	17,70 ± 0,27	21,21	-19,84
13	0 (50)	0 (50)	-1,68 (0)	20,51 ± 0,14	21,87	-6,60
14	0 (50)	0 (50)	+1,68 (2)	21,51 ± 0,16	21,87	-1,64
15	0 (50)	0 (50)	0 (1)	21,73 ± 0,04	21,87	-0,65
16	0 (50)	0 (50)	0 (1)	21,93 ± 0,05	21,87	0,26
17	0 (50)	0 (50)	0 (1)	21,57 ± 0,16	21,87	-1,38
Meio Controle ^g	-	-	-	9,70 ± 0,03	-	-
Meio Controle ^g	-	-	-	9,65 ± 0,05	-	-
Meio Controle ^g	-	-	-	8,90 ± 0,13	-	-

^a concentração de Melaço (g/L); ^b concentração de AMM (g/L); ^c concentração de *ProdexLac*® (g/L);

^d Massa Seca ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações.

^e Valores de massa seca (g/L) preditos pelo modelo.

^f Desvio Relativo= $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo; ^g 30 g/L de glicose e 6,5 g/L de YNB.

Tabela 5.11 - Coeficientes de regressão para a resposta de M.S (g/L) da levedura *Rhodotorula dairenensis*.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (7)	p - valor
Média	21,60	1,22	17,65	<0,0000*
x_1 (L)	2,10	0,58	3,65	0,0082*
x_1 (Q)	-0,48	0,63	-0,76	0,4747
x_2 (L)	2,55	0,58	4,43	0,0030*
x_2 (Q)	-1,69	0,63	-2,66	0,0322*
x_3 (L)	0,13	0,58	0,22	0,8296
x_3 (Q)	0,21	0,63	0,33	0,7516
$x_1 \times x_2$	-0,08	0,75	-0,10	0,9199
$x_1 \times x_3$	-0,27	0,75	-0,36	0,7310
$x_2 \times x_3$	-0,36	0,75	-0,48	0,6467

*p<0,05; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Considerando-se os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$) obteve-se a Equação 5.1, que representa o modelo quadrático da massa seca em função das variáveis estudadas para a levedura *Rhodotorula dairenensis*. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.12. Como o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi altamente significativo ($p=0,00008$), sendo 5,1 vezes maior que o F_{tabelado} , e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 85\%$), considerando a variabilidade inerente aos bioprocessos (HAALAND, 1989), podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 5.4. Além disto, os desvios relativos (Tabela 5.10) foram inferiores a 10% (exceto para o ensaio 12), comprovando o ajuste adequado do modelo aos dados experimentais.

$$\text{M.S (g/L)} = 21,87 + 2,10.x_1 - 0,54.x_1^2 + 2,55.x_2 - 1,75.x_2^2 \quad [5.1]$$

Tabela 5.12 – ANOVA do modelo quadrático para predição da M.S (g/L) de *Rhodotorula dairenensis*.

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculado}	p-valor
Regressão	186,79	4	46,70	16,50	<0,0001
Resíduos	33,96	12	2,83		
Total	220,74	16			

% variação explicada (R^2) = 84,62 $F_{4;12;0,05} = 3,26$

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Pode-se observar através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 5.4) que há uma região ótima para o maior crescimento celular na faixa de combinações de concentração de melão igual a 45 - 80 g/L e AMM de 40 - 80 g/L. De acordo com Rodrigues e Lemma (2005), a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda, o processo na condição otimizada. No entanto, os autores sugerem a realização de ensaios, ao menos em triplicata, nas condições definidas após a análise de superfície de resposta para validação experimental da resposta prevista pelo modelo proposto.

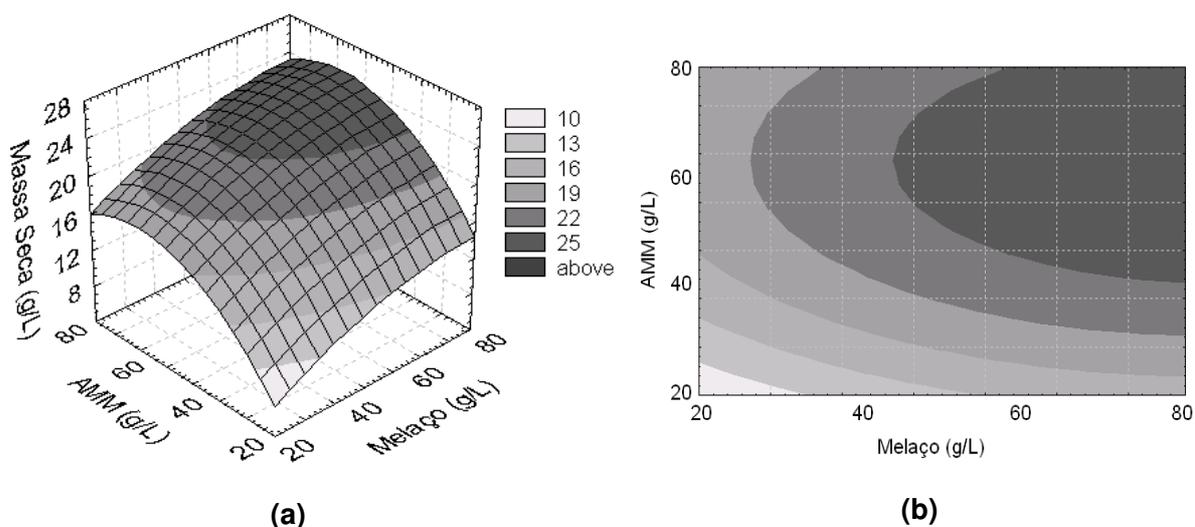


Figura 5.4 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para Massa Seca (g/L) em função das concentrações de melaço e AMM, para a levedura *Rhodotorula dairenensis*.

Em virtude dos resultados encontrados para a massa seca, atingindo-se concentrações superiores a 20 g/L (Tabela 5.10), pode-se dizer que o meio industrial (composto por melaço e água de maceração de milho) foi capaz de suprir as necessidades de nutrientes e vitaminas da célula, devido a sua composição complexa. Além disto, a utilização deste meio pode proporcionar acentuada redução nos custos da produção de trealose, visto que os dois componentes são subprodutos da indústria do açúcar e do amido. Torna-se interessante ressaltar que, em comparação aos resultados obtidos no planejamento fracionário (Tabela 5.8), obteve-se um acréscimo significativo no crescimento celular da levedura estudada com a modificação das faixas de estudo das variáveis e realização do planejamento completo, comprovando-se que o uso de estratégias seqüenciais de planejamento experimental é interessante para atingir as condições otimizadas das variáveis estudadas.

Não foram encontrados dados na literatura a respeito do crescimento de *Rhodotorula dairenensis* em meios complexos ou sintéticos. Comparando-se a concentração celular alcançada neste trabalho (20 g/L) com resultados de outros gêneros de leveduras avaliadas em relação a produção de trealose, observou-se que os resultados deste trabalho foram superiores. Chi et al. (2003), avaliaram a produção de trealose por um mutante de *Saccharomycopsis fibuligera* em meio de cultivo contendo amido, polipeptona e extrato de levedura, obtendo máxima concentração celular de 6 g/L

após 40 h de cultivo. Entretanto, em trabalho anterior com cepas não mutantes de *Saccharomycopsis fibuligera*, estes autores observaram crescimento celular de 19 g/L, utilizando um meio de cultivo composto por amido solúvel, hidrolisado de soja e extrato de levedura (CHI et al., 2001). Por sua vez, Liu et al. (2006), indicaram a concentração de 4,2 g/L como máxima concentração celular para células de *Cândida krusei* em meio de cultivo contendo glicose, uréia e sais de fosfato e magnésio.

Estes dados reforçam a discussão feita anteriormente, quando se indicou que o meio industrial utilizado neste trabalho apresenta vantagens em relação ao meio controle avaliado (composto por glicose e YNB), promovendo crescimento celular satisfatório da levedura *Rhodotorula dairenensis* e proporcionando a redução dos custos do meio de cultivo.

5.2.2 DEFINIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE TREALOSE POR *Rhodotorula dairenensis*

Para a definição do meio de cultivo que seria utilizado na etapa de produção da trealose pela levedura *Rhodotorula dairenensis* realizou-se um teste com os ensaios 1, 4 e ponto central do DDCR utilizado para a otimização do crescimento celular (Tabela 5.10), para confirmar os resultados observados neste planejamento e avaliar se a melhor condição para o crescimento celular corresponderia a melhor condição para a produção de trealose sob estresse térmico. O ensaio 1 foi escolhido por representar a condição de menor concentração de substrato (32 g/L de melão e AMM, e 0,4 g/L de *Prodex Lac®*) na faixa estudada, o que seria interessante economicamente. O ensaio 4 corresponde às concentrações de melão e AMM que ficam dentro da região ótima, definida na superfície de resposta (Figura 5.4), e o ponto central corresponde à condição intermediária.

O teste com o meio equivalente ao ponto central foi realizado com e sem a adição de *Prodex Lac®* para que pudéssemos confirmar a possibilidade de suprimir este componente do meio de cultivo na etapa de produção da trealose, uma vez que para o crescimento celular este componente não exerceu efeito significativo. Simultaneamente foi conduzido um ensaio com o Meio Controle, para fins de comparação.

No final da fase exponencial de crescimento celular, a qual foi atingida no tempo de 28h de cultivo para os ensaios 1 e 4, e 30h para os demais, realizou-se a transferência dos cultivos para a temperatura de 45°C durante 90', para a indução da síntese da

trealose. Os resultados obtidos para a massa seca no final da fase exponencial e para o percentual de trealose estão demonstrados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Resultados de M.S (g/L) e trealose (%) para os ensaios 1, 4 e central do DCCR realizado para otimização do crescimento celular de *Rhodotorula dairenensis*.

Ensaio	Melaço (g/L)	AMM (g/L)	Prodex Lac® (g/L)	M.S (g/L) ^a	Trealose (%) ^b
1	32	32	0,4	13,50 ± 0,07	12,84 ± 0,78
4	68	68	0,4	20,17 ± 1,07	16,10 ± 0,98
Central – com <i>Prodex Lac®</i>	50	50	1,0	17,80 ± 0,27	19,95 ± 0,64
Central – sem <i>Prodex Lac®</i>	50	50	0,0	16,90 ± 0,13	19,20 ± 0,47
Meio Controle ^c	-	-	-	6,25 ± 0,13	11,52 ± 0,82

^a Massa Seca ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações.

^b Trealose ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações;

^c 30 g/L de glicose e 6,5 g/L de YNB.

Pode-se observar na Tabela 5.13 que o maior rendimento de trealose foi obtido nas condições do ponto central. Em virtude dos resultados obtidos com e sem *Prodex Lac®* não diferirem significativamente entre si ($p \geq 0,05$, teste de Tukey), para a etapa de otimização da produção de trealose optou-se por utilizar o meio de cultivo composto apenas por melaço e AMM, sendo as concentrações de ambos componentes, fixadas em 50 g/L.

Com as condições de cultivo definidas (50 g/L de melaço e 50 g/L de AMM, temperatura de 30°C e pH inicial de 5,5) realizou-se o acompanhamento do crescimento celular (massa seca) da levedura *Rhodotorula dairenensis* em um cultivo em triplicata, para a definição do tempo no qual seria aplicado o estresse térmico para o estudo da produção de trealose. Vários autores indicam a aplicação deste tipo de estresse durante a fase exponencial de crescimento celular, na qual o estado fisiológico das células permite um maior acúmulo de trealose (ARGÜELLES, 1997; CARVALHEIRO et al., 1999; LIU et al., 2005). Pode-se verificar na Figura 5.5 que a fase exponencial ocorreu entre 10 e 25 h de cultivo, aproximadamente. Definiu-se, portanto, que a aplicação do estresse térmico para a indução da síntese de trealose nas células da levedura *Rhodotorula dairenensis* seria realizada no tempo de cultivo de 20 h, no qual as células encontravam-se na fase exponencial plena de crescimento celular.

Na Figura 5.5 também podem ser observadas as características de consumo de açúcares redutores (AR) e totais (ART) da levedura *Rhodotorula dairenensis* no meio de cultivo definido, bem como a variação do pH. A concentração de ART no início da fermentação apresentou-se de acordo com o esperado, uma vez que o lote de melaço utilizado continha 51% de ART e a concentração deste componente no meio de cultivo foi de 50 g/L. Considerando que foi utilizado 10% (v/v) de inóculo para o início da fermentação, o valor apresentado na Figura 5.5, de aproximadamente 30 g/L de ART, pode ser considerado adequado.

As concentrações de açúcares redutores e totais diminuíram rapidamente durante a fase exponencial de crescimento, atingindo um nível mínimo em 24h de cultivo, coincidindo com o início da estabilização do crescimento celular (fase estacionária).

O acompanhamento do pH demonstra que houve uma diminuição deste parâmetro até 16h de cultivo, devido à produção de metabólitos ácidos durante a fase exponencial de crescimento celular. Posteriormente observa-se um acréscimo no pH, coincidindo com a diminuição da concentração de açúcares e início da fase estacionária.

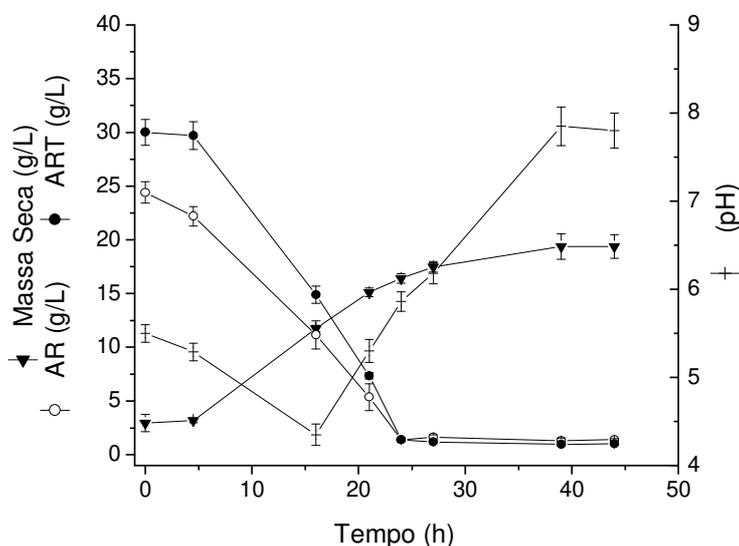


Figura 5.5 – Acompanhamento do crescimento celular (▼ massa seca), pH (+) e consumo de açúcares redutores (○ AR) e totais (● ART) para o cultivo de *Rhodotorula dairenensis* em meio com 50 g/L de melaço e AMM, a 30°C.

5.2.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE POR *Rhodotorula dairenensis* EM FRASCOS AGITADOS

5.2.3.1 PRIMEIRO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE – *Rhodotorula dairenensis*

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas no primeiro DCCR realizado para a otimização da produção de trealose pela levedura *Rhodotorula dairenensis*, bem como as respostas obtidas para a concentração de trealose intracelular estão apresentadas na Tabela 5.14. Utilizou-se o meio de cultivo e condições definidas na etapa de otimização do crescimento celular (pH 5,5, cultivo a 30°C, 50 g/L de melaço e AMM), realizando-se o estresse térmico de acordo com as condições de cada ensaio do planejamento, na fase exponencial de crescimento (20h de fermentação).

Tabela 5.14 - Matriz do primeiro DCCR realizado para otimização da produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis* com níveis reais e codificados das variáveis e respostas de trealose (%).

Ensaio	x_1^a	x_2^b	Trealose (%) ^c	Trealose predita ^d	Desvio relativo (%)
1	-1 (35)	-1 (69)	16,82 ± 0,83	16,92	-0,58
2	+1 (45)	-1 (69)	10,70 ± 0,47	9,16	14,40
3	-1 (35)	+1 (111)	20,38 ± 0,47	20,63	-1,19
4	+1 (45)	+1 (111)	11,53 ± 1,27	12,87	-11,55
5	-1,41 (33)	0 (90)	19,69 ± 0,90	19,46	1,18
6	+1,41 (47)	0 (90)	8,32 ± 0,23	8,48	-1,92
7	0 (40)	-1,41 (60)	12,15 ± 1,10	13,19	-8,54
8	0 (40)	+1,41 (120)	19,53 ± 0,99	18,43	5,62
9	0 (40)	0 (90)	10,65 ± 1,54	11,43	-7,29
10	0 (40)	0 (90)	11,20 ± 1,09	11,43	-2,05
11	0 (40)	0 (90)	12,43 ± 1,10	11,43	8,05
Antes Estresse	-	-	12,04 ± 0,44	-	-
Meio Controle	45	90	9,10 ± 0,92	-	-

^a = temperatura (°C); ^b = tempo de exposição (min); ^c ± erro padrão – os resultados representam a média de 3 determinações; ^d Valores de trealose preditos pelo modelo.

Os maiores teores de trealose foram observados nos ensaios 3 (20,38%), 5 (19,69%) e 8 (19,53%), cujos valores são estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$, pelo teste de Tukey). Estes resultados são semelhantes aos indicados por Meleiro et al. (1993), que alcançaram um conteúdo de 20% de trealose (g/100g de massa seca) em

células de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas a um tratamento térmico a 40°C em meio com glicose como fonte de carbono, e Liu et al. (2006), que observaram um acúmulo de 16% de trealose em células de *Cândida krusei* em crescimento exponencial, submetidas a um estresse osmótico (adição de NaCl ao meio contendo glicose e uréia). No entanto, são superiores aos resultados indicados por Liu et al. (2005) (7,8% em células de *Cândida krusei* submetidas a estresse térmico de 45°C, em meio com glicose e uréia) e Diniz-Mendes et al. (1999) (11,2% em células de *S. cerevisiae* em estresse térmico a 40°C, em meio com glicose e extrato de levedura).

Realizando-se a análise estatística dos resultados obtiveram-se os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 5.15. Considerando-se os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$) a Equação 5.2 representa o modelo quadrático para a resposta trealose, em função da temperatura e do tempo de exposição ao estresse térmico.

A Tabela 5.16 apresenta a ANOVA dos resultados obtidos, sendo o coeficiente de determinação igual a 0,96 e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão 7,1 vezes maior que o valor de F_{tabelado} . Os desvios relativos (Tabela 5.14) também foram adequados, sendo possível construir a superfície de resposta apresentada na Figura 5.6.

Tabela 5.15 - Coeficientes de regressão para a resposta de trealose intracelular (%) para *Rhodotorula dairenensis* obtidos no primeiro DCCR.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p - valor
Média	11,43	0,65	17,53	<0,0000*
x_1 (L)	-3,88	0,40	-9,72	0,0002*
x_1 (Q)	1,27	0,48	2,68	0,0439*
x_2 (L)	1,86	0,40	4,65	0,0056*
x_2 (Q)	2,19	0,48	4,61	0,0058*
$x_1 \cdot x_2$	-0,68	0,56	-1,21	0,2810

* $p \leq 0,05$; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

$$\text{Trealose (\%)} = 11,43 - 3,88 \cdot x_1 + 1,27 \cdot x_1^2 + 1,86 \cdot x_2 + 2,19 \cdot x_2^2 \quad [5.2]$$

Tabela 5.16 – ANOVA do modelo quadrático para predição de trealose (%) por *Rhodotorula dairenensis* obtido no primeiro DCCR.

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculado}	p-valor
Regressão	177,49	4	44,37	32,34	0,0003
Resíduos	8,23	6	1,37		
Total	185,72	10			

% variação explicada (R^2) = 95,57 $F_{4;6;0,05} = 4,53$

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

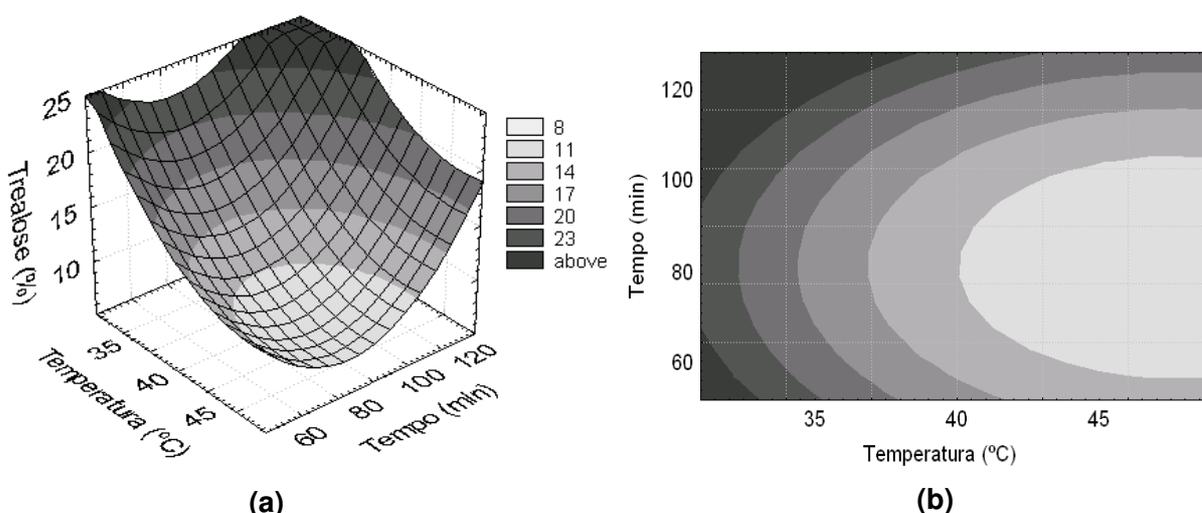


Figura 5.6 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a trealose (%) em função da temperatura (°C) e tempo de exposição (min) ao estresse térmico para *Rhodotorula dairenensis*, obtidas no primeiro DCCR.

Pode-se observar na Figura 5.6 que a temperatura apresentou efeito negativo sobre a resposta de trealose, indicando que o maior acúmulo ocorreu a menores temperaturas de estresse, dentro da faixa estudada, para a levedura em estudo. Por sua vez, o tempo de exposição ao estresse térmico apresentou efeito positivo sobre a produção de trealose.

O efeito negativo da temperatura contrariou os resultados observados na literatura, uma vez que diversos autores indicaram o aumento nos teores de trealose quando células de leveduras foram expostas a temperaturas superiores que a temperatura de cultivo (LIU et al., 2005; CARVALHEIRO et al., 1999; ARGÜELLES, 1997). Deve-se avaliar, no entanto, que para o ensaio oito obteve-se 19,53% de trealose, sendo que o mesmo foi realizado a 40°C durante 120 minutos, o que representa uma variação de 10°C em relação à temperatura de cultivo. Já no caso dos ensaios realizados a temperaturas

superiores (45 e 47°C), houve um decréscimo nos teores de trealose (ensaios 2, 4 e 6), provavelmente devido a injúrias e até mesmo a morte celular.

Liu et al. (2005), observaram comportamento semelhante ao avaliar o efeito da temperatura do estresse térmico sobre a resposta de trealose em células de *Candida krusei* em crescimento exponencial. Sob temperaturas de 40 a 45°C foram obtidos teores de trealose entre 3% e 8% (g/100g massa seca), respectivamente, sendo que para a temperatura de 50°C o conteúdo diminuiu para 6%. Os mesmos autores indicam que células diferentes podem apresentar respostas diferentes frente ao estresse térmico, refletindo suas características biológicas específicas e a versatilidade de adaptação.

Neste contexto, Diniz-Mendes et al. (1999) indicaram que durante o crescimento de leveduras de panificação a 28°C, em meio contendo glicose e extrato de levedura, as células acumularam quantidades significativas do dissacarídeo (11%). Entretanto, a aplicação de um tratamento térmico a 40°C não resultou no acréscimo da trealose intracelular, que permaneceu em níveis de 11-12%.

Torna-se importante comentar que na etapa de seleção obtiveram-se valores de ~30% de trealose intracelular para a levedura *Rhodotorula dairenensis* (codificada como AAQ₇ na etapa de seleção), sob condições de estresse térmico a 45°C durante 90 minutos. Em condições semelhantes, na etapa em estudo (otimização da produção), foram obtidos resultados inferiores (11,5% no ensaio 4 e 8,32% no ensaio 6). A explicação para esta mudança de comportamento, além dos fatores inerentes à variabilidade dos bioprocessos (idade das células, inóculo, lote de fermentação), pode ser consequência da diferença entre os meios de cultivo utilizados (meio sintético na etapa de seleção e meio industrial na etapa de otimização), os quais apresentam diferentes concentrações e disponibilidades de glicose. O melão é uma fonte de carbono abundante (~51% de ART para o lote utilizado), mas o carboidrato majoritário é a sacarose, de menor disponibilidade para o microrganismo, em comparação a glicose. Deve-se salientar, no entanto, que o resultado para o Meio Controle (9,1%) (Tabela 5.14), também foi inferior ao resultado obtido na etapa de seleção (~30%). Além disto, este valor (30%) é pontual se o compararmos com os valores obtidos no planejamento, para os quais todas as etapas do processo foram realizadas em triplicata (ensaio, extração e quantificação) e várias condições foram testadas, no que se refere a composição do meio e aos parâmetros temperatura e tempo de exposição ao estresse térmico. Ressalta-se, portanto, a importância do uso de ferramentas estatísticas tais como as utilizadas neste

trabalho para a obtenção de resultados confiáveis, em contraste a dados obtidos por ensaios pontuais, que podem apresentar baixa repetibilidade.

Outro fator importante é que, na fase de seleção, o tratamento térmico foi aplicado no início da fase estacionária, visto que não conhecíamos a cinética de crescimento das leveduras, enquanto que na etapa de produção (ensaios do DCCR), as células foram submetidas ao estresse térmico na fase exponencial, em 20 horas de cultivo; nesta etapa o comportamento da levedura no meio industrial já era conhecido, pois a otimização do crescimento celular da levedura já havia sido realizada.

De acordo com Liu et al. (2006), células em diferentes fases de crescimento e em meios com disponibilidade de glicose distintas respondem de maneira diferenciada à síntese da trealose. Na fase exponencial a trealose é sintetizada nas células somente se houver exposição a elevações de temperatura fora das faixas ótimas (DE VIRGILIO et al., 1994; PIPER, 1993), enquanto a síntese fisiológica da trealose ocorre na fase estacionária, quando há escassez de nutrientes (RIBEIRO et al., 1999). Para tentar verificar o efeito das fases de crescimento sobre o rendimento da trealose da *Rhodotorula dairenensis* foram realizados ensaios de estresse térmico nos tempos de 15, 20, 25 e 30 horas de fermentação, apresentados no item 5.2.3.2

O efeito positivo do tempo de exposição ao estresse térmico sobre a produção de trealose da levedura em estudo pode ser confirmado avaliando-se os resultados da Tabela 5.14. Pode-se verificar que para o ensaio definido como “Antes Estresse” (determinação da trealose de uma alíquota do meio de cultivo em 20h de fermentação) obteve-se 12% de trealose intracelular, semelhante aos resultados observados para os pontos centrais, condição em que se aplicou o estresse térmico durante 90 minutos a 40°C. Comparando este resultado com o resultado do ensaio 8 (19,53%), no qual a temperatura também foi de 40°C mas o tempo de exposição foi de 120 minutos, confirma-se o efeito positivo do tempo. Resultado semelhante foi obtido no ensaio 5 (19,69%) e no ensaio 3 (20,38%), quando as temperaturas e tempos de exposição foram de 33°C/90' e 35°C/111', respectivamente. Verifica-se, portanto, que embora o tempo de exposição tenha apresentado efeito significativo ($p \leq 0,05$), o efeito principal sobre a resposta é o da temperatura, obtendo-se maiores percentuais de trealose nas condições inferiores desta variável (35 - 40°C), dentro da faixa estudada (33 – 47°C).

Simultaneamente aos cultivos utilizados para a realização dos ensaios do DCCR (Tabela 5.14), os quais foram finalizados no tempo de 20h para a aplicação do estresse

térmico, um cultivo em triplicata foi realizado nas mesmas condições até a estabilização do crescimento celular da levedura *Rhodotorula dairenensis*, observada em aproximadamente 44h de cultivo. Na Figura 5.7 estão apresentados os resultados da cinética de crescimento celular, acúmulo de trealose, consumo de açúcares e variação do pH do cultivo.

Pode-se observar um acúmulo de 20% de trealose após 40h de cultivo, entretanto, após 20h o teor de trealose foi de 12% (antes do estresse). O valor obtido após 40h (20%) é similar ao valor observado no ensaio 3 do DCCR (Tabela 5.14), o qual foi realizado a 35°C e 111 minutos de tempo de exposição, após 20h de cultivo das células. Assim, a aplicação do estresse térmico na fase exponencial de crescimento celular mostrou-se interessante, uma vez que o resultado obtido nesse caso foi similar ao observado após 40h de cultivo (sem aplicação de estresse); houve uma economia de tempo de 20h e a temperatura no ensaio 3 do DCCR foi somente 5°C superior a temperatura normal de cultivo (30°C).

O crescimento celular observado no final da fermentação (aproximadamente 19 g/L) (Figura 5.7) encontra-se na faixa esperada para as condições otimizadas (50 g/L de melação e AMM) baseando-se no modelo preditivo obtido para a massa seca (seção 5.2.1).

Torna-se interessante observar que o acúmulo de trealose nas células apresentou uma cinética similar à de crescimento celular, diferenciando-se apenas quando o crescimento celular atingiu a fase estacionária (28h); nesta condição a concentração de trealose continuou aumentando, mesmo na presença de baixos níveis de açúcares. Este comportamento era esperado, visto que, de acordo com Biswas e Ghosh (1998) e Singer e Lindquist (1998), a biosíntese normal da trealose (ausência de condições de estresse) ocorre em maior proporção na fase estacionária de crescimento celular. Além disso, ainda de acordo com os autores citados, a atividade da trealase citossólica (trealases neutras) é alta em células sob crescimento exponencial em meio com alta concentração de açúcares fermentescíveis, o que explica o fato de a síntese de trealose ter continuado mesmo na presença de baixos níveis de açúcares.

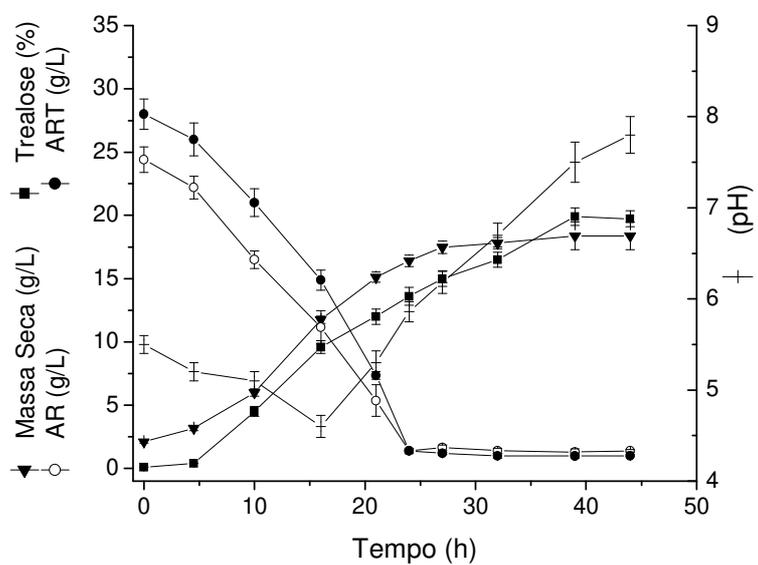


Figura 5.7 – Acompanhamento do acúmulo de trealose (■), crescimento celular (▼ massa seca), pH (+) e consumo de açúcares redutores (○ AR) e totais (● ART) para o cultivo de *Rhodotorula dairenensis* simultâneo ao cultivo utilizado nos ensaios do DCCR.

5.2.3.2 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE TREALOSE – *Rhodotorula dairenensis*

Baseando-se nos resultados obtidos com a realização do DCCR para otimização da produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis*, foram realizados ensaios de aplicação do estresse térmico em diferentes tempos de fermentação, a citar: 15, 20, 25 e 30 h. O cultivo foi realizado a 30°C até o momento da aplicação do estresse, em meio composto por 50 g/L de melaço e 50 g/L de água de maceração de milho. O tratamento térmico foi realizado nas temperaturas e tempos de exposição definidas no esquema da Figura 5.8.

Esta cinética foi realizada para confirmar os efeitos da temperatura e do tempo de exposição ao estresse térmico sobre o rendimento de trealose, e para verificar os efeitos desse estresse em fases de crescimento distintas. O tempo de exposição de zero minutos (0') corresponde a um tratamento controle, ou seja, sem aplicação de estresse térmico.

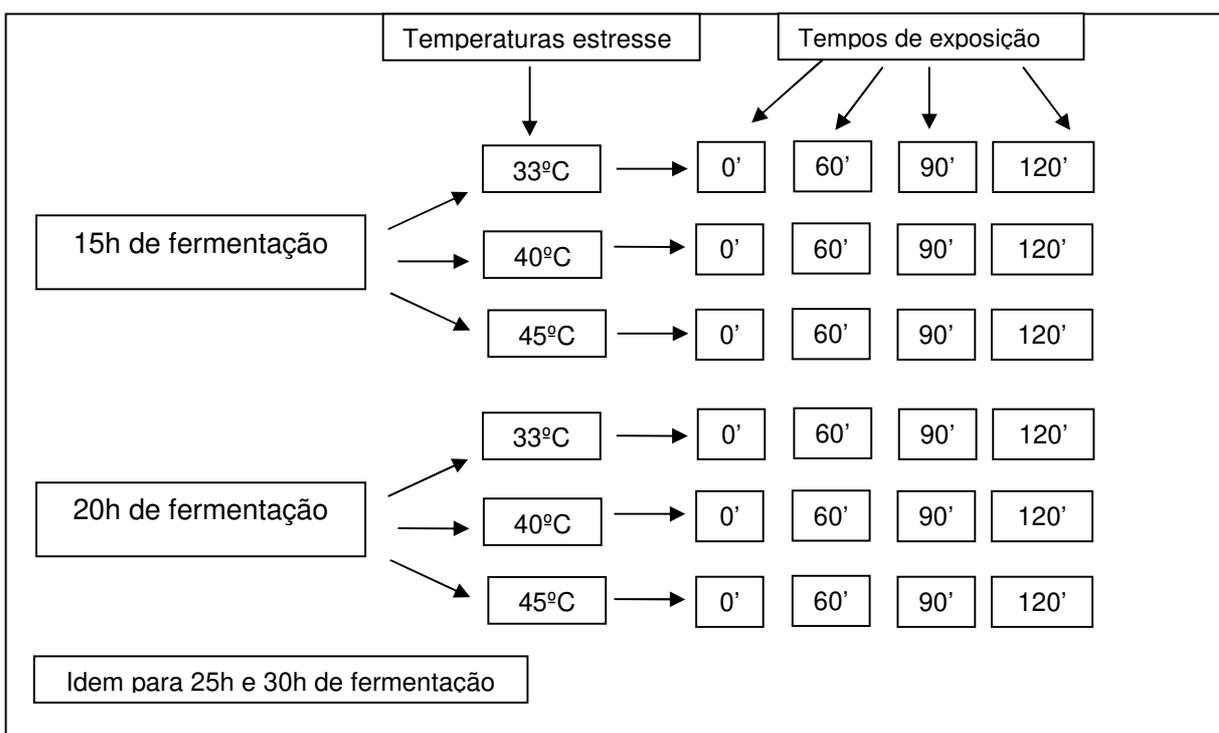


Figura 5.8 – Esquema dos ensaios realizados para a cinética de produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis*.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 5.17 a 5.20, para os tempos de 15, 20, 25 e 30 h de fermentação. Foi utilizado o teste de Tukey baseado na diferença entre médias para verificar a existência de diferença significativa entre os tempos e temperaturas de exposição ao estresse térmico, em cada tempo de fermentação.

Tabela 5.17 – Resultados obtidos para a aplicação do estresse térmico em 15 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Trealose (%) ^a	Erro Padrão ^b
33	0	12,63 a	0,28
33	60	12,10 a,d	0,13
33	90	12,52 a	0,28
33	120	13,04 a	0,21
40	0	12,77 a	0,03
40	60	11,25 b,d	0,51
40	90	10,43 b	0,24
40	120	10,94 b	0,22
45	0	12,42 a	0,29
45	60	10,91 b	0,59
45	90	10,86 b	0,64
45	120	7,97 c	0,40

^a Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,10$) pelo teste de Tukey; ^b Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 5.18 – Resultados obtidos para a aplicação do estresse térmico em 20 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Trealose (%) ^a	Erro Padrão ^b
33	0	14,18 a	0,41
33	60	13,38 a,c	0,07
33	90	13,14 a,c	0,61
33	120	13,44 a,c	0,36
40	0	13,82 a,b	0,73
40	60	12,95 b,c,e	0,15
40	90	12,94 b,c,e	0,76
40	120	11,46 d,g	0,23
45	0	13,62 a,c	0,26
45	60	11,85 e,g	0,42
45	90	8,40 f	0,31
45	120	7,12 h	0,16

^a Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,10$) pelo teste de Tukey; ^b Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 5.19 – Resultados obtidos para a aplicação do estresse térmico em 25 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Trealose (%) ^a	Erro Padrão ^b
33	0	13,50 a,b	0,40
33	60	13,52 a,b	0,92
33	90	13,80 a	0,65
33	120	13,18 a,b	0,26
40	0	13,44 a,b	0,41
40	60	12,40 b,c,g	0,20
40	90	11,66 c,d	0,20
40	120	10,82 d	0,28
45	0	13,01 a,g	0,54
45	60	9,57 e	0,24
45	90	7,22 f,h	0,50
45	120	6,24 h	0,12

^a Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,10$) pelo teste de Tukey; ^b Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 5.20 – Resultados obtidos para a aplicação do estresse térmico em 30 h de fermentação.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Trealose (%) ^a	Erro Padrão ^b
33	0	13,11 a,b,e	0,47
33	60	13,63 a,e	0,25
33	90	13,46 a,e	0,28
33	120	13,20 a,b,e	0,15
40	0	13,47 a,e	0,28
40	60	11,71 b,c	0,23
40	90	10,99 c,d	0,31
40	120	10,14 d,f	1,66
45	0	13,95 e	0,13
45	60	9,46 f	0,43
45	90	6,93 g	0,43
45	120	4,82 h	0,24

^a Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,10$) pelo teste de Tukey; ^b Os ensaios foram realizados em triplicata.

Pode-se verificar nas Tabelas 5.17 a 5.20 que os resultados de trealose intracelular obtidos foram inferiores aos alcançados no DCCR (seção 5.2.3.1). Convém ressaltar que, para a cinética, assim como para o DCCR, todas as etapas foram realizadas em triplicata, a citar os ensaios, a extração da trealose intracelular e a quantificação pelo método de Antrona. Não foi possível encontrar uma explicação para este fato, mas o atribuímos a possíveis diferenças nos lotes das fermentações e também a diferenças de idade das células utilizadas como inóculo.

Observou-se que, para os quatro tempos de fermentação estudados, sob temperatura de 33°C o tempo de exposição não apresentou influência sobre o rendimento em trealose, uma vez que as médias são estatisticamente semelhantes pelo teste de Tukey. No entanto, o aumento da temperatura paralelamente ao aumento do tempo de exposição não se mostrou como uma condição adequada, havendo a diminuição da concentração de trealose obtida. Para os quatro tempos de fermentação estudados, as médias obtidas para a combinação de 45°C/120' diferem significativamente em relação às demais (teste de Tukey). Assim, embora os resultados observados no DCCR não tenham sido alcançados nesta etapa, o efeito negativo da temperatura foi confirmado.

Este comportamento pode ser confirmado na Figura 5.9, na qual estão apresentadas as variações do teor de trealose em função da temperatura e do tempo de exposição ao estresse térmico para os tempos de 15, 20, 25 e 30 horas de fermentação.

Em relação ao efeito das fases de crescimento sobre a síntese da trealose, pode-se verificar nas Tabelas 5.17 a 5.20 que, para as temperaturas de 33 e 40°C, os resultados obtidos foram semelhantes, mesmo com o aumento de tempo de exposição. No entanto, o efeito negativo da temperatura foi superior para os tempos de fermentação de 25 e 30 horas, para os quais houve uma queda acentuada na produção de trealose na condição de 45°C, tal como pode ser observado nas Figuras 5.9 c e 5.9 d. Além disso, esta queda na produção foi acentuada pelo aumento do tempo de exposição, tal como demonstrado na Figura 5.10.

Este comportamento pode ser justificado pelo fato de que nos tempos de fermentação de 25 e 30 horas, as células da levedura encontravam-se no início da fase estacionária e na fase estacionária de crescimento, respectivamente, como demonstrado na Figura 5.11. Portanto, possíveis injúrias e até a morte celular podem ter ocorrido em maior proporção com a aplicação do estresse térmico a 45°C, causando a diminuição da trealose intracelular.

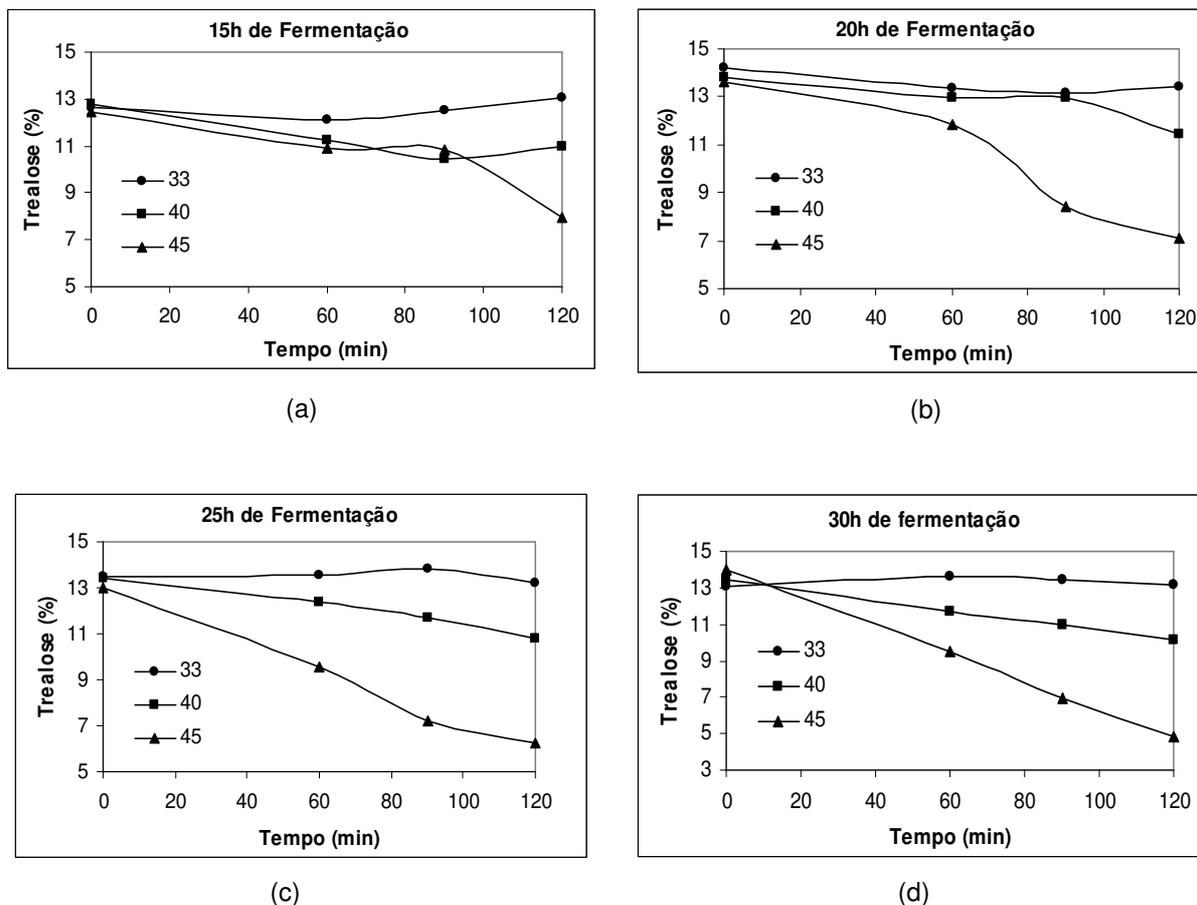


Figura 5.9 – Variação no teor de trealose (%) da levedura *Rhodotorula dairenensis* em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e do tempo de exposição ao estresse térmico (min) para os tempos de fermentação de: (a) 15 horas; (b) 20 horas; (c) 25 horas; (d) 30 horas.

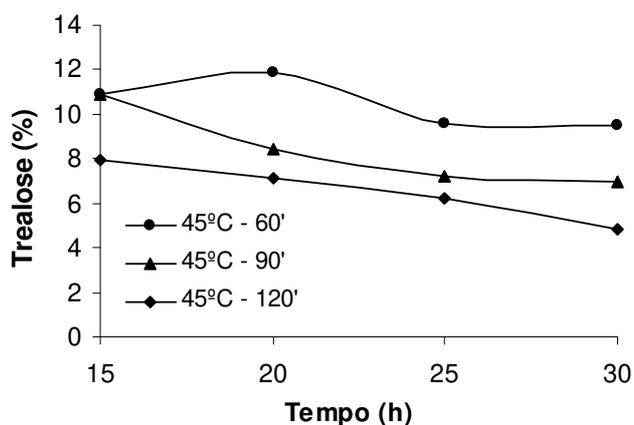


Figura 5.10 - Trealose (%) em função do tempo de fermentação (h) na condição de estresse térmico de 45°C e tempos de exposição de 60, 90 e 120 min para *Rhodotorula dairenensis*.

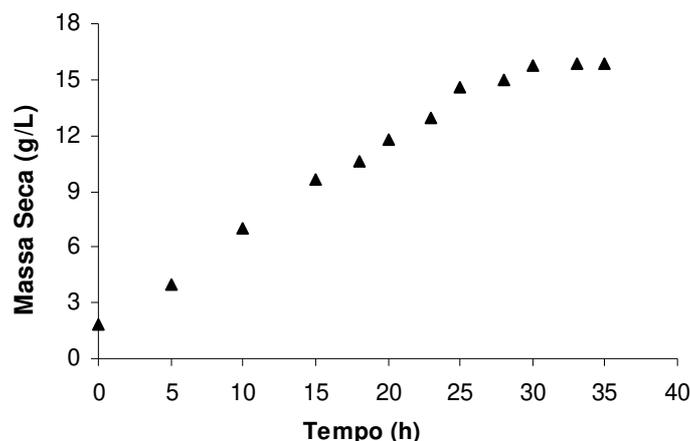


Figura 5.11 – Acompanhamento do crescimento celular (M.S) (g/L) em função do tempo(h) para o cultivo de *Rhodotorula dairenensis* utilizado nos ensaios da cinética. Condições do cultivo: 50 g/L de melação e de AMM, temperatura de 30°C, pH inicial 5,5.

5.2.3.3 SEGUNDO DCCR PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE – *Rhodotorula dairenensis*

Em função dos resultados obtidos com o primeiro DCCR e com a cinética apresentada no item anterior, foi realizado um segundo DCCR para a otimização da produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis*, com a redefinição das faixas de estudo das variáveis temperatura e tempo de exposição ao estresse térmico. O principal objetivo da realização de um novo planejamento experimental foi o de explorar de maneira mais abrangente a temperatura de 35°C, para a qual foram observados os melhores resultados no primeiro DCCR, ou seja, a temperatura apresentou efeito negativo dentro da faixa estudada, que foi de 33 a 47°C. Como a cinética (item anterior) foi realizada somente nas temperaturas de 33, 40 e 45°C, ficou a dúvida a respeito das temperaturas compreendidas entre 33 e 40°C. Assim, as faixas estudadas no segundo DCCR foram de 30,8 - 39,2°C para a temperatura, com ponto central em 35°C, e de 52 - 108 minutos para o tempo de exposição ao estresse térmico, tal como pode ser observado na Tabela 5.21, que representa a matriz dos ensaios com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas e respostas obtidas para a concentração de trealose intracelular.

Tabela 5.21 - Matriz do segundo DCCR realizado para otimização da produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis* com níveis reais e codificados das variáveis e respostas de trealose (%).

Ensaio	x_1^a	x_2^b	Trealose (%) ^c	Trealose predita ^d	Desvio relativo (%)
1	-1 (32)	-1 (60)	12,43 ± 0,32	13,49	-8,50
2	+1 (38)	-1 (60)	9,35 ± 0,21	10,27	-9,84
3	-1 (32)	+1 (100)	12,25 ± 0,21	12,75	-4,08
4	+1 (38)	+1 (100)	8,00 ± 0,14	9,53	-19,12
5	-1,41 (30,8)	0 (80)	12,45 ± 0,64	11,78	5,31
6	+1,41 (39,2)	0 (80)	8,55 ± 0,21	7,24	15,37
7	0 (35)	-1,41 (52)	15,00 ± 0,70	14,03	6,44
8	0 (35)	+1,41 (108)	14,00 ± 0,75	12,99	7,23
9	0 (35)	0 (80)	18,00 ± 0,28	17,67	1,83
10	0 (35)	0 (80)	17,70 ± 0,64	17,67	0,17
11	0 (35)	0 (80)	17,30 ± 0,52	17,67	-2,14
Antes Estresse	-	-	11,98 ± 0,38	-	-
Meio Controle	45	90	9,20 ± 0,85	-	-

^a = temperatura (°C); ^b = tempo de exposição (min).

^c ± erro padrão – os resultados representam a média de 3 determinações.

^d Valores de trealose preditos pelo modelo.

Os maiores teores de trealose, entre 17 e 18%, foram observados nos ensaios 9, 10 e 11, que correspondem aos pontos centrais do DCCR, os quais foram realizados sob temperatura de 35°C e 80 minutos de tempo de exposição. Pode-se verificar que não houve aumento nos rendimentos de trealose com a redefinição das faixas de estudo das variáveis, visto que no primeiro DCCR obtiveram-se resultados de aproximadamente 20% de trealose no ensaio realizado a 35°C durante 111 minutos; essa diferença pode ser atribuída aos lotes de fermentação. Entretanto, o segundo DCCR foi útil para confirmar que a melhor condição para a indução da síntese de trealose pela levedura *Rhodotorula dairenensis* é a temperatura de 35°C.

Realizando-se a análise estatística dos resultados obtiveram-se os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 5.22. A Equação 5.3 foi obtida considerando-se os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$), a qual representa o modelo quadrático da trealose em função das variáveis estudadas no segundo DCCR.

A ANOVA dos resultados obtidos está apresentada na Tabela 5.23, sendo o coeficiente de determinação igual a 0,93 e o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão 4,5 vezes maior que o valor de F_{tabelado} . Os desvios relativos (Tabela 5.21) também foram adequados, possibilitando a obtenção da superfície de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 5.12.

Tabela 5.22 - Coeficientes de regressão para a resposta de trealose intracelular (%) para *Rhodotorula dairenensis* obtidos no segundo DCCR.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p - valor
Média	17,67	0,76	23,36	<0,0000*
x ₁ (L)	-1,61	0,46	-3,47	0,0179*
x ₁ (Q)	-4,08	0,55	-7,40	0,0007*
x ₂ (L)	-0,36	0,46	-0,79	0,4624
x ₂ (Q)	-2,08	0,55	-3,77	0,0129*
x ₁ x x ₂	-0,29	0,66	-0,44	0,6747

*p≤0,05; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

$$\text{Trealose (\%)} = 17,67 - 1,61 \cdot x_1 - 4,08 \cdot x_1^2 - 0,36 \cdot x_2 - 2,08 \cdot x_2^2 \quad [5.3]$$

Tabela 5.23 – ANOVA do modelo quadrático para predição de trealose (%) por *Rhodotorula dairenensis* obtido no segundo DCCR.

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculado}	p-valor
Regressão	120,60	4	30,15	20,23	0,0012
Resíduos	8,92	6	1,49		
Total	129,52	10			

% variação explicada (R²) = 93,11 F_{4;6;0,05} = 4,53

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

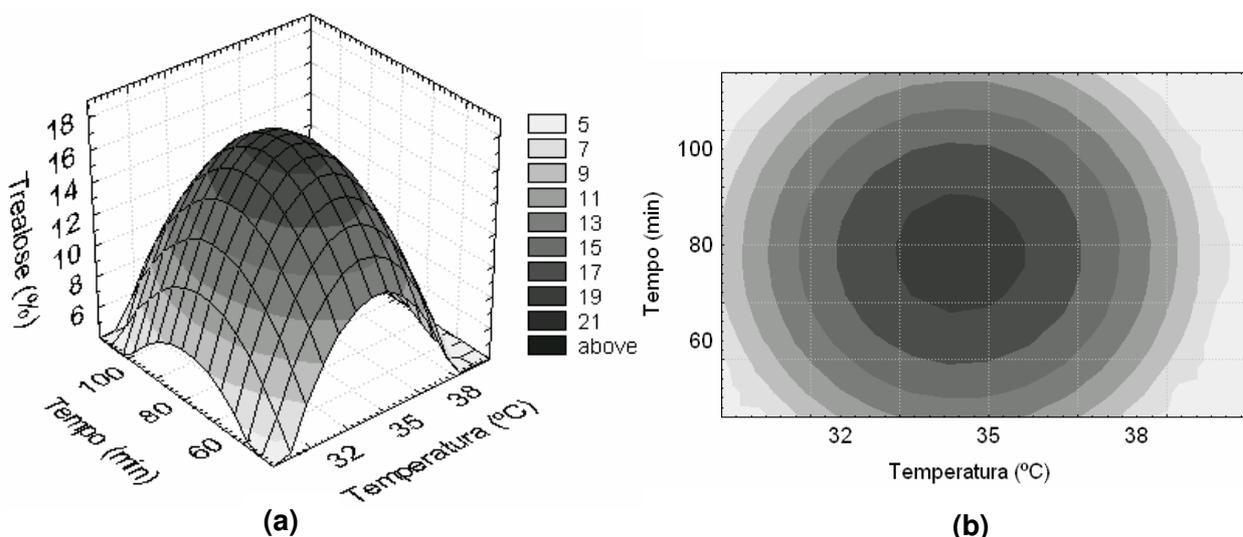


Figura 5.12 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a trealose (%) em função da temperatura (°C) e tempo de exposição (min) ao estresse térmico para *Rhodotorula dairenensis*, obtidas no segundo DCCR.

Pode-se observar na Figura 5.12 que a região ótima para o maior rendimento em trealose da levedura *Rhodotorula dairenensis* situa-se na faixa de 34 - 35°C, para a temperatura, e de 70 - 90 minutos para o tempo de exposição ao estresse térmico. Considerando que a temperatura ótima de crescimento celular, utilizada no cultivo da levedura em estudo, foi de 30°C, verifica-se que um acréscimo de apenas 4°C foi suficiente para induzir o aumento da concentração celular de trealose. Na Tabela 5.21 pode-se verificar que antes do estresse térmico foi detectado aproximadamente 12% de trealose e nos pontos centrais do DCCR obtiveram-se resultados de aproximadamente 18% de trealose intracelular, havendo, portanto, um acréscimo de 50% na resposta de trealose diante da aplicação do estresse térmico.

5.2.3.4 ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA – *Rhodotorula dairenensis*

Com as condições de crescimento celular otimizadas em frascos agitados, realizou-se o cultivo da levedura *Rhodotorula dairenensis* em fermentador de bancada, em sistema de batelada simples, para avaliar a cinética de produção de trealose.

Foram realizadas 3 fermentações, as quais foram conduzidas nas mesmas condições (triplicata), conforme definido no item “Material e Métodos”. A agitação de 400 rpm foi definida em função de testes preliminares realizados no fermentador de bancada. Foram realizadas duas fermentações mantendo-se a agitação em 200 e 300 rpm, para as quais foram obtidas concentrações de massa seca inferiores a 10 g/L e com comportamento decrescente durante o tempo de cultivo avaliado.

Nas Figuras 5.13 a 5.15 podem ser observados os resultados obtidos para as três fermentações.

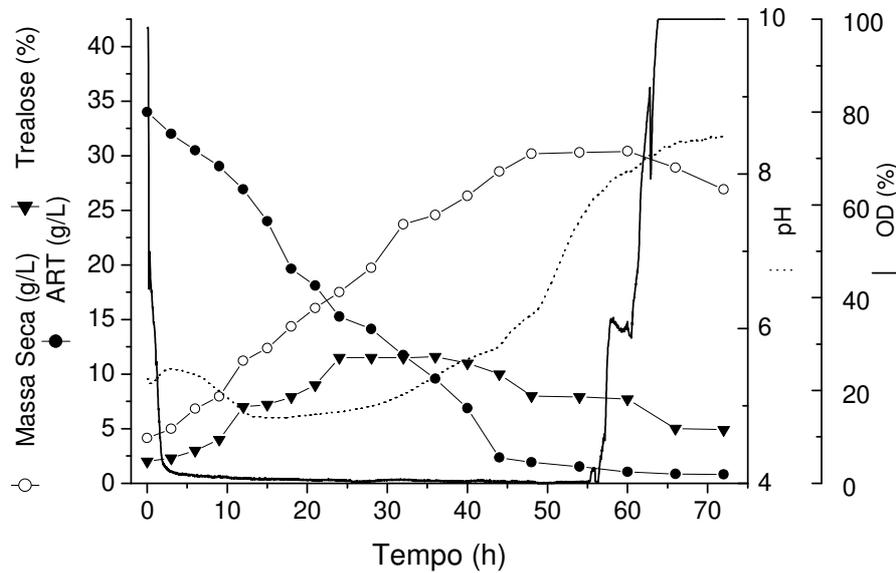


Figura 5.13 – Cinética da produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis* em fermentador de bancada, para a **Fermentação 1**. Condições: 30°C, 400 rpm, aeração de 1,0 vvm, 50 g/L de melão e 50 g/L de AMM.

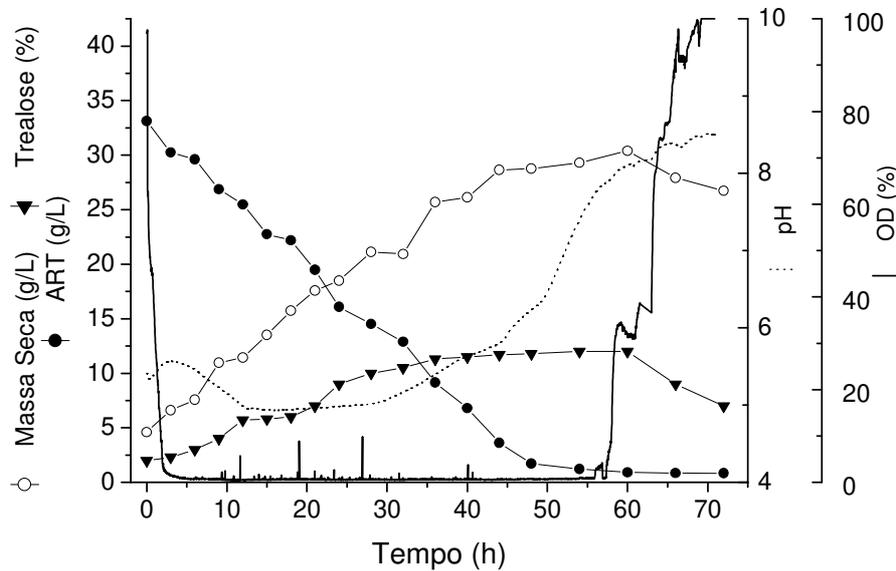


Figura 5.14 – Cinética da produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis* em fermentador de bancada, para a **Fermentação 2**. Condições: 30°C, 400 rpm, aeração de 1,0 vvm, 50 g/L de melão e 50 g/L de AMM.

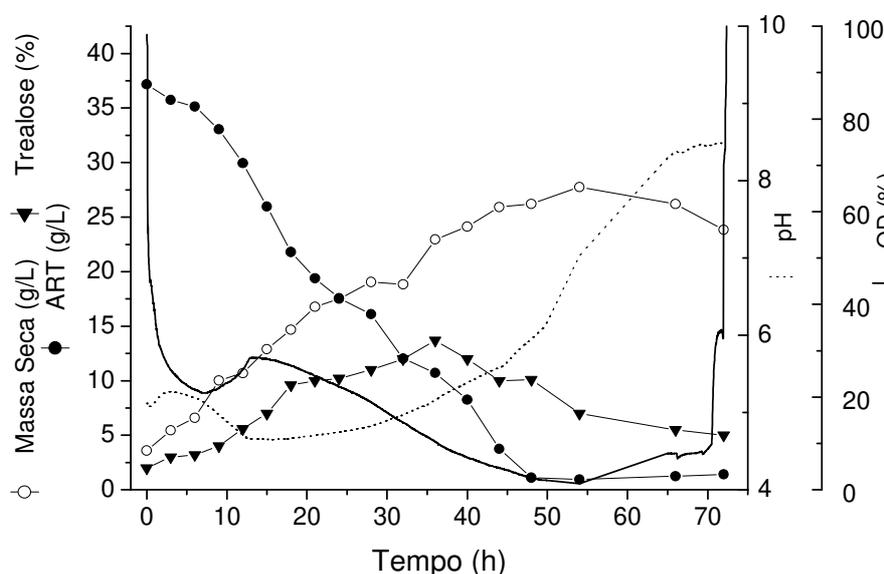


Figura 5.15 – Cinética da produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis* em fermentador de bancada, para a **Fermentação 3**. Condições: 30°C, 400 rpm, aeração de 1,0 vvm, 50 g/L de melação e 50 g/L de AMM.

Pode-se observar nas Figuras 5.13 a 5.15 que os comportamentos cinéticos para o consumo de açúcares redutores totais, massa seca e trealose foram semelhantes para as três fermentações realizadas. A concentração máxima de trealose obtida foi de aproximadamente 12% (g trealose/100g massa seca) após 35 horas de cultivo, diferindo dos resultados observados nos cultivos em frascos agitados, para os quais se observou um acúmulo de 20% de trealose após 40h de cultivo (Figura 5.7). Devem-se considerar as diferenças existentes entre os dois processos de cultivo, sendo que o suprimento de ar ao microrganismo pode modificar suas rotas metabólicas, favorecendo o crescimento celular e/ou a produção de metabólitos.

O meio de cultivo utilizado no fermentador de bancada foi otimizado para o cultivo em frascos agitados e, como o suprimento de ar causou uma aceleração no crescimento celular, em comparação ao crescimento observado em frascos agitados. O meio pode não ter suprido às necessidades da célula em tempos de cultivo superiores aos considerados no cultivo em frascos agitados. Na Figura 5.7 (cultivo em frascos agitados) observou-se que o acúmulo de trealose nas células apresentou uma cinética similar à de crescimento celular, e não foi observada a diminuição na síntese de trealose após determinado tempo

de cultivo, contrariamente ao que pode ser verificado nas Figuras 5.13 a 5.15. Deve-se considerar, no entanto, que o tempo de cultivo em frascos agitados foi inferior ao tempo de cultivo no fermentador de bancada (45 e 72 horas, respectivamente). Portanto, avaliando-se as cinéticas dos ensaios em fermentador de bancada, verifica-se que a diminuição da síntese de trealose ocorreu após 40 horas de cultivo. Em outras palavras, embora o rendimento em trealose tenha sido inferior em comparação ao observado em frascos agitados, considerando-se o mesmo tempo de cultivo, verifica-se uma similaridade no comportamento cinético das fermentações conduzidas em frascos agitados e em fermentador de bancada.

Uma explicação para a diminuição da concentração intracelular de trealose após 40 h de cultivo pode ser a utilização da mesma pelas células, para a manutenção das atividades metabólicas. De acordo com Singer e Lindquist (1998), durante prolongada incubação na fase estacionária, a trealose é metabolizada pela ação das trealases, após o esgotamento das reservas de glicogênio, como último mecanismo de nutrição celular (SINGER e LINDQUIST, 1998).

A concentração máxima de massa seca observada foi de aproximadamente 30 g/L, observando-se um decréscimo após 60 h de cultivo, provavelmente em função da elevação do pH, para o qual observa-se uma pequena elevação durante a fase de adaptação do microrganismo e, em seguida, uma diminuição até a faixa de 4,8 - 5,0, pela liberação de metabólitos ácidos. Após esse período, com a redução das fontes de carbono, o comportamento do pH inverte a tendência de queda atingindo valores entre 8,3 e 8,5 após 70h de cultivo. Entretanto, este comportamento do pH não explica as diferenças observadas no acúmulo de trealose das células, uma vez que em frascos agitados o comportamento deste parâmetro foi semelhante (Figura 5.7).

Em relação ao consumo de oxigênio, a partir da inoculação observa-se que os níveis de oxigênio dissolvido (OD) diminuem desde o nível de saturação até níveis baixos nas primeiras horas da fermentação, mantendo-se nesta condição até 60 h de cultivo. Posteriormente, verifica-se uma elevação brusca neste parâmetro, que coincide com a fase de declínio do crescimento celular, redução das fontes de carbono e acréscimo do pH do meio de cultivo.

Durante os cultivos em fermentador de bancada foram coletadas alíquotas do meio de cultivo para a aplicação do estresse térmico nas condições otimizadas definidas no item 5.2.3.3 (35°C durante 80 minutos), nos tempos de 12, 36 e 48 horas de cultivo.

Somente no tempo de 36h o estresse térmico resultou em acréscimo da concentração de trealose nas células. Antes do estresse térmico, os níveis de trealose encontravam-se em aproximadamente 12% e, após a aplicação do estresse, o nível médio detectado considerando-se as 3 fermentações realizadas foi de $16,1 \pm 1,4\%$. Os resultados apresentados no item 5.2.3.3 foram próximos a 18% de trealose, nas faixas ótimas de temperatura e tempo de exposição ao estresse térmico; entretanto, nesta etapa, o cultivo foi realizado em frascos agitados.

Quanto ao fato de que somente no tempo de 36 horas o estresse térmico resultou em acréscimo do teor de trealose, cabe ressaltar que, neste tempo, as células encontravam-se na fase exponencial plena de crescimento celular (Figuras 5.13 a 5.15), confirmando o comportamento descrito no item 5.2.3.2, no qual avaliou-se o efeito do estresse térmico em diferentes fases do crescimento da levedura *Rhodotorula dairenensis*, observando-se maiores acúmulos de trealose quando o estresse foi aplicado na fase exponencial.

5.3 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE PELA LEVEDURA *Rhodospordium paludigenum*

5.3.1 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR - LEVEDURA *Rhodospordium paludigenum*

5.3.1.1 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO

Para a otimização do crescimento celular da levedura *Rhodospordium paludigenum*, inicialmente também foi realizado um planejamento fracionário, onde foram estudadas as mesmas variáveis consideradas na otimização do crescimento celular da primeira levedura, a citar: concentrações de melaço, água de maceração de milho (AMM) e hidrolisado protéico *Prodex Lac®*, temperatura e pH. A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, respostas de massa seca e resultados obtidos para o Meio Controle, pode ser visualizada na Tabela 5.24.

A concentração de massa seca variou entre 3,34 a 7,82 g/L, nos ensaios 14 e 7, respectivamente. Pode-se verificar que os resultados dos ensaios 1 ao 8 foram superiores em comparação aos obtidos com o Meio Controle (Tabela 5.25), o que demonstra que o meio composto por melaço e água de maceração de milho também foi eficiente para suprir as necessidades de nutrientes das células da levedura *Rhodospordium paludigenum*.

Analisando-se os resultados da Tabela 5.24 foi possível o cálculo dos efeitos das cinco variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 5.25, na qual pode-se verificar que somente a variável *Prodex Lac®* não apresentou efeito significativo sobre a resposta de massa seca, na faixa estudada (2 - 6 g/L). Assim, definiu-se uma nova faixa de estudo desta variável, entre 0 a 2 g/L, para a realização do DCCR. O motivo foi o mesmo apresentado para a *Rhodotorula*, objetivando-se verificar a possibilidade de supressão deste componente do meio de cultivo.

A variável melaço apresentou efeito negativo sobre o crescimento celular, indicando que o maior crescimento celular ocorreu nas menores concentrações deste componente, dentro da faixa estudada (50 - 100 g/L); portanto, a faixa de estudo desta variável foi redefinida para 20 a 80 g/L, para a realização do DCCR.

Tabela 5.24 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} (valores reais e codificados) com as respostas de M.S (g/L) para a levedura *Rhodospiridium paludigenum*.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d	x_5^e	M.S (g/L) ^f
1	-1 (50)	-1 (30)	-1 (2)	-1 (25)	+1 (6)	7,31 ± 0,02
2	+1 (100)	-1 (30)	-1 (2)	-1 (25)	-1 (5)	5,91 ± 0,06
3	-1 (50)	+1 (70)	-1 (2)	-1 (25)	-1 (5)	7,08 ± 0,11
4	+1 (100)	+1 (70)	-1 (2)	-1 (25)	+1 (6)	7,47 ± 0,10
5	-1 (50)	-1 (30)	+1 (6)	-1 (25)	-1 (5)	6,83 ± 0,04
6	+1 (100)	-1 (30)	+1 (6)	-1 (25)	+1 (6)	6,40 ± 0,0
7	-1 (50)	+1 (70)	+1 (6)	-1 (25)	+1 (6)	7,82 ± 0,02
8	+1 (100)	+1 (70)	+1 (6)	-1 (25)	-1 (5)	6,25 ± 0,01
9	-1 (50)	-1 (30)	-1 (2)	+1 (35)	-1 (5)	4,01 ± 0,06
10	+1 (100)	-1 (30)	-1 (2)	+1 (35)	+1 (6)	3,66 ± 0,05
11	-1 (50)	+1 (70)	-1 (2)	+1 (35)	+1 (6)	4,71 ± 0,01
12	+1 (100)	+1 (70)	-1 (2)	+1 (35)	-1 (5)	4,32 ± 0,05
13	-1 (50)	-1 (30)	+1 (6)	+1 (35)	+1 (6)	4,17 ± 0,01
14	+1 (100)	-1 (30)	+1 (6)	+1 (35)	-1 (5)	3,34 ± 0,06
15	-1 (50)	+1 (70)	+1 (6)	+1 (35)	-1 (5)	4,58 ± 0,24
16	+1 (100)	+1 (70)	+1 (6)	+1 (35)	+1 (6)	4,85 ± 0,08
17	0 (75)	0 (50)	0 (4)	0 (30)	0 (5,5)	4,93 ± 0,04
18	0 (75)	0 (50)	0 (4)	0 (30)	0 (5,5)	4,91 ± 0,12
19	0 (75)	0 (50)	0 (4)	0 (30)	0 (5,5)	5,05 ± 0,09
Meio Controle ^g	-	-	-	-	-	5,50 ± 0,08
Meio Controle ^g	-	-	-	-	-	5,49 ± 0,13
Meio Controle ^g	-	-	-	-	-	5,76 ± 0,03

^a concentração de Melaço (g/L) - 51% de ART para o lote utilizado; ^b concentração de AMM (g/L) - 50% de nitrogênio total para o lote utilizado; ^c concentração de *Prodex Lac®* (g/L); ^d temperatura (°C); ^e pH; ^f ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações; ^g 30 g/L de glicose e 6,5 g/L de YNB.

Tabela 5.25 - Efeitos dos fatores estudados no planejamento fracionário 2^{5-1} sobre a concentração de M.S (g/L) da levedura *Rhodospiridium paludigenum*.

Fatores	Efeito ^a	Erro Padrão	t (13)	p - valor
Média	5,45	0,08	64,95	< 0,0001*
Melaço	-0,54	0,18	-2,95	0,0113*
A.M.M	0,68	0,18	3,72	0,0026*
<i>Prodex Lac®</i>	-0,03	0,18	-0,15	0,8833
T (°C)	-2,68	0,18	-14,65	< 0,0001*
pH	0,51	0,18	2,80	0,0154*

* $p \leq 0,05$.

^a Os efeitos são apresentados em g/L.

A concentração de AMM, por sua vez, apresentou efeito positivo sobre a resposta estudada, de modo que o maior crescimento celular ocorreu nas maiores concentrações deste componente, dentro da faixa de 30 - 70 g/L; assim, definiu-se uma faixa superior de concentração para o prosseguimento do estudo, de 40 a 100 g/L.

Devido ao efeito positivo do pH sobre a resposta de massa seca, esta variável foi fixada no valor intermediário da faixa estudada no planejamento fracionário, ou seja, em 5,5, para a realização do DCCR. O melhor pH para o crescimento da levedura seria 6,0, mas o efeito desta variável foi “baixo” em comparação a média dos efeitos (Tabela 5.25) e, além disso, o pH dos meios de cultivo foi mais facilmente ajustado em 5,5, em função do pH do melão e da AMM (5,9 e 4,1, respectivamente).

A temperatura, de maneira similar ao observado para a levedura *Rhodotorula dairenensis*, apresentou efeito negativo no crescimento celular, dentro da faixa estudada (25 a 35°C). Para a primeira levedura estudada a temperatura foi fixada em 30°C, justificando-se que esta seria uma condição operacionalmente mais interessante na prática industrial; no entanto, no caso da levedura em questão, observou-se que o efeito negativo da temperatura sobre a resposta estudada foi mais pronunciado em relação ao efeito apresentado para a primeira levedura, pela análise das tabelas de efeitos (Tabelas 5.9 e 5.25). Assim, para a levedura *Rhodospiridium paludigenum*, a temperatura foi fixada em 25°C para as próximas etapas de estudo de otimização do crescimento celular e da produção de trealose.

5.3.1.2 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para a concentração de massa seca da levedura *Rhodospiridium paludigenum* estão apresentadas na Tabela 5.26. Os tempos de cultivo para o alcance da fase estacionária de crescimento celular variaram entre 21 e 26 horas, dependendo da composição dos meios.

Pode-se observar na Tabela 5.26 que a massa seca variou de 15,53 a 26,62 g/L (ensaios 10 e 4, respectivamente). Os pontos centrais apresentaram pequena variação (erro padrão = $\pm 0,26$), indicando uma boa repetibilidade do processo. Assim como observado para a primeira levedura (*Rhodotorula dairenensis*), os resultados para a

massa seca obtida no cultivo em meio industrial foram superiores aos resultados obtidos com o Meio Controle.

Tabela 5.26 - Matriz do DCCR com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de M.S (g/L), valores preditos pelo modelo e desvios relativos, para a levedura *Rhodosporidium paludigenum*.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	M.S (g/L) ^d	M.S predita ^e	Desvio relativo (%) ^f
1	-1 (32)	-1 (52)	-1 (0,4)	17,43 ± 0,08	17,06	2,07
2	+1 (68)	-1 (52)	-1 (0,4)	21,71 ± 0,05	19,28	11,19
3	-1 (32)	+1 (88)	-1 (0,4)	21,01 ± 0,20	21,48	-2,21
4	+1 (68)	+1 (88)	-1 (0,4)	26,62 ± 0,04	23,69	11,01
5	-1 (32)	-1 (52)	+1 (1,6)	18,06 ± 0,34	17,06	5,49
6	+1 (68)	-1 (52)	+1 (1,6)	18,81 ± 0,16	19,28	-2,51
7	-1 (32)	+1 (88)	+1 (1,6)	19,77 ± 0,15	21,48	-8,66
8	+1 (68)	+1 (88)	+1 (1,6)	24,98 ± 0,14	23,69	5,17
9	-1,68 (20)	0 (70)	0 (1)	15,99 ± 0,27	14,85	7,11
10	+1,68 (80)	0 (70)	0 (1)	15,53 ± 0,21	18,57	-19,53
11	0 (50)	-1,68 (40)	0 (1)	17,59 ± 0,07	18,92	-7,53
12	0 (50)	+1,68 (100)	0 (1)	25,76 ± 0,25	26,34	-2,22
13	0 (50)	0 (70)	-1,68 (0)	17,02 ± 0,19	22,11	-29,86
14	0 (50)	0 (70)	+1,68 (2)	23,17 ± 0,01	22,11	4,59
15	0 (50)	0 (70)	0 (1)	22,63 ± 0,11	22,11	2,30
16	0 (50)	0 (70)	0 (1)	22,77 ± 0,59	22,11	2,92
17	0 (50)	0 (70)	0 (1)	23,00 ± 0,08	22,11	3,89
18	0 (50)	0 (70)	0 (1)	22,49 ± 0,18	22,11	1,69
Meio Controle ^g	-	-	-	10,52 ± 0,16	-	-
Meio Controle ^g	-	-	-	10,37 ± 0,03	-	-
Meio Controle ^g	-	-	-	10,42 ± 0,07	-	-

^a concentração de Melaço (g/L); ^b concentração de AMM (g/L); ^c concentração de *ProdexLac*® (g/L);

^d Massa Seca ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações.

^e Valores de M.S (g/L) preditos pelo modelo.

^f Desvio Relativo= $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo;

^g 30 g/L de glicose e 6,5 g/L de YNB.

Os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 5.27 foram obtidos através da análise estatística do DCCR (Tabela 5.26), os quais indicam que a variável *Prodex Lac*® não apresentou efeito significativo sobre a resposta de massa seca, ou seja, qualquer valor na faixa de 0 - 2 g/L conduziram a resultados semelhantes; assim, este componente foi suprimido do meio de cultivo para a etapa de estudo da produção de trealose.

Tabela 5.27 - Coeficientes de regressão para a resposta de M.S (g/L) da levedura *Rhodosporidium paludigenum*.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (8)	p - valor
Média	22,62	1,26	17,97	<0,0000*
x1 (L)	1,10	0,68	1,62	0,1437
x1 (Q)	-2,01	0,71	-2,83	0,0221*
x2 (L)	2,21	0,68	3,23	0,0120*
x2 (Q)	0,09	0,71	0,12	0,9069
x3 (L)	0,39	0,68	0,56	0,5941
x3 (Q)	-0,48	0,71	-0,67	0,5226
x1 x x2	0,72	0,89	0,81	0,4399
x1 x x3	-0,50	0,89	-0,55	0,5973
x2 x x3	-0,08	0,89	-0,09	0,9332

*p≤0,05; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

O modelo quadrático da massa seca em função das variáveis estudadas para a levedura *Rhodosporidium paludigenum* está representado pela Equação 5.4. Foram considerados os parâmetros lineares e quadráticos das variáveis melaço e AMM, para a obtenção do modelo. Os demais parâmetros foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 5.28.

Como o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo (p=0,0011) e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 = 73\%$), construiu-se a superfície de resposta representada pela Figura 5.16.

$$\text{M.S (g/L)} = 22,11 + 1,11.x_1 - 1,91.x_1^2 + 2,21.x_2 + 0,18.x_2^2 \quad [5.4]$$

Tabela 5.28 - ANOVA do modelo quadrático para predição da M.S (g/L) de *Rhodosporidium paludigenum*.

Fonte de Variação	SQ^a	GL^b	QM^c	F_{calculado}	p-valor
Regressão	135,01	4	33,75	7,10	0,0012
Resíduos	61,84	13	4,76		
Total	196,85	17			

% variação explicada (R^2) = 70 $F_{4;13;0,05} = 3,18$

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

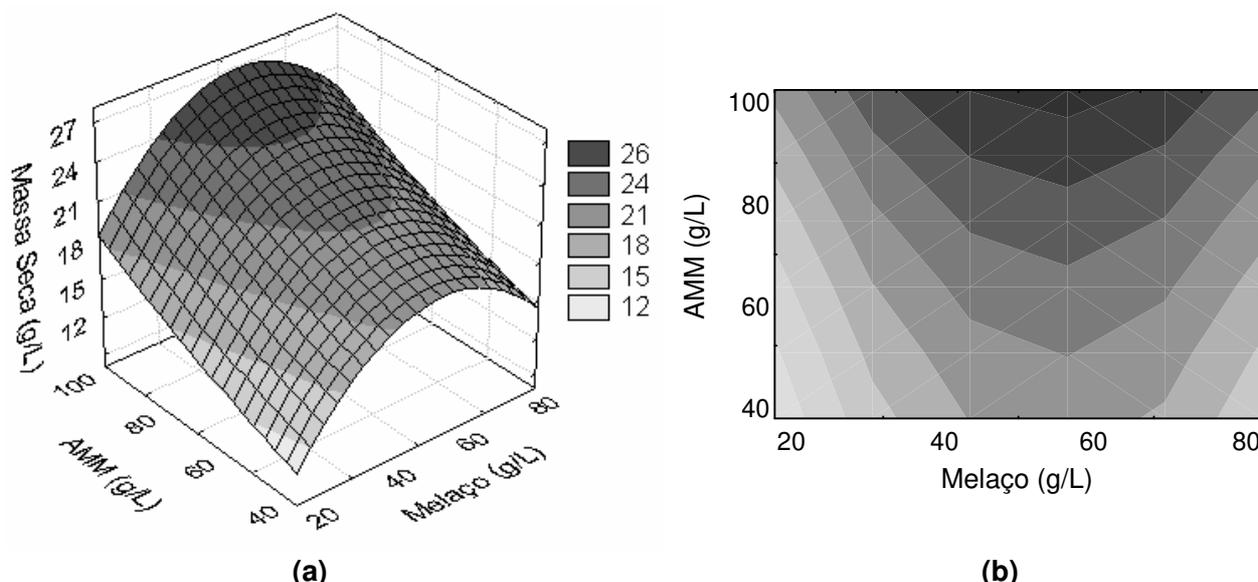


Figura 5.16 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para Massa Seca (g/L) em função das concentrações de melão e AMM, para a levedura *Rhodospordium paludigenum*.

Analisando-se a superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 5.16), pode-se observar que os maiores resultados para a massa seca foram obtidos na concentração de melão equivalente a 50 g/L. Para a água de maceração de milho, observa-se que há uma tendência de acréscimo da resposta de massa seca com o aumento da concentração desta variável, não se atingindo a condição otimizada dentro da faixa estudada (40 - 100 g/L).

Por este motivo foram realizados 9 ensaios em triplicata (totalizando 21 ensaios) variando a concentração de AMM de 100 a 220 g/L e mantendo-se as demais condições fixas, a citar: concentração de melão em 50 g/L, pH 5,5, temperatura em 25°C, supressão do *Prodex Lac®* do meio de cultivo. Foi utilizado o teste de Tukey baseado na diferença ente médias para verificar a existência de diferença significativa entre as novas condições estudadas. Os resultados de massa seca para os ensaios, médias e erro padrão, estão apresentados na Tabela 5.29.

Pode-se verificar que os ensaios realizados com as concentrações de AMM de 140 a 220 g/L são estatisticamente semelhantes entre si ($p \geq 0,1$) pelo teste de Tukey, com respostas de massa seca variando entre 30 - 32 g/L, aproximadamente. O meio de cultivo com 140 g/L de AMM apresentou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,1$) somente em relação aos ensaios com 100 e 120 g/L de AMM, com resposta de massa seca de

aproximadamente 30 g/L. Portanto, a condição de 140 g/L foi definida como a melhor condição dentre os ensaios realizados, visando o crescimento celular da levedura *Rhodosporidium paludigenum*.

Tabela 5.29 - Ensaios para definição da concentração de AMM no cultivo de *Rhodosporidium paludigenum* com os resultados de M.S. (g/L).

Ensaios	M.S. (g/L)	Média**	Erro Padrão
1 α (100)*	26,37		
1 β (100)*	26,09	26,15 ^a	0,20
1 γ (100)*	25,99		
2 α (120)*	27,40		
2 β (120)*	27,60	27,43 ^{a,c}	0,15
2 γ (120)*	27,30		
3 α (140)*	29,92		
3 β (140)*	30,00	30,07 ^b	0,19
3 γ (140)*	30,29		
4 α (160)*	30,68		
4 β (160)*	29,00	29,69 ^{b,c}	0,88
4 γ (160)*	29,40		
5 α (180)*	32,45		
5 β (180)*	32,21	32,03 ^b	0,52
5 γ (180)*	31,45		
6 α (190)*	31,12		
6 β (190)*	32,30	31,64 ^b	0,60
6 γ (190)*	31,50		
7 α (200)*	31,00		
7 β (200)*	33,60	31,98 ^b	1,41
7 γ (200)*	31,34		
8 α (210)*	30,69		
8 β (210)*	32,00	32,08 ^b	1,43
8 γ (210)*	33,55		
9 α (220)*	32,96		
9 β (220)*	31,85	31,99 ^b	0,91
9 γ (220)*	31,15		

α , β , γ : triplicatas; * concentração de AMM.

** Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,1$) pelo teste de Tukey.

Na Figura 5.17 pode-se visualizar a evolução do crescimento celular da levedura *Rhodospiridium paludigenum* em função das concentrações de AMM estudadas.

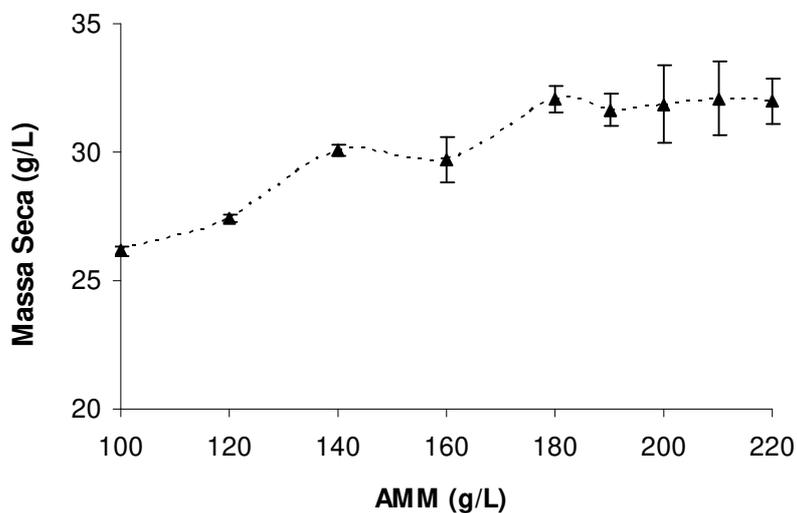


Figura 5.17 – Acompanhamento da Massa Seca (g/L) da levedura *Rhodospiridium paludigenum* em função da concentração de AMM. As barras de erro indicam o erro padrão de triplicatas.

Comparando-se as respostas de massa seca obtidas no ensaio 1 da Tabela 5.29, o qual foi realizado com 100 g/L de AMM e 50 g/L de melaço, com a resposta do ensaio 12 do DCCR (Tabela 5.26), o qual foi realizado nas mesmas condições, verifica-se que as mesmas são semelhantes, obtendo-se médias de 26,15 e 25,76 g/L de massa seca, respectivamente. Portanto, pode-se dizer que o processo apresenta boa repetibilidade e confirma-se a validade do modelo e superfície de resposta obtida.

Pode-se observar que houve um acréscimo no crescimento celular (massa seca), de aproximadamente 26 g/L para 30 g/L (aproximadamente 15%), com o aumento da concentração de AMM de 100 g/L para 140 g/L.

Assim como para a levedura *Rhodotorula dairenensis*, para a levedura *Rhodospiridium paludigenum* também não foram encontrados dados de crescimento celular na literatura científica.

5.3.2 DEFINIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE TREALOSE POR *Rhodospiridium paludigenum*

Para a definição do meio de cultivo a ser utilizado na etapa de produção de trealose pela levedura *Rhodospiridium paludigenum* foram realizados ensaios para confirmar se a melhor condição para o crescimento celular corresponderia a melhor condição para a produção da trealose, seguindo o mesmo procedimento demonstrado para a levedura *Rhodotorula dairenensis* na seção 5.2.2

Os ensaios realizados foram correspondentes aos ensaios 1, 4, 12 e ponto central do DCCR utilizado para a otimização do crescimento celular (Tabela 5.26) e também o ensaio com as condições ótimas para o crescimento celular, definidas em 50 g/L de melaço e 140 g/L de AMM.

O ensaio 1 do DCCR foi escolhido por representar a condição de combinação de menores concentrações de substrato (32 g/L de melaço e 52 g/L de AMM); os ensaios 4, 12 e central do DCCR foram realizados por terem resultado nas maiores concentrações de massa seca dentre os ensaios do DCCR. O ensaio com o meio equivalente ao ponto central foi realizado com e sem a adição de *Prodex Lac®* para confirmar a possibilidade de suprimir este componente do meio de cultivo na etapa de produção da trealose, uma vez que para o crescimento celular este componente não exerceu efeito significativo.

No final da fase exponencial de crescimento celular, a qual foi atingida em tempos distintos para cada ensaio, realizou-se a transferência dos cultivos para a temperatura de 40°C durante 90', para a indução da síntese da trealose. Os resultados obtidos para a massa seca no tempo de aplicação do estresse térmico e correspondente percentual de trealose, estão demonstrados na Tabela 5.30, na qual se verifica que o maior rendimento de trealose foi obtido nas condições otimizadas para o crescimento celular, no ensaio definido como "meio ótimo de crescimento".

Com as condições de cultivo definidas (50 g/L de melaço e 140 g/L de AMM, temperatura de 25°C e pH inicial de 5,5) realizou-se o acompanhamento do crescimento celular da levedura *Rhodospiridium paludigenum* em um cultivo em triplicata, para a definição do tempo no qual seria aplicado o estresse térmico para o estudo da produção de trealose.

Pode-se verificar na Figura 5.18 que a fase exponencial ocorreu entre 10 e 35 h de cultivo, aproximadamente. Definiu-se, portanto, que a aplicação do estresse térmico às células de *Rhodospiridium paludigenum*, na etapa de estudo da produção de trealose, seria realizada no tempo de cultivo de 24 h, na fase exponencial plena de crescimento celular.

De maneira similar ao observado para a primeira levedura estudada, a concentração de açúcares redutores totais (ART) no início da fermentação, de aproximadamente 30 g/L (Figura 5.18), foi condizente com o esperado, uma vez que o lote de melaço utilizado na etapa de estudo da levedura *Rhodospiridium paludigenum* também continha 51% de ART e a concentração deste componente no meio de cultivo foi de 50 g/L.

A concentração de açúcares redutores, quantificados como glicose, apresentou-se em um nível baixo no início do processo (7,5 g/L), aumentando progressivamente até 15h de cultivo, tempo este no qual se igualou à concentração de ART; este comportamento caracteriza um processo de hidrólise de açúcares (como, por exemplo, sacarose e frutose) resultando em glicose no meio de cultivo. Em seguida, a concentração de açúcares redutores reduziu rapidamente, coincidindo com a fase exponencial de crescimento celular e conseqüente consumo máximo de nutrientes.

Em relação ao pH do meio de cultivo, observa-se na Figura 5.18 uma leve diminuição após 20h de cultivo, devido à produção de metabólitos ácidos durante a fase exponencial plena de crescimento celular. Após 30h observa-se um acréscimo no pH, coincidindo com o início da fase estacionária, havendo uma estabilização em aproximadamente 7,0 após 44h de cultivo.

Tabela 5.30 – Resultados de M.S (g/L) e trealose (%) dos ensaios realizados para definição do meio de cultivo para produção de trealose por *Rhodospiridium paludigenum*.

Ensaio	Melaço (g/L)	AMM (g/L)	Prodex Lac® (g/L)	M.S (g/L) ^a	Trealose (%) ^b
1	32	52	0,4	15,50 ± 0,07	8,70 ± 0,05
4	68	88	0,4	23,70 ± 0,06	9,80 ± 0,07
12	50	100	1,0	23,20 ± 0,05	9,85 ± 0,09
Central – com Prodex Lac®	50	70	1,0	19,50 ± 0,11	9,60 ± 0,11
Central – sem Prodex Lac®	50	70	0,0	19,62 ± 0,09	9,10 ± 0,06
Meio ótimo de crescimento	50	140	0,0	27,11 ± 0,08	11,80 ± 0,07

^a Massa Seca ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações.

^b Trealose ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações.

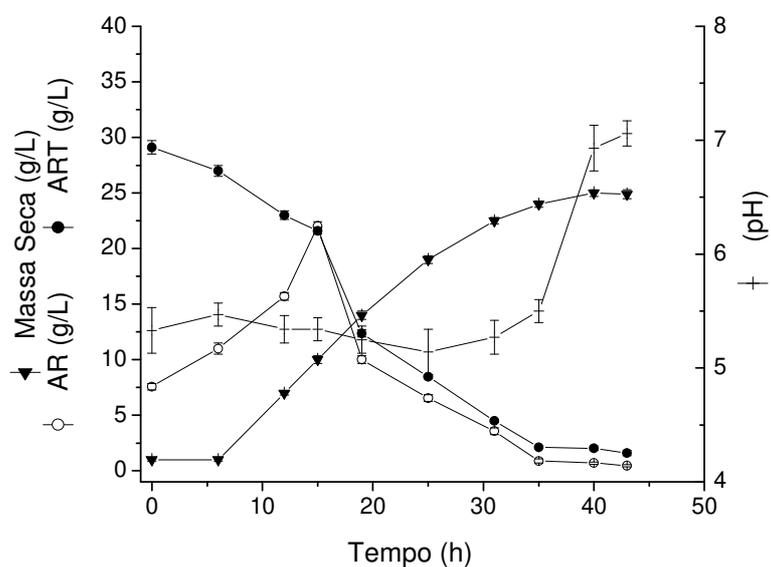


Figura 5.18 - Acompanhamento do crescimento celular (▼ massa seca), pH (+) e consumo de açúcares redutores (○ AR) e totais (● ART) para o cultivo de *Rhodosporidium paludigenum* em meio com 50 g/L de melaço e 140 g/L de AMM, a 25°C.

5.3.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TREALOSE POR *Rhodospiridium paludigenum* EM FRASCOS AGITADOS

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas no DCCR realizado para a otimização da produção de trealose pela levedura *Rhodospiridium paludigenum*, bem como as respostas obtidas para a concentração de trealose intracelular estão apresentadas na Tabela 5.31. Utilizou-se o meio de cultivo e condições definidas na etapa de otimização do crescimento celular (pH 5,5, cultivo a 25°C, 50 g/L de melaço e 140 g/L de AMM), realizando-se o estresse térmico de acordo com as condições de cada ensaio do planejamento, na fase exponencial de crescimento (24h de fermentação).

Tabela 5.31 - Matriz do DCCR realizado para otimização da produção de trealose por *Rhodospiridium paludigenum* com níveis reais e codificados das variáveis e respostas de trealose (%).

Ensaio	x_1^a	x_2^b	Trealose (%) *	Trealose predita**	Desvio relativo (%)
1	-1 (35)	-1 (69)	12,20 ± 0,57	12,52	-2,65
2	+1 (45)	-1 (69)	8,55 ± 0,38	8,78	-2,68
3	-1 (35)	+1 (111)	13,75 ± 0,65	13,66	0,66
4	+1 (45)	+1 (111)	11,90 ± 0,30	9,92	16,68
5	-1,41 (33)	0 (90)	12,90 ± 0,99	12,58	2,50
6	+1,41 (47)	0 (90)	6,20 ± 0,57	7,28	-17,49
7	0 (40)	-1,41 (60)	12,25 ± 0,25	11,70	4,46
8	0 (40)	+1,41 (120)	12,00 ± 0,21	13,31	-10,91
9	0 (40)	0 (90)	10,05 ± 0,35	10,36	-3,09
10	0 (40)	0 (90)	10,53 ± 0,29	10,36	1,64
11	0 (40)	0 (90)	10,50 ± 0,01	10,36	1,32
Antes Estresse	-	-	11,70 ± 0,43	-	-
Meio Controle	45	90	8,10 ± 0,92	-	-

^a = temperatura (°C); ^b = tempo de exposição (min).

* ± erro padrão – os resultados representam a média de 3 determinações.

** Valores de Trealose preditos pelo modelo.

A análise estatística dos resultados permitiu a obtenção dos coeficientes de regressão, apresentados na Tabela 5.32. Como o termo linear da variável temperatura foi significativo, e o termo quadrático da variável tempo foi significativo a 90%, foram considerados os quatro parâmetros para a obtenção da Equação 5.5, que representa o

modelo quadrático da trealose em função da temperatura e do tempo de exposição ao estresse térmico, para a levedura *Rhodosporidium paludigenum*.

A ANOVA está apresentada na Tabela 5.33, sendo o coeficiente de determinação igual a 0,84 e o valor de $F_{\text{calculado}}$ maior que o valor de F_{tabelado} . Os desvios relativos (Tabela 5.31) também foram adequados, sendo possível construir a superfície de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 5.19.

Tabela 5.32 - Coeficientes de regressão para a resposta de trealose intracelular (%) para *Rhodosporidium paludigenum*.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p - valor
Média	10,36	0,67	15,46	<0,0000*
x ₁ (L)	-1,87	0,41	-4,56	0,0060*
x ₁ (Q)	-0,22	0,49	-0,44	0,6783
x ₂ (L)	0,57	0,41	1,39	0,2246
x ₂ (Q)	1,07	0,49	2,20	0,0794**
x ₁ X x ₂	0,45	0,58	0,78	0,4731

*p≤0,05; ** p≤0,10; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

$$\text{Trealose (\%)} = 10,36 - 1,87 \cdot x_1 - 0,22 \cdot x_1^2 + 0,57 \cdot x_2 + 1,07 \cdot x_2^2 \quad [5.5]$$

Tabela 5.33 - ANOVA do modelo quadrático para predição de trealose (%) por *Rhodosporidium paludigenum*.

Fonte de Variação	SQ^a	GL^b	QM^c	F_{calculado}	p-valor
Regressão	38,85	4	9,71	7,73	0,0151
Resíduos	7,54	6	1,26		
Total	46,40	10			

% variação explicada (R^2) = 83,74 $F_{4;6;0,05} = 4,53$

SQ^a = soma de quadrados; GL^b = graus de liberdade; QM^c = quadrados médios.

Os resultados variaram entre 6,20 e 13,75% de trealose, nos ensaios 3 e 6 (Tabela 5.31), realizados em temperaturas de 47 e 35°C, respectivamente. Pode-se verificar, portanto, que de maneira semelhante ao comportamento observado para a primeira levedura estudada, a temperatura apresentou efeito negativo dentro da faixa estudada, sobre a produção de trealose da levedura *Rhodosporidium paludigenum*. A superfície de resposta (Figura 5.19) confirma esta observação, na qual também é possível verificar que

o tempo de exposição ao estresse térmico não apresentou influência significativa sobre a resposta, na faixa de 60 - 120 minutos.

As maiores respostas de trealose foram observadas na faixa de temperatura entre 33 - 35°C. Os ensaios realizados em temperaturas de 45 e 47°C apresentaram respostas inferiores, provavelmente devido a injúrias e morte das células, levando à perda da trealose intracelular para o meio de cultivo.

A temperatura normal de cultivo utilizada para a levedura *Rhodospodium paludigenum* foi de 25°C, definida na etapa de otimização do crescimento celular; considerando o resultado obtido para a quantificação de trealose realizada antes do estresse (Tabela 5.31) pode-se observar que houve uma variação de apenas 2% no percentual de trealose com a aplicação do estresse térmico (11,7% antes do estresse para 13,7% no ensaio 4). Isto pode ser um indicativo de que esta levedura é menos sensível à variação de temperatura em comparação a primeira levedura estudada. Uma variação de 7°C resultou em um aumento de apenas 2% no teor de trealose, enquanto que para a *Rhodotorula dairenensis*, um pequeno acréscimo de temperatura (3-5°C) resultou em um aumento de 6% em comparação a análise antes do estresse, como pode ser visto no segundo DCCR para otimização da produção de trealose desta levedura (seção 5.2.3.3)

Novamente, de maneira análoga ao observado para a primeira levedura estudada, os resultados obtidos na etapa de estudo da produção de trealose no meio de cultivo otimizado para o crescimento celular foram inferiores aos observados na etapa de seleção das leveduras, na qual foram obtidos valores de aproximadamente 26% de trealose intracelular para a levedura *Rhodospodium paludigenum* (codificada como AAG₁₂ na etapa de seleção). Mais uma vez atribuiu-se esta mudança de comportamento a variabilidade inerente aos bioprocessos e, principalmente, à diferença entre os meios de cultivo utilizados (glicose e YNB na etapa de seleção, melão e água de maceração de milho na etapa de otimização), os quais apresentam diferentes concentrações e disponibilidades de glicose. De acordo com Hahn-Hägerdal et al. (2005), a composição do meio de cultivo e condições de temperatura, pH e aeração refletem diretamente na concentração de trealose intracelular da biomassa de leveduras.

Um cultivo em triplicata foi realizado simultaneamente aos cultivos utilizados para a realização dos ensaios do DCCR (Tabela 5.31) até a estabilização do crescimento celular da levedura *Rhodospodium paludigenum*, visto que para o DCCR os cultivos foram

finalizados no tempo de 24h, para a aplicação do estresse térmico. Na Figura 5.20 estão apresentados os resultados da cinética de crescimento celular, acúmulo de trealose, consumo de açúcares e variação do pH do cultivo.

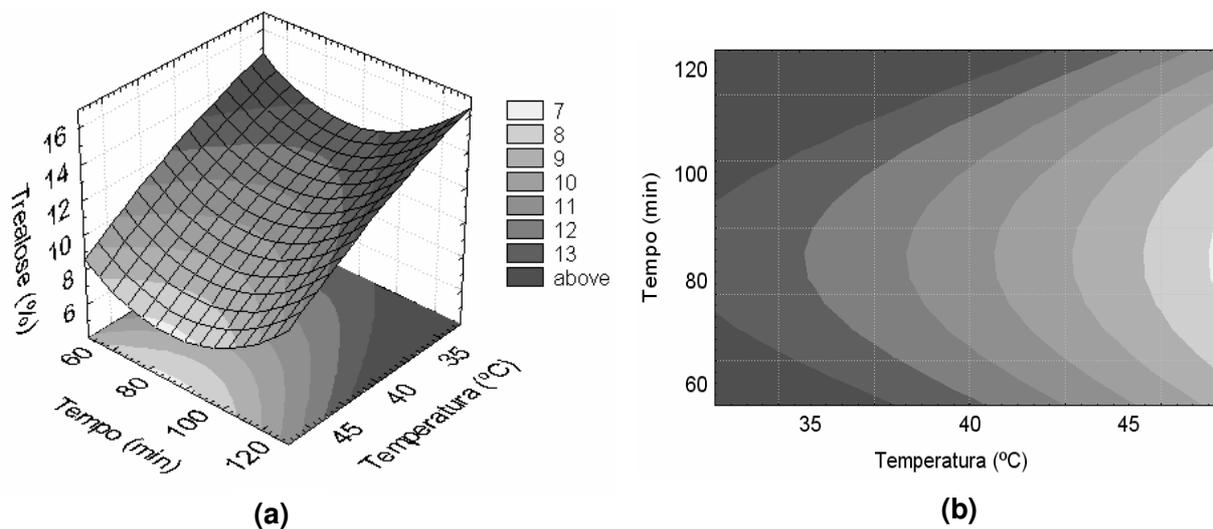


Figura 5.19 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a trealose (%) em função da temperatura (°C) e tempo de exposição (min) ao estresse térmico para *Rhodospiridium paludigenum*.

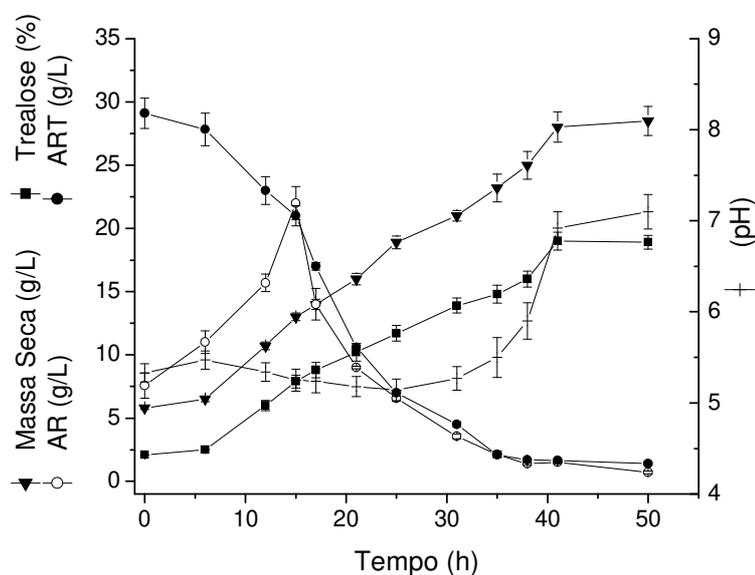


Figura 5.20 – Acompanhamento do acúmulo de trealose (■), crescimento celular (▼ massa seca), pH (+) e consumo de açúcares redutores (○ AR) e totais (● ART) para o cultivo de *Rhodospiridium paludigenum* simultâneo ao cultivo utilizado nos ensaios do DCCR.

Pode-se verificar que a estabilização do crescimento celular ocorreu em aproximadamente 40h de cultivo e que, neste tempo, houve um acúmulo de aproximadamente 18% de trealose (Figura 5.20). No tempo de 24h, no qual foram realizados os ensaios do DCCR, o teor de trealose observado foi de 11,7% (antes do estresse) e, após 40h de cultivo, foi de aproximadamente 18%. A maior resposta dos ensaios do DCCR foi a do ensaio 3, de 13,75%, sob condições de 35°C e 111 minutos de tempo de exposição ao estresse térmico. Portanto, observa-se que, embora o teor de trealose obtido nos tempos finais de cultivo (18%) não tenha sido alcançado nos ensaios do DCCR, há uma diferença de tempo de 16h entre as duas condições, o que indica que a aplicação do estresse térmico na fase exponencial de crescimento celular mostrou-se interessante para a indução da produção de trealose.

O crescimento celular observado no final da fermentação, o qual foi de aproximadamente 29 g/L (Figura 5.20) encontra-se na faixa esperada para as condições otimizadas do meio de cultivo (50 g/L de melaço e 140 g/L de AMM).

O comportamento de consumo de açúcares redutores foi semelhante ao observado por Chi et al. (2003), os quais avaliaram a conversão de amido em trealose por um mutante de *Saccharomycopsis fibuligera*. No início do cultivo o teor de açúcares redutores foi de 7,5 g/L, havendo acréscimo até 22 g/L em 15h de cultivo (provavelmente por hidrólise de dissacarídeos), seguido de um rápido consumo, paralelo ao acréscimo do teor de trealose nas células.

Chi et al. (2003) indicam que é importante manter o nível de açúcares redutores baixo no meio de cultivo para um acúmulo efetivo de trealose nas células de leveduras, uma vez que altas concentrações de açúcares redutores podem induzir a ativação das trealases neutras, responsáveis pela hidrólise da trealose nas células. Em nosso estudo não foi realizado o controle do nível de açúcares redutores presentes, realizando-se somente o monitoramento deste parâmetro.

5.3.3.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE TREALOSE – *Rhodosporidium paludigenum*

Em função do efeito negativo apresentado pela variável temperatura no DCCR realizado para otimização da produção de trealose por *Rhodosporidium paludigenum*, foram realizados ensaios de aplicação do estresse térmico nas temperaturas de 35, 40 e 45°C, em diferentes tempos de fermentação, conforme o esquema representado pela Figura 5.21. O tempo de exposição ao estresse térmico foi fixado em 60 minutos, visto que esta variável não apresentou influência significativa sobre a produção de trealose, na faixa estudada (60 - 120 minutos).

De maneira análoga ao que foi realizado para a primeira levedura estudada, esta cinética teve o objetivo de confirmar os efeitos da temperatura de estresse térmico e também para verificar possíveis influências das fases de crescimento e viabilidade celular na resposta de trealose intracelular.

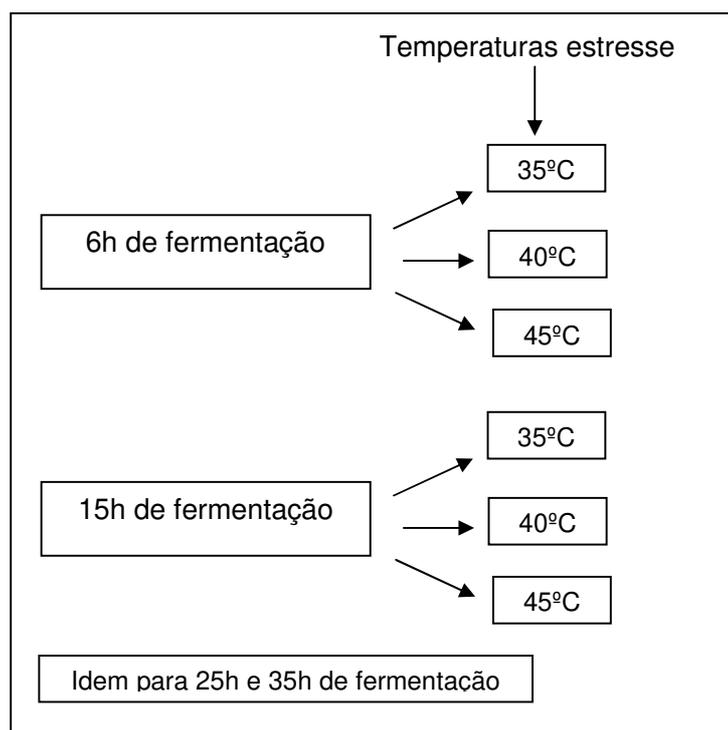


Figura 5.21 – Esquema dos ensaios realizados para a cinética de produção de trealose por *Rhodosporidium paludigenum*.

Os efeitos da aplicação do estresse térmico às células da levedura *Rhodosporidium paludigenum* sobre o teor de trealose intracelular, concentração de massa seca e viabilidade celular estão apresentados nas Figuras 5.22 a 5.24.

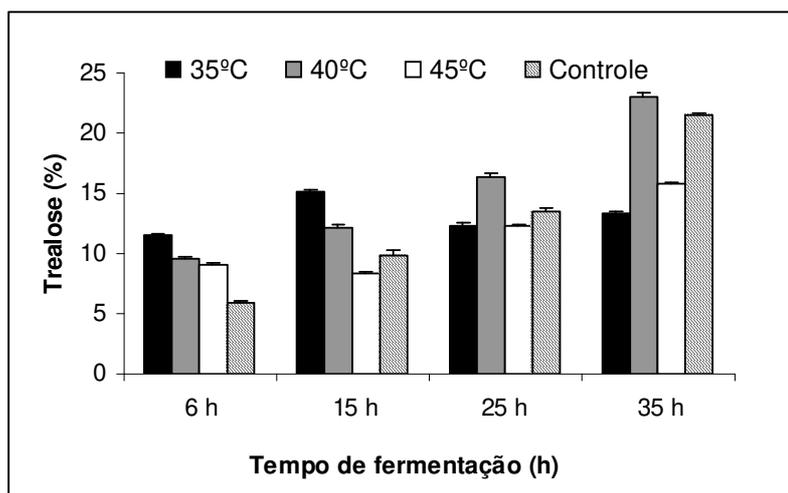


Figura 5.22 – Efeito da temperatura de estresse térmico sobre o teor de trealose (%) da levedura *Rhodospiridium paludigenum* em função do tempo de fermentação (h).

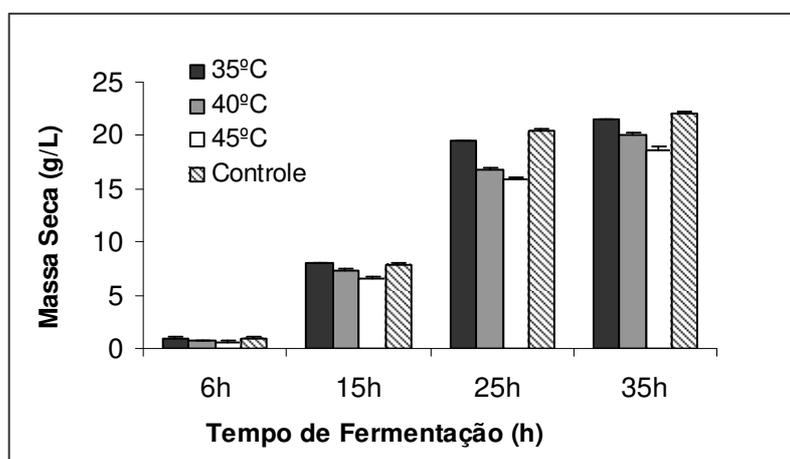


Figura 5.23 – Efeito da temperatura de estresse térmico sobre a concentração de massa seca (g/L) da levedura *Rhodospiridium paludigenum* em função do tempo de fermentação (h).

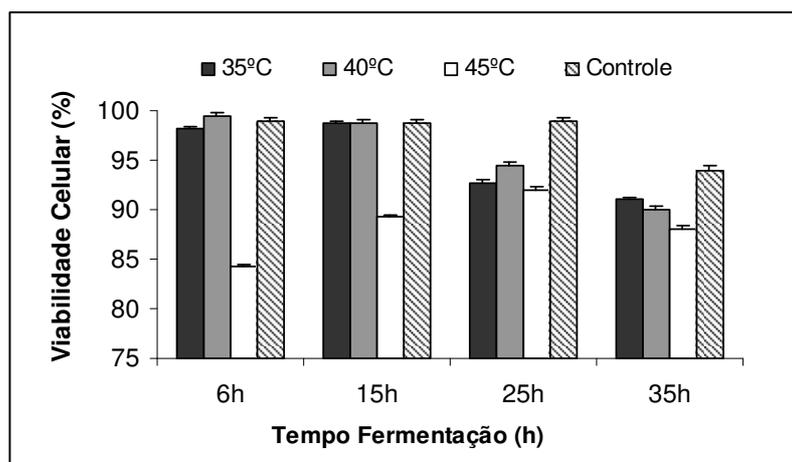


Figura 5.24 – Efeito da temperatura de estresse térmico sobre a viabilidade celular (%) da levedura *Rhodosporidium paludigenum* em função do tempo de fermentação (h).

Em relação ao efeito das temperaturas de estresse térmico aplicadas sobre a concentração de trealose, pode-se observar na Figura 5.22 que os maiores resultados foram observados no tempo de fermentação de 35h, obtendo-se 23 e 21,5% (g trealose/100g massa seca) para o tratamento das células a 40°C e para o tratamento controle (sem aplicação de estresse), respectivamente. O efeito negativo da temperatura de estresse térmico sobre o teor de trealose das células na faixa de 35 a 45°C torna-se evidente ao serem observados os resultados para os tempos de cultivo de 6 e 15h, para os quais houve um decréscimo crescente do teor de trealose com o aumento da temperatura.

Nos tempos de 25 e 35h de cultivo a temperatura de 40°C resultou em acréscimo significativo do teor de trealose em comparação ao tratamento controle e as demais temperaturas de estresse térmico estudadas ($p < 0,05$, teste de Tukey) (Figura 5.22), obtendo-se 16,3 e 23% de trealose, respectivamente, enquanto os resultados do tratamento controle foram de 13,5 e 21,5%.

Isto pode ser um indicativo de que as células da levedura estudada, quando em diferentes estágios do crescimento, apresentam respostas diferentes frente ao estresse térmico. Na Figura 5.25 pode-se verificar que, nos tempos de 6, 15, 25 e 35h de cultivo, as células encontravam-se em fases de crescimento distintas. Comportamento semelhante foi observado por Liu et al. (2005), que observaram um acréscimo de quatro vezes no teor de trealose de células de *Cândida krusei* em crescimento exponencial (12h de cultivo), expostas a um tratamento a 45°C; no tempo de 36h de cultivo os autores não

observaram diferenças significativas entre o teor de trealose das células tratadas e não tratadas. Os mesmos autores indicam que células diferentes (idade, estado fisiológico) podem apresentar respostas diferentes ao estresse térmico, refletindo suas características biológicas específicas e a versatilidade de adaptação.

No tempo de 25h de fermentação os resultados para os tratamentos a 35 e 45°C e para o tratamento controle foram semelhantes (entre 12 e 13%). Diniz-Mendes et al. (1999) indicaram, para leveduras de panificação, que durante o crescimento a 28°C as células acumularam quantidades significativas do dissacarídeo (11%). Entretanto, a aplicação de um tratamento térmico a 40°C não resultou no acréscimo da trealose intracelular, que permaneceu em níveis de 11 - 12%. Entretanto, em nosso estudo, a temperatura de 40°C levou a um acréscimo no teor de trealose intracelular.

Os resultados obtidos para o teor de trealose nos ensaios da cinética foram semelhantes aos resultados apresentados na seção 5.3.3 (otimização da produção de trealose pela levedura *Rhodospordium paludigenum*), considerando-se o tempo de cultivo de 25 horas e temperatura de estresse de 35°C. Na etapa de otimização observou-se um rendimento de 13,7% de trealose para o ensaio conduzido a 35°C (Tabela 5.31), o qual foi aplicado no tempo de 24h de cultivo. Nos ensaios da cinética (Figura 5.22), no tempo de 25 horas obtiveram-se 12,2 e 16,3% de trealose, respectivamente, nas temperaturas de 35 e 40°C.

Assim como observado na etapa de realização do DCCR (seção 5.3.3), pode-se dizer que a temperatura de 45°C não foi eficiente para a indução do acúmulo de trealose nas células da levedura estudada, promovendo a diminuição dos rendimentos intracelulares em comparação ao tratamento controle (Figura 5.22), nos quatro tempos de fermentação avaliados. Apenas no início da fase exponencial (6h de cultivo) houve um acréscimo no teor de trealose das células submetidas a esse tratamento (9,1%) em comparação ao controle (5,9%).

A explicação para este comportamento pode ser encontrada ao serem avaliados os efeitos dos tratamentos sobre a massa seca e viabilidade celular das células de *Rhodospordium paludigenum*, nas Figuras 5.23 e 5.24, respectivamente. Houve um decréscimo significativo ($p < 0,05$, teste de Tukey) na concentração de massa seca para o tratamento a 45°C em comparação aos tratamentos a 35 e 40°C e ao tratamento controle, exceção feita ao tempo de 6h de fermentação, onde o crescimento celular foi reduzido. A

temperatura de 45°C pode ter ocasionado injúrias e lise celular, acarretando a diminuição da concentração de massa seca.

Em relação à viabilidade celular (Figura 5.24) a temperatura de estresse térmico de 45°C ocasionou a redução deste parâmetro, em todos os tempos de fermentação avaliados. Nos tempos de 6 e 15h esta redução foi mais acentuada, provavelmente em função das células apresentarem-se nas fases iniciais de crescimento celular, apresentando maior sensibilidade a elevação da temperatura.

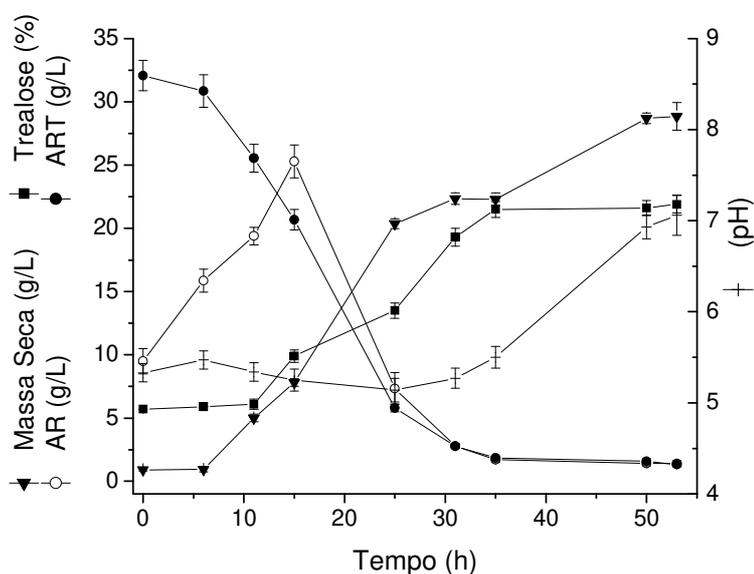


Figura 5.25 – Acompanhamento do acúmulo de trealose (■), crescimento celular (▼ massa seca), pH (+) e consumo de açúcares reductores (○ AR) e totais (● ART) para o cultivo de *Rhodosporidium paludigenum* utilizado nos ensaios da cinética.

Torna-se importante ressaltar que, embora o maior rendimento de trealose neste trabalho tenha sido observado no tempo de fermentação de 35 horas (23% para o tratamento a 40°C/60 minutos), o resultado obtido no tempo de 25 horas, após o tratamento a 40°C/60 minutos foi expressivo (16,3%), principalmente se levarmos em consideração a diferença de tempo entre os dois casos (10 horas).

Para finalizar, uma comparação interessante pode ser realizada com dados de produção de trealose pela bactéria gram positiva *Corynebacterium glutamicum* (PADILLA et al., 2004; CARPINELLI et al., 2006). Foram observadas produtividades de 1,3 g

trealose/100 g massa seca por hora, após 12 h de cultivo em processo em batelada de uma cepa de *Corynebacterium glutamicum* geneticamente modificada (recombinante) (PADILLA et al., 2004). Utilizando uma cepa não modificada (selvagem), Carpinelli et al. (2006) alcançaram produtividades inferiores a 0,5 g trealose/100 g massa seca por hora. Ambos estudos foram conduzidos em meios de cultivo complexos, contendo vários sais, vitaminas, antibióticos e 100 g/L de glicose como fonte de carbono. No presente trabalho, a levedura *Rhodospiridium paludigenum* apresentou um acúmulo de aproximadamente 23 g/100g massa seca, após 35 horas de cultivo e estresse térmico a 40°C/60 minutos (Figura 5.22), equivalente a uma produtividade de 0,66 g trealose/100 g massa seca por hora, a qual é inferior a produtividade apresentada pela cepa recombinante, mas superior a indicada para a cepa selvagem. Estes resultados são interessantes sob o ponto de vista econômico, visto que o meio de cultivo utilizado neste trabalho, composto por melão e água de maceração de milho, apresenta baixo custo, sendo mais vantajoso que o meio complexo usado nos estudos com a bactéria *C. glutamicum*.

6 CONCLUSÕES

- Dentre as 221 cepas de leveduras estudadas na etapa de seleção, foram selecionadas 2 cepas para o estudo da otimização da produção de trealose, em função dos níveis de trealose intracelular obtidos, as quais foram identificadas em relação ao gênero e espécie como *Rhodotorula dairenensis* e *Rhodosporidium paludigenum*. Ambas foram isoladas de materiais coletados no Cerrado (GO), região considerada como árida devido à baixa incidência de chuvas, onde a trealose pode exercer importante papel na manutenção da viabilidade celular;
- A possibilidade de produção de trealose, que atualmente é considerada um dissacarídeo promissor para diversas aplicações na área de alimentos e farmacêutica, pelo método de acúmulo em células de leveduras utilizando meio industrial de custo reduzido, composto apenas por melaço da cana-de-açúcar e água de maceração de milho, mostrou-se viável em função dos resultados apresentados neste trabalho;
 - Para ambas cepas estudadas, a estratégia seqüencial de planejamento experimental aplicada (planejamento fracionário seguido de Delineamento Composto Central Rotacional), permitiu a definição das condições ótimas de cultivo e de composição do meio industrial utilizado para a maximização do crescimento celular, para o posterior estudo de produção da trealose;
 - Para a levedura *Rhodotorula dairenensis*, as condições otimizadas de crescimento foram temperatura de 30°C e pH inicial de 5,5, 50g/L de melaço e 50g/L de água de maceração de milho. Para a levedura *Rhodosporidium paludigenum*, o máximo crescimento celular foi observado em temperatura de 25°C, pH inicial de 5,5, 50g/L de melaço e 140g/L de água de maceração de milho. Nestas condições foram obtidos resultados de massa seca de aproximadamente 19g/L e 31g/L, respectivamente para a *Rhodotorula dairenensis* e *Rhodosporidium paludigenum*, concentrações estas que podem ser consideradas como altas para o cultivo em frascos Erlenmeyer. Portanto, o meio industrial (composto por melaço e água de maceração de milho) foi capaz de suprir as necessidades de nutrientes e vitaminas das células, o que pode ser atribuído a sua composição complexa;

- Na etapa de otimização da produção de trealose por *Rhodotorula dairenensis* sob condições de estresse térmico, a temperatura apresentou efeito negativo sobre a resposta de trealose intracelular, enquanto o tempo de exposição apresentou efeito positivo, dentro das faixas estudadas. O máximo rendimento de trealose intracelular obtido foi de aproximadamente 18% (g trealose/100g massa seca) em condições de temperatura de 34 a 35°C e 70 - 90 minutos para o tempo de exposição ao estresse térmico;
- O efeito negativo da temperatura sobre a produção da trealose por *Rhodotorula dairenensis* foi mais pronunciado para cultivos em fase estacionária de crescimento, provavelmente devido a injúrias às células. A aplicação de estresse térmico na temperatura de 45°C foi inadequada para a indução da síntese de trealose por esta levedura, para qualquer tempo de exposição estudado (60 - 120 minutos);
- A produção de trealose pela levedura *Rhodospiridium paludigenum* também foi negativamente afetada pela temperatura, na faixa estudada (33-47°C); o tempo de exposição ao estresse térmico, por sua vez, não apresentou efeito estatisticamente significativo na faixa de 60 a 120 minutos. Os rendimentos de trealose intracelular observados variaram entre, aproximadamente, 14 a 16% (g trealose/100g massa seca) em condições de temperatura de estresse de 35 a 40°C;
- A viabilidade celular e a concentração de massa seca da levedura *Rhodospiridium paludigenum* foram reduzidas pela aplicação de temperaturas de estresse térmico acima de 40°C, indicando possíveis injúrias e morte celular nesta condição, inviabilizando a síntese da trealose;
- Para ambas leveduras estudadas observou-se um acréscimo do conteúdo intracelular de trealose paralelamente ao acréscimo da concentração de biomassa, com o aumento do tempo de fermentação, quando considerados os ensaios sem aplicação de estresse térmico, alcançando-se os maiores rendimentos na fase estacionária de crescimento celular;
- Os resultados obtidos para o conteúdo de trealose intracelular na etapa de seleção das leveduras foram superiores aos observados nas etapas de otimização da produção de trealose, o que foi atribuído à diferença entre os meios de cultivo utilizados (meio sintético na etapa de seleção e meio industrial na etapa de otimização), os quais apresentam diferentes concentrações e disponibilidades de glicose, além dos fatores inerentes à variabilidade dos bioprocessos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar o pré-tratamento do meio de cultivo contendo melaço e água de maceração de milho, com carvão ativo, de forma a clarificar o meio sem provocar prejuízos na fermentação, garantindo maior facilidade na recuperação e purificação da trealose;
- Estudar o processo de recuperação e purificação da trealose das células de leveduras, e realizar a identificação por comparação com padrões comerciais;
- Avaliar o efeito de outros tipos de estresse sobre o processo de acúmulo de trealose nas células das leveduras estudadas, como o estresse osmótico e a aplicação de baixas temperaturas;
- Realizar o estudo da produção de trealose a partir de outras cepas de leveduras testadas na etapa de seleção deste trabalho.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISAKA, K.; MASUDA, T. Production of trehalose phosphorylase by *Catellatospora ferruginea*. **FEMS Microbiology Letters**, v.131, p.47-51, 1995.
- ARANDA, J. S.; SALGADO, E.; TAILLANDIER, P. Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v.17, p.129-140, 2004.
- ARGÜELLES, J.C. Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, v.146, p.65-71, 1997.
- AVONCE, N.; MENDOZA-VARGAS, A.; MORETT, E.; ITURRIAGA, G. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. **BMC Evolutionary Biology**, v.6, p.109-123, 2006.
- BAS, D.; BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.836-845, 2007.
- BISWAS, N.; GHOSH, A.K. Regulation of acid trehalase activity by association-dissociation in *Saccharomices cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1379, p.245-256, 1998.
- BLÁZQUEZ, M.A.; STUCKA, R.; FELDMANN, H.; GANCEDO, C. Trehalose-6P synthase is dispensable for growth on glucose but for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.3895–3902, 1994.
- BLOMBERG, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. **FEMS Microbiology Letters**, v.182, p.1-8, 2000.
- CARDOSO, F.C.; GASPAR, P.; HUGENHOLTZ, J.; RAMOS, A.; SANTOS, H. Enhancement of trehalose production in dairy propionibacteria through manipulation of environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.195-204, 2004.

- CARPINELLI, J.; KRÄMER, R.; AGOSIN, E. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for trehalose overproduction: role of the TreYZ trehalose biosynthetic pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p.1949-1955, 2006.
- CARVALHEIRO, F.; ROSEIRO, J.C.; GÍRIO, F.M. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v.16, p.543-550, 1999.
- CHI, Z.; LIU, J.; JI, J.; ZHANG, W. Enhanced conversion of soluble starch to trehalose by a mutant of *Saccharomycopsis fibuligera* sdu. **Journal of Biotechnology**, v.102, p.135-141, 2003.
- CHI, Z.; LIU, J.; ZHANG, W. Trehalose accumulation from soluble starch by *Saccharomycopsis fibuligera* sdu. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.240-245, 2001.
- CHUANBIN, L.; JIAN, X.; FENGWU, B.; ZHIGUO, S. Trehalose extraction from *Saccharomyces cerevisiae* after microwave treatment. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.12, p.941-943, 1998.
- COCKSHOTT, A.R.; SULLIVAN, G.R. Improving the fermentation médium for Echiocandin B production. Part I: sequential statistical experimental design. **Process Biochemistry**, v.36, p.647-660, 2001.
- CROWE, J.H.; TABLIN, F.; WOLKERS, W.F.; GOUSSET, K.; TSVETKOVA, N.M.; RICKER, J. Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.122, p.41-52, 2003.
- CROWE, L.M.; MOURADIAN, R.; CROWE, J.H.; JACKSON, S.A.; WOWOMERLEY, C. Effect of carbohydrates on membrane stability at low water activities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.769, p.141-150, 1984.
- DE VIRGILIO, C.; HOTTIGER, T.; DOMINGUEZ, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for acquisition of thermotolerance in yeast. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. **European Journal of Biochemistry**, v.219, p.179-186, 1994.

- DINIZ-MENDES, L.; BERNARDES, E.; ARAUJO, P.S.; PANEK, A.D.; PASCHOALIN, V.M.F. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.65, p.572-578, 1999.
- DONG, Y.; YANG, Q.; JIA, S.; QIAO, C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.226-230, 2007.
- DUTTA, J.R.; DUTTA, P.K.; BANERJEE, R. Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas sp.* using response surface and artificial neural network models. **Process Biochemistry**, v.39, p.2193-2198, 2004.
- EASTMOND, P.J.; GRAHAM, I.A. Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.231-235, 2003.
- FERREIRA, J.C.; PASCHOALIN, V.M.F.; PANEK, A.D.; TRUGO, L.C. Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. **Food Chemistry**, v.60, n.2, p.251-254, 1997.
- FRANÇOIS, J.; PARROU, J.L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.125-145, 2001.
- GEO Brasil 2002 - Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil / Organizado por Thereza Christina Carvalho Santos e João Batista Drummond Câmara - Brasília: Edições IBAMA, 2002. 440p. ISBN 85-7300-144-5.
- GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J.C.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; PEÑA, A. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. **Extremophiles**, v.9, p.7-16, 2005.
- HAALAND, P.D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1989. 243p.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; LARSSON, C.U.; GORWA-GRAUSLUND, M.; GÖRGENS, J.; ZYL, W.H. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial Cell Factories**, v.4, n.31, 2005.

- HAMAMOTO, M.; NAGAHAMA, T.; TAMURA, M. Systematic study of basidiomycetous yeasts - evaluation of the ITS regions of rDNA to delimit species of the genus *Rhodospordium*. **FEMS Yeast Research**, v.2, p.409-413, 2002.
- HAWKSWORTH, D.L. Why study tropical fungi? In: WATLING, R.; FRANKLAND, J.; AINSWORTH, M.; ISAAC, S.; ROBINSON, C. **Tropical mycology**. Vol. 2. Cambridge: CABI Publishing, p.320, 2002.
- HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. 2006. 155f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- HIGASHIYAMA, T. Novel functions and applications of trehalose. **Pure Applied Chemistry**, v.74, p.1263-1269, 2002.
- HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.5518-5522, 1987.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.6, p.205-229, 2003.
- HUGENHOLTZ, J.; SMID, E. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.497-507, 2002.
- JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3ª ed. Zaragoza: Acribia, 1992. 804p.
- JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M.; THEVELEIN, J.M.; TERENCEI, H.F. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v.154, p.165-171, 1997.
- KABKE, K. **Otimização da produção de inulinase em meio industrial através de linhagens de *Kluyveromyces marxianus***. 2002. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v.35, p.539-550, 2000.
- KIENLE, I.; BURGERT, M.; HOLZER, H. Assay of trehalose with acid trehalase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.9, p. 607-611, 1993.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1987. 1082p.
- LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symp**, n.11, p.641-649, 1981.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I.; ALMEIDA, A.M. Inventários bióticos centrados em recursos: insetos fitófagos e plantas hospedeiras. **In: GARAY, E. B.; DIAS, F. S. Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Petrópolis: Vozes, 2000.
- LI, X.Y.; LIU, Z.Q.; CHI, Z.M. Production of phytase by a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium: Optimization by response surface methodology. **Bioresource Technology**, 2008, doi:10.1016/j.biortech.2007.11.065
- LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, v.143, p.1384-1394, 1980.
- LING, Z.; MORIMURA, S.; KIDA, K. Effect of fermentation temperature on relationship between cell viability and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* KF-7 in repeated-batch fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, p.204-207, 1995.
- LIU, H-J; LIU, D-H; ZHONG, J-J. Interesting physiological response of the osmophilic yeast *Cândida Krusei* to heat shock. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.409-416, 2005.

- LIU, H-J; LIU, D-H; ZHONG, J-J. Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium. **Process Biochemistry**, v.41, p.473-476, 2006.
- LUCIO, A.K.B.; POLIZELI, M.L.T.M.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F. Stimulation of hyphal growth in anaerobic cultures of *Mucor rouxii* by extracellular trehalose. Relevance of cell wall-bound activity of acid trehalase for trehalose utilization. **FEMS Microbiology Letters**, v.182, p.9-13, 2000.
- MARUTA, K.; KUBOTA, M.; SUGIMOTO T.; MIYAKE, T. Enzyme capable of liberating trehalose, its production and use. Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. Japanese patent JP07-213283, 1995.
- MELEIRO, C.R.M. Processo para obtenção de trealose de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Patente nº 9303490, INPI, Brasil, 1993.
- MIYAZAKI, J.; MIYAGAWA, K.; SUGIYAMA, Y. Trehalose accumulation by a basidiomycotinous yeast, *Filobasidium floriforme*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.81, p.315-319, 1996.
- MORANA, A.; STIUSO, P.; COLONNA, G.; LAMBERTI, M.; CARTENI, M.; DE ROSA, M. Stabilization of S-adenosyl-L-methionine promoted by trehalose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1573, p.105-108, 2002.
- MUKAI, K.; TABUCHI, A.; NAKADA, T.; SHIBUYA, T.; CHAEN, H.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M.; TSUJISAKA, Y. Production of trehalose from starch by thermostable enzymes from *Sulfolobus acidocaldarius*. **Starch**, v.49, p.26-30, 1997.
- NAGAHAMA, T.; HAMAMOTO, M.; HORIKOSHI, K. *Rhodotorula pacifica* sp. nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep-sea floor of the north-west Pacific Ocean. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.295-299, 2006.
- NAGASE, H.; ENDO, T.; UEDA, H.; NAKAGAKI, M. An anhydrous polymorphic form of trehalose. **Carbohydrate Research**, v.337, p.167-173, 2002.

- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v.153, p.375-380, 1944.
- NETO, B.B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento da ciência e na indústria. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 399p.
- OHASHI, T.; YOSHII, H.; FURUTA, T. Innovative crystal transformation of dihydrate trehalose to anhydrous trehalose using ethanol. **Carbohydrate Research**, v.342, p.819–825, 2007.
- PADILLA, L.; KRÄMER, R.; STEPHANOPOULOS, G.; AGOSIN, E. Overproduction of trehalose: heterologous expression of *Escherichia coli* trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.370-376, 2004.
- PAIVA, C.L.A.; PANEK, A.D. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. **Biotechnology Annual Reviews**, v.2, p.293-314, 1996.
- PANCHAL, C.H. **Yeast Strain Selection**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1990. 368p.
- PATIST, A.; ZOERB, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. **Colloids and Surfaces**, v.40, p.107-113, 2005.
- PHAFF H. Isolation of yeasts from natural sources. **In: LACERDA, D.P. Isolation of biotechnology organisms from nature**. New York: McGraw-Hill, p.53-79, 1990.
- PHAFF, H.J.; STARMER, W.T. Specificity of natural habitats for yeasts and yeast-like organisms. **In: SKINNER, F. A.; PASSMORE, S. M.; DAVENPORT, R. R. Biology and Activities of Yeasts**. London: Academic Press, p.79-102, 1980.
- PIPER, P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.11, p.339-356, 1993.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc., 1999. 593p.

- RIBEIRO, M.J.S.; LEÃO, L.S.C.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; PANEK, A. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.75, p.245–251, 1999.
- RIBEIRO, M.J.S.; SILVA, J.T.; PANEK, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during heat-shock. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1200, p.139-147, 1994.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.
- SCHIRALDI, C.; DI LERNIA, I.; DE ROSA, M. Trehalose production: exploiting novel approaches. **Trends in Biotechnology**, v.20, p.420-425, 2002.
- SETO, A.; YOSHIJIMA, H.; TOYOMASU, K.; OGAWA, H.-O.; KAKUTA, H.; HOSONO, K.; UEDA, K.; BEPPU, T. Effective extracellular trehalose production by *Cellulosimicrobium cellulans*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.64, p.794–799, 2004.
- SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.460-468, 1998.
- SIRIANUNTAPIBOON, S.; PHOTHILANGKA, P.; OHMOMO, S. Decolorization of molasses wastewater by a strain No.BP103 of acetogenic bacteria. **Bioresource Technology**, v.92, p.31-39, 2004.
- SOMOGYI, M.A. A New Reagent for the Determination of Sugars. **Journal of Biological Chemistry**. v.160, p.61-68, 1945.
- SOUZA, C.F.V.; FLÔRES, S.H.; AYUB, M.A.Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**, v.41, p.1186-1192, 2006.
- SOUZA, L. Distribution of yeast in nature. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts: Biology of the Yeasts**. London: Academic Press, p.79-106, 1969.

- STEWART, P.R. In: PRESCOTT, D.M. **Methods in Cell Biology**. Vol. 12. London and New York: Academic Press, p.111-147, 1982.
- SUKHOON, K.; JOONGSU, K.; HYUN-JAE, S.; DUCKHEE, L.; JUNGDON, B.; DOOIL, K.; DAE-SIL, L. Mechanistic study of the intramolecular conversion of maltose to trehalose by *Thermus caldophilus* GK24 trehalose synthase. **Carbohydrate Research**, v.338, p.1339-1343, 2003.
- TANAKA, M.; MACHIDA, Y.; NUKINA, N. A novel therapeutic strategy for polyglutamine diseases by stabilizing aggregation-prone proteins with small molecules. **Journal of Molecular Medicine**, v.83, p.343-352, 2005.
- TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUN, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.
- TREICHEL, H. **Estudo de meios industriais para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045**. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y7571 em meios industriais pré-tratados**. 2004. 100 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- VAN DIJCK, P.; COLAVIZZA, D.; SMET, P.; THEVELEIN, J.M. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.109-115, 1995.
- VOIT, E.O. Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. **Journal of Theoretical Biology**, v.223, p.55-78, 2003.
- YOSHIKAWA, Y.; MATSUMOTO, K.; NAGATA, K.; SATO, T. Extraction of trehalose from thermally-treated bakers' yeast. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, p.1226-1230, 1994.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZHOU, Y.; YUAN, Q.; GAO, H.; MA, R.Y. Production of trehalose by permeabilized *Micrococcus QS412* cells. **Journal of Molecular Catalysis**, v.43, p.137-141, 2006.