

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DE
PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA
UTILIZANDO ATRIBUTOS DE COMPOSIÇÃO
CELULAR E CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS**

Autor: Cláudia Steckelberg

Orientador: Silvio Roberto Andrietta

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Setembro de 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



200207313

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	1/ UNICAMP
	St31c
V.º	47793
T.º	837/02
PREC.º	2511.00
C	☐
D	☒
DATA	14-02-02
N.º CPD	

CM00163497-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

St31c Steckelberg, Cláudia
Caracterização de leveduras de processos de
fermentação alcoólica utilizando atributos de composição
celular e características cinéticas / Cláudia Steckelberg. --
Campinas, SP: [s.n.], 2001.

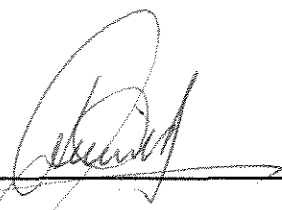
Orientador: Silvio Roberto Andrietta.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Leveduras (Fungos) – Engenharia genética. 2.
Fermentação. 3. Trealose. 4. Ácidos graxos. 5.
Aminoácidos. I. Andrietta, Silvio Roberto. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

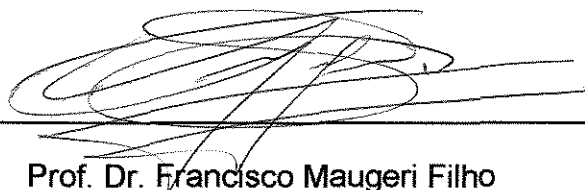
Tese de Doutorado defendida por Cláudia Steckelberg e aprovada em 28 de Setembro de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta - Orientador



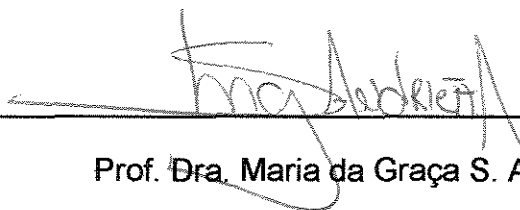
Prof. Dr. Fumio Yokoya



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho



Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dra. Maria da Graça S. Andrietta

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em
Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Andrietta', is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Silvio R. Andrietta

Dedico este trabalho aos meus filhos Marcela e Leonardo, as luzes de minha vida e ao meu marido Marcelo.

Ofereço com carinho aos meus pais Clodoaldo e Jandira e as minhas irmãs Ana Maria, Flávia e Alessandra que sempre me deram incentivos para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Sílvio R. Andrietta pela orientação, confiança, estímulo e principalmente pela paciência e compreensão nos momentos de incertezas e até descrença.

A minha família que me apoiou incondicionalmente em todos os momentos. Obrigado por existirem e por fazerem parte de minha vida.

Ao meu marido Marcelo pelo carinho, pela força e por acreditar que eu seria capaz de alcançar meu objetivo. Aos meus filhos Marcela e Leonardo por me darem uma nova visão sobre a vida.

De uma forma especial à Dra. Graça pela ajuda, boa vontade, críticas, correções e sugestões que contribuíram em muito na conclusão deste trabalho. Agradeço-a também pela amizade, pelo companheirismo e por muitas conversas que me fizeram crescer como pessoa.

Ao membros da Banca Examinadora, pela atenção, correção e contribuição na realização deste trabalho.

À Dra. Vera Baldino (ITAL), Dra. Vera Rheder e ao Adílson Sartorato (CPQBA) pela contribuição ao trabalho.

Aos amigos e colegas do CPQBA, em especial Milene, Marcelo e Cláudio, e todos que estiveram junto a mim e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, com sugestões, críticas e especialmente amizade.

À Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao CPQBA/UNICAMP pela realização deste trabalho.

A Deus por me guiar em mais esta etapa de minha vida.

ÍNDICE GERAL

Resumo	xxv
Abstract	xix
Capítulo 1 – Introdução	1
Objetivo	3
1. Proposta de Trabalho	3
2. O Programa Proálcool	4
3. Evolução Tecnológica na Produção de Etanol	10
3.1. Processo Batelada (Clássico)	10
3.2. Processo Batelada Alimentada ou Melle-Boinot	10
3.3. Processo Contínuo	11
4. Bioquímica da Fermentação Alcoólica	13
5. Microrganismos Produtores de Etanol	15
5.1. Microrganismos Utilizados em Processos Industriais	16
6. Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica	17
6.1. pH	17
6.2. Temperatura	19
6.3. Substrato	20
6.4. Oxigênio	21
6.5. Etanol	22
6.6. Viabilidade Celular	23
6.7. Contaminação Bacteriana	24
7. Bibliografia	27

Capítulo 2 – Cepas Estudadas	33
Objetivo	35
1. Introdução	35
2. Linhagens	38
CEPA 1 - Alvorada	38
CEPA 2 - Unialco	39
CEPA 3 - Diamante	40
CEPA 4 - Diana	41
CEPA 5 – Jalles Machado	42
CEPA 6 - Junqueira	43
CEPA 7 - Goiasa	44
CEPA 8 – Vale do Rosário	45
CEPA 9 - Bonfim	46
CEPA 10 – Costa Pinto	47
CEPA 11 - Guarani	48
CEPA 12 - Andrade	49
CEPA 13 - Dacal	50
CEPA 14 - Dacalda	51
CEPA 15 - Alcoeste	51
CEPA 16 - Corol	52
CEPA 17 – Mauri	53
CEPA 18 - Mauri	53
CEPA 19 – Barra Grande	54
CEPA 20 – Santa Cruz	55
CEPA 21 - Clealco	56
3. BIBLIOGRAFIA	57

Capítulo 3 – Levantamento das Características	
Cinéticas das Cepas	59
Objetivo	61
1. Introdução	61
2. Potencial Fermentativo	62
3. Capacidade Fermentativa	64
4. Avaliação das Linhagens	68
4.1. Determinação dos Parâmetros de Classificação	68
5. Métodos Analíticos	69
5.1. Determinação da Massa Seca	69
5.2. Determinação do Etanol Produzido	69
5.3. Determinação da Glicose	70
5.4. Determinação de $\mu_{\text{máx}}$	71
6. Cálculo dos Parâmetros para Classificação	72
6.1. Determinação da Massa de Etanol Produzida (ETOH)	73
6.2. Determinação da Massa de Glicose Consumida (GLI)	73
6.3. Determinação da Massa Celular Produzida (MX)	74
6.4. Obtenção da Produção Específica de Etanol (Y_p/s)	75
6.5. Obtenção da Produtividade ($\emptyset$)	75
6.6. Obtenção da Velocidade de Consumo de Substrato (VCS)	76
6.7. Determinação do Nível de Conversão do Substrato (NCO)	76
7. Resultados e Discussão	77
8. Bibliografia	82

Capítulo 4 – Taxonomia Numérica 85**Objetivo** 87**1. Introdução** 87**2. Material e Método** 90

2.1. Inóculo 90

2.2. Preparo dos Açúcares para Teste de Assimilação e Fermentação 90

2.3. Assimilação de Nitrato de Potássio (KNO_3) 91

2.4. Crescimento em Presença de Alta Concentração Osmótica 92

2.5. Hidrólise do Amido 92

2.6. Crescimento a 37°C 93

2.7. Forma Celular 93

3. Resultados e Discussão 94**4. Bibliografia** 97**Capítulo 5 - Tolerância ao Etanol** 99**Objetivo** 101**1. Introdução** 101**2. Material e Métodos** 104

2.1. Tolerância ao Etanol 104

2.1.1. Condições de Crescimento 104

2.1.2. Condução do Ensaio 105

2.1.3. Cálculo da Tolerância ao Etanol 105

3. Resultados e Discussão 107**4. Bibliografia** 112

Capítulo 6 – Composição Celular: Trealose _____ 117**Objetivo _____ 117****1. Introdução _____ 117****2. Material e Métodos _____ 120**

2.1. Condições de Crescimento _____ 120

2.2. Metodologia Analítica _____ 121

2.2.1. Extração _____ 121

2.3. Quantificação da Trealose _____ 121

3. Resultados e Discussão _____ 122

3.1. Avaliação da Precisão do Método _____ 122

3.2. Teores de Trealose nas Cepas Estudadas _____ 124

4. Bibliografia _____ 128**Capítulo 7 – Composição Celular: Proteína/Aminoácidos _____ 131****Objetivo _____ 133****1. Introdução _____ 133****2. Material e Métodos _____ 136**

2.1. Condições de Crescimento _____ 136

2.2. Determinação de Proteína na Massa de Levedura Seca _____ 137

2.3. Determinação dos Aminoácidos _____ 139

2.3.1. Metodologia _____ 139

2.4. Quantificação dos Aminoácidos _____ 139

2.5. Tratamento Estatístico dos Dados _____ 141

3. Resultados e Discussão _____ 142**4. Bibliografia _____ 178**

Capítulo 8 – Composição Celular: Ácidos Graxos _____ 181**Objetivo _____ 183****1. Introdução _____ 183****2. Material e Métodos _____ 186**

2.1. Condições de Crescimento _____ 186

2.2. Metodologia Analítica _____ 187

2.2.1. Hidrólise _____ 187

2.2.2. Extração _____ 188

2.3. Quantificação dos Ácidos graxos _____ 188

3. Resultados e Discussão _____ 189**4. Bibliografia _____ 208****Capítulo 9 - Conclusões _____ 211****Objetivo _____ 213**

RESUMO

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de trabalhos que buscam entender a dinâmica de população de leveduras habitante das dornas de fermentação alcoólica. Os trabalhos gerados elucidaram questões importantes. Entre elas quais seriam as características básicas para que uma levedura permanecesse em um dado processo. Seguindo este contexto este trabalho teve como finalidade contribuir para o conhecimento das características das cepas de leveduras dominantes dos processos fermentativos industriais das destilarias brasileiras. Buscou-se neste trabalho, descrever os atributos de desempenho fermentativo e composição celular de 19 cepas isoladas de vários processos instalados em diferentes regiões do Brasil e com características particulares. Os atributos estudados foram: capacidade fermentativa; taxonomia numérica; tolerância ao etanol; teores de: trealose, proteína/aminoácido, e ácidos graxos. Com objetivo de comparação dos atributos estudados, avaliou-se uma cepa destinada a indústria de panificação assim como uma isolada de um processo de produção de álcool instalado em território Indiano. Os resultados mostraram que em relação às características fermentativas as cepas embora estejam colocadas em 17 grupos diferentes todas se apresentam como boas fermentativas. Em relação à taxonomia numérica foram classificadas 20 das 22 analisadas. Sendo 8 classificadas como *Saccharomyces chevalieri*, 5 como *Saccharomyces coreanus* e 7 como *Saccharomyces cerevisiae*. Se for considerado a classificação segundo BARNET (1992) todas elas são representantes de *S. cerevisiae*. Em relação à tolerância ao etanol existe uma faixa que varia entre 0,166 e 0,653 1/M. A faixa da concentração de trealose na massa celular abrange concentrações que variam 0,47 a 6,3%. No que diz respeito a quantidade de proteína, essa mostra uma variação de 10% da cepa que apresenta uma maior quantidade para que apresenta a

menor. As leveduras que apresentaram maior valor de produção específica de massa celular foram também as que apresentaram uma menor quantidade de material protéico. Em relação à distribuição de aminoácidos nesta proteína, os resultados mostram que todas se apresentam dentro do perfil esperando para linhagens de *S. cerevisiae*. Todas cepas testadas apresentaram os ácidos graxos C-12:0 (ac.láurico), C-14:0 (ac.mirístico), C-16:0 (ac.palmitico), C-16:1 (ác.palmitoleico), C-18:0 (ac.esteárico) e C-18:1 (ac.oleico) em sua composição. Algumas cepas apresentaram ainda o ácido graxo insaturado C14:1 (ac.miristoleico). Os ácidos graxos insaturados (C-16:1 e C-18:1) são os de maior abundância no material graxo que compõe as cepas testadas, que segundo alguns autores estão vinculados com a tolerância das cepas ao etanol. Alguns indícios de relação entre o teor de ácidos graxos C-16:1 e C-18:1 e a tolerância ao etanol pode ser observado, mas uma correlação exata não pôde ser determinada. A partir da compilação dos dados obtidos neste trabalho é possível afirmar que as cepas isoladas dos diversos processos fermentativos apresentaram variações comportamentais e de composição celular. Entretanto quando se avalia o parâmetro de capacidade fermentativa, todas as cepas são classificadas como adequadas para o processo de fermentação alcoólica. Isto confirma a hipótese que, embora as leveduras apresentem características fermentativas semelhantes, pois do contrário não poderiam estar presentes em um ambiente hostil, como é o das dornas de fermentação, cada processo seleciona sua própria linhagem, e que a mesma é provavelmente habitante natural da matéria-prima que a unidade processa.

ABSTRACT

In the past years, there has been a significant increase in studies seeking to understand the dynamics of the yeast population inhabiting alcoholic fermentation vats. The studies generated have elucidated important issues. Among them, which would be the basic characteristics for a strain to remain in a process. Following this context, this study has had the purpose of enhancing the knowledge on the characteristics of the dominant strains of industrial fermentation processes of Brazilian distilleries. This study has sought to describe the fermentative performance attributes and the cellular makeup of 19 strains, with particular characteristics, isolated from several processes installed in different regions of Brazil. The attributes studied were: fermentative capacity; Numerical Taxonomy; tolerance to ethanol, and contents of trehalose, protein/amino acids, and fatty acids. In order to compare the attributes studied, one strain assigned to the baking industry as well as one isolated from an alcohol production process installed in the Indian territory were evaluated. The results have shown that all strains have presented good fermentative characteristics in spite of being divided in 17 different groups. As for the numerical taxonomy, 20 out of the 22 strains analyzed have been classified, of which 8 have been classified as *Saccharomyces chevalieri*, 5 as *Saccharomyces coreanus* and 7 as *Saccharomyces cerevisiae*. If the classification according to BARNET (1992) is considered, all of them are representative of *S. cerevisiae*. As for ethanol tolerance, there is a variable range between 0.166 and 0.653 1/M. The trehalose concentration level in the cellular mass encompasses concentrations varying from 0.47 to 6.3%. With regard to the amount of protein, this sample has shown a 10% variation of the strain presenting the highest amount to the one presenting the lowest. The strains presenting the highest value of specific cellular mass production were also the ones showing

the lowest amount of proteinic material. As for the amino-acid distribution in this protein, the results have shown that all of them were within the expected profile for *S. cerevisiae* strains. All strains tested presented the following fatty acids in their makeup: C-12:0 (lauric acid), C-14:0 (myristic acid), C-16:0 (palmitic acid), C-16:1 (palmitoleic acid), C-18:0 (stearic acid), and C-18:1 (oleic acid). Some strains have also presented the C14:1 (myristoleic acid) unsaturated fatty acid. The C-16:1 and C-18:1 unsaturated fatty acids are the most plentiful in the fatty material composing the strains tested and, according to some authors, they are linked to the tolerance of the strains to ethanol. Some indications as for relationship between the content of C-16:1 and C-18:1 fatty acids and the tolerance to ethanol may be noticed, even though an exact correlation has not been able to be determined. From the compilation of the data obtained in this study, it is possible to state that the strains isolated from several fermentation processes have shown behavioral and cellular makeup variations. However, when the fermentative capacity parameter is evaluated, all strains are classified as suitable for the alcoholic fermentation process. This fact confirms the hypothesis that, although some strains have similar fermentative characteristics, since, otherwise, they could not inhabit a hostile environment such as the one in the fermentation vats, each process selects its own strain, and such strain is probably a natural inhabitant of the raw-material of the unit processing it.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

ÍNDICE

Objetivo	3
1. Proposta de Trabalho	3
2. O Programa Proálcool	4
3. Evolução Tecnológica na Produção de Etanol	10
3.1. Processo Batelada (Clássico)	10
3.2. Processo Batelada Alimentada ou Melle-Boinot	10
3.3. Processo Contínuo	11
4. Bioquímica da Fermentação Alcoólica	13
5. Microrganismos Produtores de Etanol	15
5.1. Microrganismos Utilizados em Processos Industriais	16
6. Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica	17
6.1. pH	17
6.2. Temperatura	19
6.3. Substrato	20
6.4. Oxigênio	21
6.5. Etanol	22
6.6. Viabilidade Celular	23
6.7. Contaminação Bacteriana	24
7. Bibliografia	27

OBJETIVO

Neste capítulo será apresentado o “estado da arte” da produção de álcool no Brasil. Serão ainda colocados aspectos relevantes envolvidos na produção de etanol por via fermentativa. Este capítulo apresenta ainda o trabalho desenvolvido nesta tese.

1. PROPOSTA DE TRABALHO

Nos últimos anos, vários trabalhos de pesquisa vêm sendo realizados com o objetivo de determinar o comportamento populacional das leveduras em unidades de fermentação industriais para produção de etanol. As destilarias brasileiras operam de forma que permitem a entrada de microrganismos contaminantes, normalmente habitantes do caldo de cana no processo fermentativo. Desta forma, é de se esperar que exista uma competição entre estas cepas durante o decorrer da safra. É esperado ainda que a cepa que se encontra em maior concentração no vinho em fermentação é aquela que possui as características que mais se adequam às condições de processo no momento.

Não se sabe ao certo quais são os fatores que podem influenciar na seleção da cepa dominante, mas com certeza a matéria-prima, as condições operacionais e o tipo de processo são fatores com capacidade seletiva.

Este trabalho teve como finalidade contribuir para o conhecimento das características das cepas de leveduras dominantes dos processos fermentativos industriais das destilarias brasileiras. Buscou-se neste trabalho, descrever os atributos de desempenho fermentativo e

composição celular de 19 cepas isoladas de vários processos instalados em diferentes regiões do Brasil e com características particulares. Com objetivo de comparação dos atributos estudados, avaliou-se uma cepa destinada a indústria de panificação assim como uma isolada de um processo de produção de álcool instalado em território Indiano.

Com isto pretende-se iniciar a criação de um banco de dados que reünam informações sobre as características (cinéticas e de composição celular) das leveduras de processo industriais brasileiros. Espera-se que esse mapeamento seja de grande utilidade na concepção de projetos de fermentação alcoólica. Com essas informações a engenharia possuirá níveis de informações superior ao que se dispõe no momento, gerando um projeto que levará em consideração particularidades sobre as cepas de leveduras.

2. O PROGRAMA PROÁLCOOL

O etanol pode ser produzido a partir de diferentes fontes de matérias primas. O etanol produzido a partir do petróleo é usado basicamente como solvente nas indústrias químicas. Esse quando produzido a partir da cana de açúcar além de ser utilizado como agente desinfetante como ingrediente na indústria de alimentos e na produção de fármacos tem grande utilização como combustível alternativo à gasolina (cerca de 68% da produção de etanol é utilizada como combustível) (ZANIN, *et al.*, 2000).

O Brasil é o maior produtor de etanol a partir da cana de açúcar e é o único país a implantar em larga escala um combustível alternativo ao petróleo. O etanol é reconhecido mundialmente como um combustível ecológico

devido suas vantagens para o meio ambiente, bem como ser vantajoso sócio e economicamente. Durante 1997-1998 300 milhões de tonelada de cana de açúcar foram moídas, resultando em 14,8 milhões de toneladas de açúcar e 13,8 bilhões de litros de etanol. Esse pode ser produzido tanto na forma hidratada (mistura azeotrópica) e na forma anidra, sendo que a primeira é utilizada como combustível e a segunda forma é usada para mistura à gasolina. As regiões, central e sudeste do Brasil são responsáveis por 87% de toda a produção nacional.

O estado de São Paulo sozinho produziu cerca de 9 bilhões de litros de etanol/ano. O Brasil possui 328 usinas em atividade, sendo 101 produzindo somente etanol e 227 produzindo etanol e açúcar (JORNAL DA CANA, 1999; PARANÁ AÇÚCAR & ÁLCOOL, 1999).

Com a crescente preocupação em relação à poluição ambiental, os países se viram obrigados a fazer uso de compostos oxigenados misturados à gasolina para reduzir seus índices de poluição. O álcool foi utilizado para esse propósito permitindo assim que o Brasil substituísse o tetraetilenol de chumbo como aditivo para combustíveis, desta maneira reduzindo-se as emissões de poluentes provenientes de sua queima. Atualmente a proporção de etanol anidro adicionado à gasolina é cerca de 22-24% (v/v) (ZANIN *et al.*, 2000).

O etanol derivado da cana de açúcar tem sido usado como combustível desde 1903 quando o Primeiro Congresso Nacional em Aplicações Industriais de Álcool propôs que se estabelecesse uma infra-estrutura para promover a produção e utilização de etanol (MOREIRA & GOLDEMBERG, 1996). O interesse na utilização do etanol como combustível aumentou consideravelmente na década de 70 durante a crise internacional do petróleo, quando o álcool foi visto como uma saída

para complementar o abastecimento de combustíveis fósseis, podendo até mesmo substituí-los. A razão principal para o lançamento no Brasil do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL) em meados da década de 70 foi uma resposta à crise do petróleo, possibilitando também atingir outros objetivos como: contornar o problema da variação do preço do açúcar no mercado internacional, abrandamento de problemas com a balança comercial, redução de disparidades regionais de renda e redução de problemas ambientais; principalmente os relacionados à qualidade do ar, e desenvolvimento de tecnologia nacional na área de alternativas energéticas.

O PROÁLCOOL foi implementado em 1975 e é responsável pelo impressionante aumento da produção de etanol no Brasil, passando de 500 milhões de litros no início do programa para 13 bilhões de litros de álcool por ano desde 1986, sendo esta produção exclusivamente da fermentação de cana de açúcar (ZANIN *et al.*, 2000).

A implementação do PROÁLCOOL atravessou duas etapas. Uma primeira fase que começou em 1975. Nesta etapa o etanol passa a ser um aditivo à gasolina passando de 1,1% em 1975 para 16,7% em 1979. Este aumento ocorreu sem que para isso fossem necessários alterações nos motores. A segunda fase iniciou-se em 1979 com a produção do álcool hidratado para uso direto como combustível, no qual os motores dos automóveis tiveram que ser completamente modificado.

O aumento na produção e no uso do etanol como combustível foi possível devido a ações estratégicas por parte do governo: a decisão que a PETROBRÁS adquiriria uma quantidade garantida de etanol; o fornecimento de incentivos econômicos para empresas agro-industrial comprometidas a produzir etanol. O incentivo traduziu-se em um

empréstimo de US\$ 2 bilhões com baixas taxas de 1980 até 1985. Este valor representou 29% do total de investimento necessário para alcançar a capacidade instalada no presente. Outra medida complementar foi a possibilidade do etanol tornar-se atrativo para o consumidor, vendendo-o a 59% do preço da gasolina. Isso foi possível em função do preço da gasolina ser estabilizado pelo Governo a valores de aproximadamente o dobro do preço dos USA (MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999).

Desde o início, a política de preços para o incentivo do uso do etanol como combustível baseava-se na indexação do preço do álcool ao da gasolina e na taxaçoão do preço desta, a fim de reduzir o preço de outros derivados de petróleo (como nafta e GLP) e cobrir os custos de produção de etanol. A justificativa para tal política de preços era o benefício para o meio ambiente e os resultados sociais do programa. Esta estratégia funcionou bem até que a Petrobrás começou a apresentar problemas devido ao aumento da demanda e à queda do suprimento do etanol, necessitando importar etanol a preços maiores do que o da gasolina, além dos custos de estocagem do etanol por seis meses, devido a entre safra. A maioria dos incentivos e subsídios para a produção de etanol foi diminuindo gradativamente até a sua extinção no início de 1998 (MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999).

A utilização de etanol combustível foi bem sucedida no país até o início da década de 90. Em meados da década de 80, cerca de 96% dos automóveis produzidos no país eram movidos a álcool (ZANIN *et al.*, 2000). A partir daí, iniciou-se uma queda na venda de carros. Diversos foram os motivos para essa queda, dentre os mais importantes foram destacados por MOREIRA & GOLDEMBERG (1996), como sendo: o fato de que o preço do etanol foi estabelecido em 64,5% do preço da gasolina em 1979, mais foi aumentado gradualmente até atingir 80%; o imposto

sobre produtos industrializados (IPI) para carros a álcool foi inicialmente fixado abaixo do valor cobrado sobre carros movidos a gasolina. Esta vantagem foi eliminada em 1990, quando o governo lançou o programa de carros populares, com motores de até 1000 cilindradas, para os quais o IPI foi fixado em 0,1%; a falta de confiança do suprimento contínuo de etanol.

Assim, as vendas de carros a álcool foram diminuindo significativamente, chegando à cerca de 1200 unidades no ano de 1998. Nos dois últimos anos, a produção de carros a álcool voltou a subir, alcançando 10.000 unidades por ano, devido ao retorno de incentivos por parte do governo, como por exemplo, os descontos no IPVA no estado de São Paulo. No entanto, quando se compara essa produção de carros a álcool com aquela da década de 80, esse valor ainda é pouco significativo.

Segundo dados da ALCO, 1997 (Associação de Produtores da Indústria do Alcool) para se tornar possível a produção de etanol atual no Brasil já foram investidos cerca de U\$ 11,7 bilhões. Esse investimento tornou possível evitar a importação de 220 mil barris de petróleo por dia, o que representa uma economia de divisas da ordem de US\$ 29 bilhões ao longo de 20 anos de existência do PROÁLCOOL, valor esse acrescido de U\$ 1,5 bilhão a cada ano. Os impactos positivos do Programa Nacional do Alcool, tanto para a proteção do meio ambiente, quanto para o mercado de açúcar, serão ainda mais significativos se outros países também optarem pela mistura do álcool à gasolina. O Brasil e os Estados Unidos, por exemplo, estabeleceram uma recente aliança para o desenvolvimento do uso de etanol em ambos os países.

Nas últimas duas décadas o custo da produção de etanol diminuiu progressivamente, conforme o esperado, uma vez que normalmente o aumento da demanda de um determinado produto leva à queda do seu preço, refletindo ainda um ganho devido ao progresso tecnológico e economias de escala. A partir de 1990 ocorre uma tendência à estagnação tanto do preço como da produção de etanol. Este comportamento pode ser interpretado como uma indicação de que do período inicial do programa, nos anos 70, até 1990 foi caracterizado por uma expansão da produção anual, com pouco desenvolvimento tecnológico, que constituía um dos objetivos do início do programa. Esse visava utilizar a estrutura existente para produção de açúcar, anexando-se a estas usinas para produção de etanol (ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998; MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999).

A expectativa do Programa era que o preço do etanol caísse até tornasse competitivo com a gasolina. No entanto, isso não ocorreu e, juntamente com outros fatos como o aumento do preço do açúcar no mercado internacional, mudanças políticas no país, queda nos preços do petróleo, fez com que o programa do álcool fracassasse.

Diversas alternativas têm sido propostas para se encontrar novas oportunidades econômicas para a produção de etanol. Destaca-se a co-produção de energia a partir do bagaço de cana, utilização do bagaço como matéria-prima para confecção de papelão, móveis e outros objetos, utilização de leveduras como ração animal e vários autores ainda propõem que a produção de etanol pode se tornar extremamente viável quando o etanol não for o único produto e sim um dos produtos do processo (WHEALS *et al.*, 1999; ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998; ZANIN *et al.*, 2000), que renderia também outros produtos de maior valor agregado.

3. EVOLUÇÃO TECNOLÓGICA NA PRODUÇÃO DE ETANOL

A fermentação alcoólica como qualquer outro processo passa por uma evolução natural. Essa teve seu início com o processo batelada passando pela batelada alimentada (Melle-Boinot) e finalizando com o processo contínuo.

3.1. PROCESSO BATELADA (CLÁSSICO)

Os processos de fermentação alcoólica convencionais, utilizando um novo inóculo a cada batelada ou ainda o "corte" foram amplamente utilizado pelas destilarias nacionais até o início dos anos 60 (DREWS, 1964). Nestes processos, o mosto a ser fermentado é inoculado por parte de uma dorna em estágio final de fermentação (corte) ou por uma cultura nova, recém ativada em laboratório. A fermentação é considerada concluída quando a cuba "morre", ou seja, quando cessa a atividade da levedura por falta de nutrientes ou por excesso de produto inibidor (etanol). Neste ponto o etanol é recuperado por destilação e o reator sanitizado para nova batelada.

Conforme MAIORELLA *et al.* (1981) o processo batelada é lento. O reator tem que ser limpo e preparado, o mosto e o inóculo carregado ao sistema a cada fermentação.

3.2. PROCESSO BATELADA ALIMENTADA OU MELLE-BOINOT

Segundo DREWS (1964), o processo clássico de batelada foi sendo rapidamente substituído pelo processo Melle-Boinot em meados dos anos 60. O processo se baseia na alimentação contínua e crescente do substrato à dorna (sem purga e até o volume máximo deste), seguindo a

curva de crescimento da massa celular e conseqüente taxa de consumo de substrato, de maneira que a concentrações de açúcares totais permaneçam constantes. Uma inovação do processo foi à utilização de um tratamento ácido (pH entre 2,5 e 4,5) do creme de leveduras, com a finalidade de eliminar contaminantes e utilização deste como inóculo para a próxima batelada.

ALMEIDA (1960) descreve as seguintes vantagens do processo Melle-Boinot: economia de açúcar devido a menor reprodução celular elevando o rendimento em etanol; eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho (separação de células de levedura); fermentação mais pura devido ao tratamento de leite de levedura (tratamento ácido); eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do pé-de-cuba, prática exigida no processo clássico, diminuindo portanto a complexidade das operações da planta.

3.3. PROCESSO CONTÍNUO

Com o esgotamento tecnológico do processo Melle-Boinot, a fermentação alcoólica contínua se firmou como uma alternativa industrialmente viável.

O interesse pela fermentação contínua no Brasil intensificou-se na década de 80, como forma de se reduzir os custos de produção, e, assim, com os novos processos desenvolvidos, atualmente vinhos com alto teor alcoólico são produzidos com fermentações de alta eficiência, de modo a reduzir o volume de vinhaça produzido e o consumo de vapor necessário (ZARPELON & ANDRIETTA, 1992).

A partir da metade da década de 80, os processos de fermentação alcoólicos contínuos vêm sendo cada vez mais utilizado em unidades

industriais Na safra de 1989, aproximadamente 30% do etanol foi produzido por processos contínuos ou semi-contínuos, número este que se elevou consideravelmente na safra 90/91. Dentre os motivos que contribuíram a este crescimento destacam-se os avanços tecnológicos obtidos nestes anos, que propiciaram o desenvolvimento de processos mais confiáveis sem tantos problemas operacionais e o aumento de produtividade destes quando comparados com o processo de fermentação Melle-Boinot (ANDRIETTA & STUPIELLO, 1990).

No processo contínuo tem-se uma alimentação e retirada contínua de mosto e vinho fermentado respectivamente. A levedura proveniente do tratamento ácido, que também é contínuo, é adicionada ao processo de forma contínua.

Este processo tem apresentado uma maior produtividade, com um aumento que às vezes pode atingir 100% em relação à batelada alimentada (RODRIGUES *et al.*, 1992).

GUERREIRO (1995) cita que o avanço tecnológico gerado pela adoção de técnicas modernas (cinética microbiana adequada, otimização, simulação de processos via computador e projetos específicos) aliados à fermentação contínua, pode trazer os seguintes benefícios: modernização da usina; aumento da produção; redução dos gastos de mão de obra; redução de gastos com análises; aumento de produtividade; redução de tempos não produtivos (carga, descarga, limpeza); trabalho em estado estacionário; redução de insumos; uniformidade do produto; maior controle operacional do processo.

4. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. *Saccharomyces cerevisiae*, que são as leveduras mais utilizadas na produção de etanol, apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), onde a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula.

A levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. Se o homem pretende beneficiar-se dessa habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições ideais para que as mesmas trabalhem a seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol. A célula de levedura possui compartimentos para adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração), se dá na mitocôndria (AMORIM *et al.*, 1996).

Existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de levedura. O primeiro denominado glicólise tem a função de “quebrar” a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Na ausência de oxigênio há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. A equação de Gay-Lussac faz um

balanço desta etapa. Porém, na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krébs, onde este será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água. O balanço global dos dois ciclos pode ser resumido pela equação de Gay Lussac:



A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180g) produz 2 moles de etanol (92g), 2 moles de dióxido de carbono (88g) e 57 kcal de energia. Assim, o rendimento teórico ($Y_{P/S}$) para a produção de etanol é de 0,511 g/g. Na prática este valor não é observado devido à utilização de parte da glicose para produção de glicerol e álcoois superiores, síntese de material celular e manutenção da levedura.

Além da presença ou ausência de oxigênio, a disponibilidade de açúcar pode afetar o metabolismo das leveduras. OKADA *et al.* (1981) cita o efeito Crabtree, que é o incremento na produção de etanol em concentrações de glicose superiores a 0,5-1,0 g/l (independentemente da concentração de oxigênio) como prejudicial ao processo de produção de leveduras de panificação, pois parte do açúcar disponível é convertida a etanol e dióxido de carbono em detrimento à biomassa, reduzindo o rendimento. Em contrapartida, o efeito Pauster, citado por CARVALHO (1996), prediz um elevado rendimento celular em condições de aerobiose e concentração de glicose inferior a 1,5 g/l.

Assim, frente ao número elevado de reações catalisadas enzimaticamente no metabolismo celular, fatores como pH, temperatura, pressão, concentração de reagentes, concentração de micronutrientes, etc., afetam os parâmetros cinéticos que definem as taxas de reprodução celular, consumo de substrato e produção de etanol.

5. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL

Em escala industrial, incontestavelmente, as leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, têm sido largamente utilizadas para produção de álcool. Representantes desse gênero são os microrganismos que mais apresentam características favoráveis para transformar açúcares em etanol.

Entretanto outros microrganismos têm sido objeto de estudo para serem utilizados como produtores de álcool. Entre eles estão incluídos tanto outros gêneros de leveduras como bactérias.

CRUZ & BORZANI (1980) resumiram as principais características das bactérias do gênero *Zymomonas*: fermentam vigorosamente a glicose e a frutose com formação de etanol e CO₂; crescimento em uma faixa ótima de pH 4,5-6,5; temperatura favorável de crescimento entre 25° e 31°C, ideal a 30°C; anaeróbias facultativas, suportando um certo grau de aerobiose na presença de açúcares fermentescíveis.

TAKAHASHI *et al.* (1994) produziram etanol a partir da fermentação de pentoses e hexoses, usando *Escherichia coli* modificada com o gene de *Zymomonas mobilis*. Produziram 42,5 g/l de etanol usando um meio contendo 5 g/l de glicose, 80 g/l de xilose e 5 g/l de arabinose em batelada de 96 horas.

RODRIGUEZ *et al.* (1995), usaram o microrganismo *Zymomonas mobilis* PRO 910, isolada do caldo de cana e obtiveram uma concentração máxima de etanol igual a 106 g/l.

DOMINGUEZ *et al.* (1993) usaram a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, para fermentar D-xilose, em regime contínuo.

LAPLACE *et al.* (1993) desenvolveram um processo de co-fermentação alcoólica usando um mutante de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1200 e *Candida shehatae* ATCC 22984 em processos batelada e contínuo, fermentando uma mistura de glicose e xilose. Quando os microrganismos foram co-cultivados continuamente, obtiveram consumo de glicose e xilose 100% e 27% respectivamente. Quando o mutante *S. cerevisiae* foi cultivado com *Pichia stipitis* NRRL Y11545, o consumo de glicose e xilose foi 100% e 69% respectivamente. Obtiveram 0,42 g etanol/g açúcar.

5.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS EM PROCESSOS INDUSTRIAIS

Apesar dos esforços visando a utilização de outros microrganismos para obtenção de etanol, para as condições das destilarias brasileiras, a utilização de levedura *Saccharomyces cerevisiae* continua sendo a mais adequada, pois por se tratar de processos não estéreis, necessita-se de um microrganismo “robusto”, capaz de suportar condições drásticas.

A prática freqüente nas destilarias é de se iniciar o processo fermentativo com uma determinada levedura, seja pela tradição de seu uso, como *Saccharomyces cerevisiae*, pela facilidade de obtenção em grandes quantidades, como as leveduras de panificação, ou ainda, pelo fato da mesma ter sido obtida através de melhoramento genético para se melhor adequar às necessidades do processo industrial (AMORIM *et al.*, 1996).

De acordo com ANDRIETTA *et al.* (1997), com a evolução nas técnicas de identificação de leveduras constatou-se que as leveduras presentes nas dornas de fermentação alcoólica são as leveduras chamadas selvagens e que na maioria das vezes não acarretam problemas ao processo. Essas leveduras são microrganismos que habitam naturalmente a cana-de-

açúcar e, portanto, são adaptadas ao substrato de alimentação da dorna. Entre elas estão leveduras que embora sejam habitantes naturais do caldo não tem características que as façam sobreviver ao ambiente “rústico” da dorna. Essas são eliminadas naturalmente do processo, permanecendo no mesmo somente em casos onde houver uma “armadilha” que favoreça a sua permanência, como no caso em que uma levedura não apta a viver no ambiente da fermentação fica presa na espuma enquanto o vinho fermentado, é retirado da dorna.

Caso uma levedura isolada no período final de safra seja diferente daquela introduzida no início, deve-se analisar os seus aspectos bioquímicos e microbiológicos e verificar as suas peculiaridades que permitiram seu domínio sobre outras populações (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995). Segundo esses mesmos autores, se esta levedura possuir uma boa capacidade fermentativa, sendo benéfica ao processo, a mesma será considerada a mais adequada para iniciar o processo na próxima safra.

6. FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

6.1. PH

O pH é um fator significativo para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (AMORIM *et al.*, 1996).

Os valores de pH dos mostos industriais geralmente encontram-se na faixa de 4,5 a 5,5 com uma boa capacidade tampão, mas as leveduras

mantêm uma homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio, por isso toleram o tratamento ácido. O tratamento ácido também provoca lixiviação de nutrientes tais como N, P e K da levedura que acaba por elevar o pH. Embora o tratamento ácido se mostre estressante à levedura, ainda apresenta efeito benéfico de controlar a contaminação bacteriana, pois ocorre a redução significativa no número de bactérias (AMORIM *et al.*, 1996).

O pH ótimo para a produção de etanol por leveduras de *Sacharomyces cerevisiae* situa-se, geralmente, na faixa de 4 a 5. Aumentando-se o pH até 7, observa-se, via de regra, uma diminuição do rendimento em etanol, com aumento da produção de ácido acético, segundo Kim & Kim, citados por MAIA (1989).

Segundo Blanchet & Ballerini, citados por MAIA (1989), o pH interno da célula se mantém na faixa de 5,8 a 6,9, seja qual for o pH extracelular na faixa de 2 a 7. Entretanto, baixos valores de pH tornam o meio mais agressivo, uma vez que exigem das leveduras um maior dispêndio de energia na manutenção do pH interno, além de afetar as proteínas de transporte da membrana citoplasmática que ficam expostas ao meio externo. O pH do meio externo também afeta a velocidade de crescimento das leveduras, a qual atinge um máximo quando o pH está compreendido entre 5 e 6. Na fermentação alcoólica, o estabelecimento e controle do pH do meio em valores inferiores a 5 é também considerado importante como meio para prevenir contaminação por bactérias lácticas e acéticas.

Segundo AMORIM *et al.* (1996), na indústria, quando se usa melaço esgotado, o pH no final da fermentação se eleva acima de 4 acarretando em um aumento na floculação do fermento além de propiciar uma aumento significativo na infecção.

6.2. TEMPERATURA

Na indústria, a temperatura do mosto é um fator crítico no processo fermentativo. Se a temperatura for baixa (abaixo de 27-26°C), a fermentação não desenvolve devido ao choque térmico, o que é resolvido alimentando-se a dorna com mosto mais quente. Uma outra solução é cortar uma dorna em fermentação para dorna problema até que a referida dorna reaja. Já o mosto quente, acima de 28-29°C, pode acarretar um superaquecimento nas dornas em fermentação, propiciando um aumento da temperatura do vinho e conseqüentemente uma diminuição no rendimento (AMORIM *et al.*, 1996).

Um fator extremamente importante, correlacionado com a temperatura do mosto é a contaminação bacteriana. Quanto maior a temperatura maior a possibilidade do crescimento de contaminantes (AMORIM *et al.*, 1996).

Segundo Blanchet & Ballerini, citados por MAIA (1989), a temperatura ótima de crescimento das leveduras é, geralmente, inferior à temperatura ótima para produção de etanol. A fermentação alcoólica geralmente é conduzida em torno de 30°C, quando se pretende maximizar a produtividade em etanol. No entanto, no caso do Brasil, sabe-se que as usinas trabalham, em função das condições climáticas e operacionais do nosso país, em temperaturas maiores que esta.

Sabe-se que a temperatura ótima de fermentação é uma função que depende do conteúdo em etanol do meio, tendendo a diminuir com o aumento do teor alcoólico. Portanto, teoricamente a otimização de um processo de fermentação com relação à temperatura requer uma redução da temperatura do processo, à medida que o etanol é produzido. A temperatura de fermentação também influencia a fluidez na membrana

citoplasmática e a atividade das enzimas, alterando a permeabilidade na membrana e o metabolismo das células.

O efeito inibidor do etanol está intimamente relacionado à temperatura da fermentação. Segundo SÁ-CORREIA & VAN UDEN (1983), a faixa de melhor resistência ao etanol para cepas usuais de *Saccharomyces cerevisiae* é de 13 a 27°C a 11% (v/v) de etanol. A tolerância ao álcool diminui para temperaturas mais baixas que 13°C ou mais altas que 27°C, de forma que a inibição do crescimento do microrganismo ocorre tanto em processos à baixa temperatura (cervejas, champanhes), como em processos à alta temperatura (álcool combustível, vinhos tintos).

De acordo com VAN UDEN (1985) existem três temperaturas chaves de um processo de crescimento de leveduras: T_{maxi} (temperatura máxima inicial de crescimento), T_{maxf} (temperatura máxima final de crescimento) e T_{opt} (temperatura ótima de crescimento). O aumento da concentração alcoólica ao longo da fermentação provoca uma diminuição das 3 temperaturas. Quando T_{maxf} se iguala a temperatura do processo, o crescimento celular torna-se nulo.

6.3. SUBSTRATO

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar entre outros açúcares, os que compõem a cana-de-açúcar, que são basicamente a glicose a frutose, e a sacarose. O substrato utilizado para produção industrial, que pode ser tanto caldo de cana como esse acrescido do mel proveniente da produção de açúcar, contém além de açúcares outros compostos que podem atuar como fator de inibição. Altas concentrações

de açúcares (maior que 150g/l) também exercem ação inibitória sobre a fermentação alcoólica.

6.4. OXIGÊNIO

A fermentação alcoólica é inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, fenômeno este denominado “Efeito Pasteur”. Este efeito está intimamente associado ao estado fisiológico da célula, sendo que se manifesta principalmente nas leveduras que não estão na fase de crescimento (fase estacionária) nas quais ocorre nítida diminuição do consumo específico de glicose. Nas células em crescimento (fase exponencial), por outro lado, não se observa diferença significativa quanto à velocidade de consumo da glicose entre uma célula aeróbia e outra anaeróbia.

Segundo Hoppe & Hansford citados por MAIA (1989), o uso de condições microaeróbicas (0,5% de saturação) permite aumentar a utilização do substrato, aumentando a tolerância da levedura ao etanol, sem haver um decréscimo significativo no rendimento em etanol por unidade de substrato consumido. Tal fato está relacionado à síntese de ácidos insaturados constituintes da membrana celular, que depende da disponibilidade de oxigênio. Além de indispensáveis à viabilidade celular, os ácidos graxos insaturados e esteróis aumentam a permeabilidade da membrana ao etanol.

6.5. ETANOL

O etanol foi a primeira substância a ser reconhecido como inibidor da fermentação alcoólica. As leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces* são consideradas as de melhor resistência ao efeito tóxico do etanol. Este efeito é considerado resultante de vários aspectos: os mecanismos inibidores de base, a presença ou não de outros inibidores, composição do meio, pressão parcial em oxigênio, temperatura, natureza da cepa e condições de cultura (batelada ou contínua).

Os fatores que influenciam a sensibilidade ao etanol (temperatura, aeração, composição do meio) agem direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática. Entretanto, o etanol parece não ter um efeito único, provocando modificações nas propriedades da membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e agindo sobre algumas enzimas.

HOLZBERG *et al.* (1967) demonstraram que o crescimento celular não é inibido em concentrações de etanol inferiores a 26 g/l, mas é inibido totalmente quando a concentração de etanol atinge 68,5 g/l no meio da fermentação. LUONG (1984) observou que o etanol apresentava um efeito significativo sobre a velocidade de crescimento celular a concentrações acima de 15 g/l e que a concentração de etanol máxima a partir da qual as células não mais cresciam (P_m) era aproximadamente 100 g/l. Esse mesmo autor também verificou que a capacidade de produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* era completamente inibida a uma concentração de etanol de 105 g/l. DAUGULIS & SWAINE (1987) fornecem valores relatados na literatura para P_m de 87,5 a 140 g etanol/l, para sistemas utilizando diversas linhagens de leveduras. A

análise desses valores deve ser cuidadosa, entretanto, uma vez que eles dependem do tipo de microrganismo, do seu estado fisiológico, do meio de cultura e da temperatura.

6.6. VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular é sem dúvida um aspecto importante no controle da fermentação alcoólica. Quanto maior esse número melhor será o desempenho do processo. Como o ambiente das dornas de fermentação não é propriamente ideal para manutenção da viabilidade celular um controle minucioso deve ser feito pelas unidades produtoras.

CYSEWSKI & WILKE (1977) observaram que a viabilidade celular diminui continuamente em anaerobiose, mas permanece acima de 95% em aerobiose num sistema de fermentação a vácuo. As leveduras utilizam o oxigênio para produzir ácidos graxos polisaturados e seus precursores, compostos necessários para a biosíntese de lipídeos constituintes das membranas plasmáticas e mitocondriais. A adição ao meio de cultura de ácidos graxos insaturados ou esteróis melhora a tolerância das leveduras ao etanol e, assim, aumenta a viabilidade celular.

Aumentos da temperatura de fermentação produzem uma forte diminuição da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de etanol no meio e nas células. Em trabalho recente, MILANESE-RUBILAR & MAUGERI (1990) verificaram que a viabilidade celular dependia da concentração de etanol e do tempo de residência celular, segundo a expressão:

$$X_v = \frac{e^{[-A(t_c \cdot P)]^m}}{P_m - P}$$

onde: X_v é a fração viável, t_c o tempo de residência celular.

A e m constantes empíricas

JARZEBSKI *et al.*, (1989) verificaram a importância da viabilidade celular na cinética da fermentação alcoólica e incorporaram este conceito a um modelo intrínseco tipo Monod, que é mostrado na equação abaixo:

$$r_x = \mu_{\max} \cdot [1 - (P/P_m)^n] \cdot [1 - (X_t/X_m)^m] \cdot S \cdot X_v / K_s + S$$

onde: X_v é concentração de células viáveis e X_t é concentração total de células ($X_t = X_d + X_v$), sendo X_d a concentração de células mortas.

6.7. CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

A contaminação bacteriana é um dos fatores preponderantes dentre aqueles que afetam a fermentação alcoólica, posto que é o mais freqüente agente estressante presente. Trabalhos efetuados em laboratório e os dados da indústria são coincidentes quanto ao prejuízo que a contaminação pode exercer no rendimento da fermentação (AMORIM *et al.*, 1996).

O problema da contaminação poderia não existir se a fermentação fosse feita sob condições estéreis, porém devido sua magnitude é economicamente inviável. O custo energético para esterilização influencia negativamente no custo final do produto. (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

A cana-de-açúcar traz consigo contaminantes que são habitantes naturais da própria planta, do solo, da matéria orgânica em decomposição e microrganismos associados às pragas e moléstias da planta. O número de microrganismos presentes na planta varia bastante, encontrando-se entre 10^4 a 10^8 bactérias e 10^3 a 10^4 fungos por grama de colmo. LIMA *et al.* (1974) estudaram a contagem de leveduras em usina de açúcar, verificando que o caldo da cana e caldo misto apresentaram contagem média de 10^4 UFC/ml, fato este explicável quando se leva em conta a contaminação que acostuma acompanhar a cana no campo. Entre as espécies encontradas destacam-se as bactérias gram-negativas do gênero *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*; as bactérias gram-positivas do gênero *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*; bactérias filamentosas do gênero *Streptomyces* e *Actinomyces* e as leveduras e bolores como *Saccharomyces*, *Torula*, *Pichia*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (YOKOYA, 1991).

CLARKE *et al.*, (1980), verificaram que a cana que sofre corte na colheita ou é danificada durante a queimada, ou até mesmo a cana congelada, são particularmente mais susceptíveis ao crescimento de bactérias e leveduras. Esses organismos, mais notáveis são as espécies de *Saccharomyces* e *Clostridium thermosaccharolyticum*, porque são encontrados em produtos finais no processo do açúcar.

BRUJIN (1966) estudou a influência do tempo de estocagem da cana no grau de acidez desta, verificando que quanto maior o tempo, maior a acidez devido à deterioração microbiana.

A cana-de-açúcar é um ótimo substrato para o crescimento de microrganismos devido aos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, pH e temperatura favorável necessitando, portanto uma etapa de lavagem

antes da moagem com o propósito de diminuir os resíduos do solo e conseqüentemente a carga microbiana (SILVA, 1974). Apesar da assepsia nos equipamentos como moendas, caixas, peneiras, tubulações, ocorre sempre a existência de focos de crescimento de microrganismos (BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR, 1983).

Após a extração, o caldo de cana sofre a calagem ou sulfitação seguido de um tratamento térmico, que permite uma redução substancial no número de microrganismos, porém não total. O caldo tratado apresenta contagem sempre inferior a 5×10^6 microrganismos/ml (BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR, 1983). O efeito maior das bactérias na levedura e no rendimento da fermentação é físico. As bactérias se unem com as leveduras provocando floculação, que vão ao fundo da dorna, provocando na centrifugação entupimento de bicos, canalizações e sempre ocorre muita perda de levedura, o que faz o rendimento cair (AMORIM *et al.*, 1996).

Às vezes é necessário optar entre dois fatores estressantes, como caso do tratamento ácido, que exerce um efeito estressante à levedura, mas acaba por ser benéfica por controlar a contaminação, esta sim muito mais prejudicial à levedura e ao processo, reduzindo a eficiência fermentativa (AMORIM *et al.*, 1996).

Fatores como as altas temperaturas são duplamente prejudiciais, pois além do efeito deletério sobre a levedura, propicia um aumento na contaminação bacteriana. Onde há aumento de bactérias, via de regra, há aumentos significativos na formação dos ácidos lácticos e às vezes de acético. Como o ácido láctico é um produto bacteriano, ele pode ser considerado um indicador mais preciso da contaminação, pois reflete a atividade metabólica desses microrganismos, mesmo que a toxidez

bacteriana seja exercida por outros componentes mais complexos que o ácido. O ácido acético, como sendo também um produto da levedura, pode até ter sua formação diminuída, mesmo com o aumento da contaminação bacteriana (AMORIM *et al.*, 1996).

Como as bactérias são morfologicamente e fisiologicamente distintas das leveduras, existem alguns antimicrobianos que são usados para o controle das bactérias, os quais minimizam os danos causados por essas bactérias sobre a fermentação.

7. BIBLIOGRAFIA

ALCO -Associação de Produtores da Indústria do Alcool - 1997, in:
<http://www.alco.com.br>

ALMEIDA, J.L. Processo de recuperação de leveduras ou processo Melle Boinot. In: *Semana da Fermentação Alcoólica*, 1, Piracicaba, 1960, Anais, p. 254-262.

AMORIM, H.V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. *Processo de produção de álcool - controle e monitoramento*. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A. *Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar*. FERMETNEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996.

ANDRIETTA, S.R. & STUPIELLO, J.P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica (II) contínua. *STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos*. 9: 45-51, 1990.

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v. 15, n.6, p.32-35, 1997.

BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR. *Controle Microbiológico na fabricação de açúcar e álcool*. 22, 2-17, 1983.

BRUIJN, J. Deterioration of sugar cane after harvesting. Part I. Change in juice composition. *The International Sugar Journal*. Vol LXVIII, p.331-334, 1966.

CARVALHO, B.S. *Efeito da temperatura na cinética de morte celular e em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 1996. (Tese Mestrado)

CLARKE, M. A.; ROBERTS E. J.; GODSHALL, M. A.; BRANNAN, M. A.; CARPENTER, F. J.; COLL, E. E. Sucrose loss in the manufacture of cane sugar. *Sugar y Azucar*. 75 (9), p. 64-68, 1980.

CYSEWSKY, G.R.; WILKE, C.R. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.*, 1, p. 1125-1143, 1977.

DAUGULIS, A. J. & SWAINE, D. E. Examination of Substrate and Product Inhibition Kinetics on the Production of Ethanol by Suspended and Immobilized Cell Reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, v.29, p. 639-645, 1987.

DREWS, W. A fermentação do melaço de cana de açúcar no brasil. In: *SIMPÓSIO DE FERMENTAÇÃO*, 1., São Paulo, 1964. Anais. p.213-222.

DOMINGUEZ H.; NUNEZ, M.J.; CHAMY, R.; LEMA, J.M. Determination of Kinetic Parameters of Fermentation Process by a Continuous Unsteady-

State Method: Application to the Alcoholic Fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis*. *Biotech. Bioeng.*, 41, 11., p 1129-32, 1993.

GUERREIRO, M.A. *Desenvolvimento de um sistema especialista para o projeto de unidades industriais de produção de álcool*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995 (Tese Mestrado).

HOLZBERG, I.; FINN, R.K.; STEINKRAUS, K.H. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. *Biotechnol. Bioeng.*, v.9, p.413-427, 1967.

JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J.J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. *Biotechnol. Bioeng.*, v.34, p.1225-30, 1989.

JORNAL DA CANA (1999), April. <http://www.jornalcana.com.br>

LAPLACE, J.M.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M.J. Confermentation of Glucose and Xylose to Ethanol by a Respiratory-Deficient Mutante of *Saccharomyces cerevisiae* Co-cultivated with a Xylose-Fermenting Yeast. *Fermentation Bioeng.*, 75 (3), p. 207-12, 1993.

LIMA, U. A.; GOLDONI, J.S.; CEREDA, M. P.; SOUZA, L. G. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. *Brasil Açucareiro* (4) 337-343, 1974.

LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, v.27, p.280-285, 1984.

MAIA, A.B.R.A. *Fundamentos de Fermentação Alcoólica*. Apostila do Curso de Engenharia Química. Belo Horizonte:UFMG, 1989.

MAIORELLA, B.L., BLANCH, H.W., WILKE, C.R. Alcohol production and recovery. In: flechter, A. *Advances in biochemical engineering*. Heildeberg: Spring Verlag, 1981. V.20, p.41-73.

MILANESE-RUBILAR, A.A. & MAUGERI, F.F. Modeling alcohol production and cell viability in a cascade reactor with immobilized cells. *Ver. Microbiol.* V.21, p.79-84, 1990.

MOREIRA, J.R., GOLDEMBERG, J., 1996, The Alcohol Program, USP/IEE, <http://www.mct.gov.br>

MOREIRA, J.R., GOLDEMBERG, J., The Alcohol Program. *Energy Policy*, v27, p.229-245, 1999

OKADA, W.; FUKUDA, H.; MORIKAWA, H. Kinetic expressions of ethanol production rate and ethanol consumption rate in baker's yeast cultivation. *J. Ferment. Technol.*, 59:103-109, 1981.

PARANÁ AÇÚCAR & ÁLCOOL, vol.3 (35)

RODRIGUES, M.I.; ANDRIETTA, S.R.; MAUGERI, F.F. Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores em fermentação alcoólica contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*. 10 (5): 35-47, 1992.

RODRIGUEZ E.; GARRO, O. A.; PALACIOS UNDA R., CALLIERI D.A.S. Mathematical Modeling of the alcoholic Fermentation of Glucose by *Zymomonas mobilis* . *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 63, 4, pp 367-73, 1995.

RODRIGUES, M. I. & ANDRIETTA, M. G. S. *Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicos*. Campinas.

Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, 1995. 54p. (curso de extensão).

ROSSILO-CALLE, F., CORTEZ, L.A.B., "Towards Proalcohol II – A review of Brazilian bioethanol programme", *Biomass and Bioenergy*, v.14, n.2, p.115-124, 1998

SÁ-CORREIA, I. & VAN UDEN, N. Temperature Profiles of Ethanol Tolerance: Effectes of Ethanol on the Minimum and Maximum Temperatures for Growth of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.25, p. 1665, 1983.

SILVA, M. H. Control de inversión en el jugo del molino. *Sugar y Azucar*, 68 (8): 41-43, 1974.

TAKAHASHI, D.F.; CARVALHO, M.L.; ALTERTHUM, F. Ethanol production from pentoses and hexoses by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, v. 16(7), p.747-750, 1995.

VAN UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Annual Reports on Fermentation Processes*, New York, v.8, p.11-58, 1985.

YOKOYA, F. Problemas em Contaminantes na fermentação alcoólica. STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos. V 1, p.38-39, 1991.

WHEALS, A.E., BASSO, L.C., ALVES, D.M.G., AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years", *Trends in Biotechnology*, v.17, n.12, p.482-487, 1999.

ZANIN, G.M., SANTANA, C.C., BOM, E.P.S., GIORDANO, R.C.L., MORAES, F.F., ANDRIETTA, S.R., CARVALHO, C.C.N., MACEDO, I.C., FO, D.L., RAMOS, L.P., FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program.

Applied Biochemistry and Biotechnology, v.84-86, p.1147-1161, Spring 2000.

ZARPELLON, F. & ANDRIETTA, S.R. Fermentação contínua para produção de álcool. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos*, 10 (4): 23-28, 1992.

CAPÍTULO 2

CEPAS ESTUDADAS

ÍNDICE

Objetivo	35
1. Introdução	35
2. Linhagens	38
CEPA 1 - Alvorada	38
CEPA 2 - Unialco	39
CEPA 3 - Diamante	40
CEPA 4 - Diana	41
CEPA 5 - Jalles Machado	42
CEPA 6 - Junqueira	43
CEPA 7 - Goiasa	44
CEPA 8 - Vale do Rosário	45
CEPA 9 - Bonfim	46
CEPA 10 - Costa Pinto	47
CEPA 11 - Guarani	48
CEPA 12 - Andrade	49
CEPA 13 - Dacal	50
CEPA 14 - Dacalda	51
CEPA 15 - Alcoeste	51
CEPA 16 - Corol	52
CEPA 17 - Mauri	53
CEPA 18 - Mauri	53
CEPA 19 - Barra Grande	54
CEPA 20 - Santa Cruz	55
CEPA 21 - Clealco	56
3. BIBLIOGRAFIA	57

OBJETIVO

NESTE CAPÍTULO SERÃO APRESENTADAS AS 21 UNIDADES E EM QUE PERÍODO AS CEPAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO FORAM ISOLADAS. SERÁ DESCRITO UM MEMORIAL DE CADA UNIDADE CONTENDO O NOME, A LOCALIZAÇÃO, TIPO E DESCRIÇÃO DO PROCESSO.

1. INTRODUÇÃO

O desempenho do processo fermentativo é bastante afetado pelo tipo de levedura que o desenvolve. A contaminação por leveduras nas dornas de fermentação tem merecido cuidadosa atenção em usinas e vêm se pesquisando seu efeito no processo e as formas de eliminar a sua interferência.

É uma prática muito freqüente nas destilarias se iniciar o processo fermentativo com uma determinada levedura, seja pela tradição de seu uso, como *Saccharomyces cerevisae*, pela facilidade de obtenção em grandes quantidades, como as leveduras de panificação *Saccharomyces cerevisae* Fleischmann ou Itaiquara, ou seja pelo fato da mesma ter sido obtida através de melhoramento genético para se melhor adequar às necessidades do processo industrial (AMORIM *et al.*, 1996).

Leveduras contaminantes ou "selvagens" podem ser definidas como organismos que produzem mudanças indesejáveis em alimentos ou processos fermentativos. São responsáveis pela variação do rendimento em vinícolas e cervejarias, devido às suas propriedades bioquímicas que causam problemas no sabor, cor e turbidez do produto final (PHAFF *et al.*, 1966).

Em uma usina, pode acontecer uma diminuição no rendimento do produto durante o processo, sem se saber o motivo. A detecção de leveduras ao longo do processo e a sua caracterização fermentativa será importante neste caso, pois fornecerá subsídios para verificar se a diminuição do rendimento é devido à contaminação ou à falhas de operação, ou má qualidade da matéria-prima (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

Pode ocorrer ainda que no período final de uma safra ao se isolar a levedura do processo verifica-se que esta é diferente daquela introduzida no início. No entanto, se ela tiver uma boa capacidade fermentativa, sendo assim benéfica ao processo, ela será considerada a mais adequada ao processo para a próxima safra. Neste caso, analisa-se o seu aspecto bioquímico e microbiológico e verificam-se as suas peculiaridades que permitiram seu domínio sobre outras populações (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

De acordo com ANDRIETTA *et al.* (1997), com a evolução nas técnicas de identificação de leveduras constatou-se que as leveduras presentes nas dornas de fermentação alcoólica são as leveduras chamadas selvagens e que na maioria das vezes não acarretam problemas ao processo. Essas leveduras são microrganismos que habitam naturalmente a cana-de-açúcar e portanto, são adaptadas ao substrato de alimentação da dorna. Entre elas estão leveduras que embora sejam habitantes naturais do caldo não tem características que as façam sobreviver ao ambiente "rústico" da dorna. Essas são eliminadas naturalmente do processo, permanecendo no mesmo somente em casos onde houver uma "armadilha" que favoreça a sua permanência.

ANDRIETTA *et al.* (1997) relata ainda que as técnicas tradicionais de identificação de microrganismos são capazes de fornecer gênero e espécie das leveduras e que estas técnicas embora sejam de grande importância não fornecem os parâmetros de interesse industrial. Em

função desta limitação foi desenvolvida uma nova técnica, denominada "Potencial Fermentativo", que permite determinar de forma comparativa, se uma cepa testada é similar a outras e ainda é capaz de fornecer informações sobre o seu comportamento fermentativo.

Algumas leveduras apresentam o fenômeno da floculação, o qual é definido como a habilidade das células de se agregarem espontaneamente e formar flocos que sedimentam rapidamente no meio de cultura. A característica de agregação de algumas linhagens de *S. cerevisiae* é determinada por fatores genéticos, como evidência de que o DNA mitocondrial tem influência na expressão de floculação (SOARES *et al.*, 1991). Esses mesmos autores citam que não há consenso de opinião a respeito dos mecanismos que envolvem a floculação. Muitos mecanismos foram propostos: uma ponte de cálcio entre grupos aniônicos na superfície de adjacência das células, e uma teoria que envolve uma específica proteína, ligada a α -manano na superfície das células, e usando Ca^{+2} para assegurar a correta configuração da proteína. Fatores ambientais também influenciam a habilidade da floculação. A concentração de glicose alta e a baixa aeração são fatores que auxiliam o fenômeno da floculação.

GUINARD & LEWIS (1993), apontam que a floculação na fermentação tem importantes conseqüências econômicas porque prejudica a adequada mistura no mosto e reduz a capacidade de fermentação das células.

Em usinas alcooleiras, segundo TAVARES (1992), leveduras floculantes, quando atingem proporções elevadas, ocasionam problemas operacionais como a decantação do fermento original, com entupimento dos bicos de centrífugas e maior formação de espumas, comprometendo a produção.

2. LINHAGENS

Para este trabalho foram utilizadas 19 Cepas de diferentes usinas e regiões do País, sendo que o processo de fermentação também difere. Foram estudadas ainda as características de 2 cepas proveniente da indústria de panificação.

Essas cepas fazem parte do Banco de Cepas do Laboratório de Biotecnologia e Processo do CPQBA/UNICAMP.

Segue abaixo as características das unidades fermentativas industriais das quais foram isoladas as cepas utilizadas neste trabalho.

CEPA 1 - ALVORADA

Identificação: AL 1997

Safra da coleta: 1997

Unidade: USINA ALVORADA AÇÚCAR E ÁLCOOL LTDA.

Localização: Rod. BR 153 Km 03 Setor Rural – Araporã/MG

Tipo de Processo: Fermentação contínua

Descrição do Processo: Sistema constituído de uma linha de fermentação com 5 reatores bem agitados ligados em série. Trocadores de calor externo tipo placa.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	39 °C
	Mínima	34°C
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,5 GL

Concentração de célula:	Média	22 %v/v
Tratamento ácido:	pH	2,2
Tempo tratamento:	1,60 h	
Produção de levedura seca:	Média	4.000 kg / dia

CEPA 2 - UNIALCO

Identificação: UM 12/97

Safra da coleta: 1997

Unidade: UNIALCO S.A. ÁLCOOL E AÇÚCAR

Localização: Est. Vicinal Ângelo Zancaner Km 30 – Guararapes/SP

Tipo de Processo: Batelada-alimentada convencional

Descrição do Processo: O sistema é constituído por 10 dornas de 300.000 litros com trocador externo compartilhados para duas dornas

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	37 °C
	Mínima	34°C
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,0 GL
Concentração de célula:	Média	10 %v/v
Tratamento ácido:	pH	2,5

Tempo tratamento: 2,0 h

Produção de levedura seca: não produz

CEPA 3 - DIAMANTE

Identificação: DA 10/97

Safra da coleta: 1997

Unidade: IRMÃOS FRANCESCHI LTDA. – AGR. IND. E COM.

Localização: Fazenda São José – Jaú/SP

Tipo de Processo: Fermentação contínua

Descrição do Processo: Constituído de 4 reatores de fundo plano, ligados em séries com trocadores de calor externo.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	37 °C
	Mínima	34°C

Concentração de etanol no vinho:	Médio	7,5 GL
---	-------	--------

Concentração de célula:	Média	12 %v/v
--------------------------------	-------	---------

Tratamento ácido:	pH	2,0
--------------------------	----	-----

Tempo tratamento:	1,0 h
--------------------------	-------

Produção de levedura seca:	Média	2.000 kg/dia
-----------------------------------	-------	--------------

CEPA 4 - DIANA**Identificação:** DI 04/95**Safra da coleta:** 1995**Unidade:** DIANA DEST. DE ÁLC. NOVA AVANHANDAVA LTDA.**Localização:** Fazenda Nova Recreio Farelo – Avanhandava/SP**Tipo de Processo:** Fermentação contínua

Descrição do Processo: Sistema constituído de 2 reatores tipo torre de 200 m³ ligados em série e um tanque final com agitação mecânica de 150 m³. Possuem trocadores de calor externo tipo placa e unidade de separação de células por decantação.

Matéria Prima: Caldo de cana tratado

Temperatura de operação:	Média	37 °C
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,5 GL
Concentração de célula:	Média	45 %v/v
Tratamento ácido:	pH	3,0
Tempo tratamento:	1,2 h	
Produção de levedura seca:	Média	2.500 kg/dia

CEPA 5 – JALLES MACHADO**Identificação:** JM 06/97**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** JALLES MACHADO S.A. AÇÚCAR E ALCOOL**Localização:** Rod. GO 0880 Km 71,5 Zona Rura – Goianésia/GO**Tipo de Processo:** Processo Contínuo

Descrição do Processo: Processo contínuo adaptado de processo batelada existente. Possui 4 estágios de fermentação, sendo que o primeiro é constituído por 3 dornas ligadas em paralelo Possui trocadores de calor externos do tipo placa.

Matéria Prima: Mistura de caldo filtrado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Média	35°C
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,0 GL
Concentração de célula:	Média	20 %v/v
Tratamento ácido:	pH	2,3
Tempo tratamento:	2,0 h	
Produção de levedura seca:	Média	1.500 kg/dia

CEPA 6 - JUNQUEIRA**Identificação:** JU 01/97**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** FUNDAÇÃO SINHÁ JUNQUEIRA**Localização:** Igarapava/SP**Tipo de Processo:** Fermentação Contínua

Descrição do Processo: Constituído de 4 estágio de fermentação, sendo o primeiro formado por duas dornas de fermentação de 1.200 m³ cada. As dornas possuem trocadores externos e sistema de agitação por bicos ejetores.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	35,0
	Mínima	33,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	7,0 GL
Concentração de célula:	Média	16 %v/v
Tratamento ácido:	pH	2,5
Tempo tratamento:	2,0 h	
Produção de levedura seca:	não produz	

CEPA 7 - GOIASA**Identificação:** GO 11/97**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** GOIASA – GOIATUBA ÁLCOOL LTDA.**Localização:** Rod. GO 320 Km 51 Zona Rural – Goiatuba/GO**Tipo de Processo:** Batelada-alimentada convencional**Descrição do Processo:** Processo batelada alimentada constituído por 10 dornas de 300.000 L cada e três cubas de 100.000 L cada.**Matéria Prima:** Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	40,0
	Mínima	35,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,0 GL
Concentração de célula:	Média	10 %v/v
Tratamento ácido:	pH	2,5
Tempo tratamento:	2,5 h	
Produção de levedura seca:	não produz	

CEPA 8 – VALE DO ROSÁRIO**Identificação:** VR 06/97**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** CIA. AÇUCAREIRA VALE DO ROSÁRIO**Localização:** Fazenda Invernada Zona Rural – Morro Agudo/SP**Tipo de Processo:** Fermentação Contínua**Descrição do Processo:** Processo constituído de 4 estágios de fermentação sendo o volume do primeiro estágio a metade do volume final**Matéria Prima:** Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa**Temperatura de operação:** Máxima 35,0

Mínima 33,0

Concentração de etanol no vinho: Médio 8,0 GL**Concentração de célula:** Média 15 %v/v**Tratamento ácido:** pH 2,2**Tempo tratamento:** 2,0 h**Produção de levedura seca:** não informado

CEPA 9 - BONFIM

Identificação: Reg 94/95

Safra da coleta: 1994

Unidade: Açucareira Corona S.A.

Localização: Rod. Brigadeiro Faria Lima Km 322 – Guaíba/SP

Tipo de Processo: Batelada Alimentada

Descrição do Processo: Composto por 10 dornas de 1.000.000 de litros cada, com sistema de resfriamento externo com trocadores de calor tipo placa. Tratamento ácido intermitente.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	36,0
	Mínima	33,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,0 GL
Concentração de célula:	Média	10 %v/v
Tratamento ácido:	pH	2,4
Tempo tratamento:	2,5 h	
Produção de levedura seca:	9.5500 Kg/dia	

CEPA 10 – COSTA PINTO**Identificação:** CP 1/98**Safra da coleta:** 1998**Unidade:** USINA COSTA PINTO S.A. - AÇÚCAR E ÁLCOOL**Localização:** Piracicaba/SP**Tipo de Processo:** Fermentação contínua

Descrição do Processo: Sistema constituído por duas linhas de fermentação com 4 dornas cada. Equipadas com sistema de agitação e trocadores de calor externo.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	37,0
	Mínima	34,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,5 GL
Concentração de célula:	Média	13 %v/v
Tratamento ácido:	pH	2,0
Tempo tratamento:	2,0 h	
Produção de levedura seca:	não produz	

CEPA 11 - GUARANI**Identificação:** G 1/97**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** AÇÚCAR GUARANI S.A.**Localização:** Rod. Assis Chateaubriand Km 155 – Olímpia/SP**Tipo de Processo:** Fermentação Contínua

Descrição do Processo: Sistema constituído por duas linhas de fermentação com 4 dornas cada. Equipadas com sistema de agitação e trocadores de calor externo.

Matéria Prima: Mel esgotado de terceira massa**Temperatura de operação:** Máxima 36,0

Mínima 33,5

Concentração de etanol no vinho: Médio 7,0 GL**Concentração de célula:** Média 13 %v/v**Tratamento ácido:** pH 2,5**Tempo tratamento:** 2,0 h**Produção de levedura seca:** não produz

CEPA 12 - ANDRADE

Identificação: AN 01/96

Safra da coleta: 1996

Unidade: DESTILARIA ANDRADE S.A.

Localização: Fazenda Piratininga s/nº Zona Rural – Pitangueiras/SP

Tipo de Processo: Fermentação Contínua

Descrição do Processo: Processo contínuo adaptado de processo batelada existente. Resfriamento por serpentina sem sistema de agitação.

Matéria Prima: Caldo de cana tratado

Temperatura de operação:	Máxima	38,0
	Mínima	34,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,0 GL
Concentração de célula:	Média	10 %v/v
Tratamento ácido:	pH	2,7
Tempo tratamento:	2,0 h	
Produção de levedura seca:	não produz	

CEPA 13 - DACAL**Identificação:** 01/97**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** DESTILARIA DE ÁLCOOL CALIFÓRNIA (DACAL)**Localização:** Fazenda São Francisco Monte Alegre – Parapuã/SP**Tipo de Processo:** Fermentação Contínua

Descrição do Processo: Composto por duas linhas de fermentação com 4 dornas ligadas em série. Possuem sistema de agitação, trocadores de calor externos e unidade de separação de células por decantação. Processo adaptado de batelada existente.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana não tratado com mel de primeira massa

Temperatura de operação:	Máxima	40,0
	Mínima	35,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	6,0 GL
Concentração de célula:	Média	5%v/v
Tratamento ácido:	não tem	
Produção de levedura seca:	não produz	

CEPA 14 - DACALDA**Identificação:** 01/98**Safra da coleta:** 1998**Unidade:** DACALDA AÇÚCAR E ÁLCOOL LTDA.**Localização:** Fazenda Santa Maria Dourado – Jacarezinho/PR**Tipo de Processo:** Fermentação contínua**Descrição do Processo:** Composto por três linhas de fermentação com 4 dornas ligadas em série. Processo adaptado de batelada existente.**Matéria Prima:** Mistura de caldo de cana tratado (clarificado + xarope)

Temperatura de operação:	Máxima	38,0
	Mínima	34,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	6,3 GL
Concentração de célula:	Média	14,5%v/v
Produção de levedura seca:	não produz	

CEPA 15 - ALCOESTE**Identificação:** AC 01/97**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** ALCOESTE DESTILARIA FERNANDÓPOLIS S.A.**Localização:** Rod. Euclides da Cunha Km 562 – Fernandópolis/SP

Tipo de Processo: Batelada alimentada convencional

Descrição do Processo: Processo batelada alimentada constituído por 10 dornas de 300.000 L cada e três cubas de 100.000 L cada.

Matéria Prima: Caldo de cana tratado

Temperatura de operação:	Máxima	35,0
	Mínima	33,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,0 GL
Concentração de célula:	Média	10%v/v
Tratamento ácido:	pH	2,2
Tempo tratamento:	2,0 horas	
Produção de levedura seca:	não produz	

CEPA 16 - COROL

Identificação: 97/98

Safra da coleta: 1997

Unidade: COOPERATIVA AGROPECUÁRIA ROLÂNDIA LTDA.

Localização: Lotes 500/501 Distr. São Martinho – Rolândia/PR

Tipo de Processo: Fermentação Contínua

Descrição do Processo: Processo adaptado de batelada existente. Constituído de 4 estágio de fermentação, sendo que o primeiro é formado por 4 dornas conjugadas. Possui trocador de calor externo tipo placa.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de primeira massa

Temperatura de operação:	Média	36,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,0 GL
Concentração de célula:	Média	13%v/v
Tratamento ácido:	pH	2,4
Tempo tratamento:	1,5 hora	
Produção de levedura seca:	não produz	

CEPA 17 – MAURI

Identificação: Y-904

Unidade: Mauri - Produção de Fermento

Localização: Perdeneiras/SP

Características: Cepa isolada de processos de fermentação de melaço sem reciclo de células – Índia. Comercializado na forma seca para partidas de processos de fermentação alcoólica no Brasil.

CEPA 18 - MAURI

Identificação: Y-167

Unidade: Mauri - Produção de Fermento

Localização: Perdeneiras/SP

Características: Comercializada na forma seca para indústria de Panificação. Utilizada na partida de unidades de fermentação no Brasil.

CEPA 19 – BARRA GRANDE

Identificação: 95/96

Safra da coleta: 1996

Unidade: USINA BARRA GRANDE DE LENÇÓIS S.A.

Localização: Rod. Marechal Rondon Km 289 – Lençóis Paulista/SP

Tipo de Processo: Batelada alimentada convencional

Descrição do Processo: Processo com domas de 1.000 m³

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	35,0
---------------------------------	--------	------

	Mínima	33,0
--	--------	------

Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,5 GL
---	-------	--------

Concentração de célula:	Média	13%v/v
--------------------------------	-------	--------

Tratamento ácido:	pH	2,5
--------------------------	----	-----

Tempo tratamento:	2,0 horas
--------------------------	-----------

Produção de levedura seca:	não produz
-----------------------------------	------------

CEPA 20 – SANTA CRUZ**Identificação:** 01/97**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** Usina Santa Cruz S.A.**Localização:** 28001-970 – Campos dos Goitacazes - RJ**Tipo de Processo:** Fermentação contínua

Descrição do Processo: 5 reatores ligados em série com agitação mecânica e trocadores de calor externos tipo placas. Tratamento ácido contínuo.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Média	34
Concentração de etanol no vinho:	Médio	7,5 GL
Concentração de célula:	Média	12%v/v
Tratamento ácido:	pH	2,5
Tempo tratamento:	1,15 hora	
Produção de levedura seca:	1500 Kg/dia	

CEPA 21 - CLEALCO**Identificação:** C₁₄**Safra da coleta:** 1997**Unidade:** CLEALCO AÇÚCAR E ÁLCOOL**Localização:** Rod. SP 425 – Clementina/SP**Tipo de Processo:** Fermentação contínua

Descrição do Processo: Processo adaptado de batelada existente. Consiste de duas linhas de fermentação com 4 estágios, sistema de agitação mecânico e trocadores de calor externos tipo placa.

Matéria Prima: Mistura de caldo de cana tratado com mel de segunda massa

Temperatura de operação:	Máxima	36,0
	Mínima	33,0
Concentração de etanol no vinho:	Médio	8,0 GL
Concentração de célula:	Média	16%v/v
Tratamento ácido:	pH	2,2
Tempo tratamento:	1,5 hora	
Produção de levedura seca:	não produz	

3. BIBLIOGRAFIA

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v. 15, n.6, p.32-35, 1997.

GUINARD, J. X. & LEWIS, M. J. Study of phenomenon of agglomeration in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 99 (6): 487-503, 1993.

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MRAK, E. M. *The life of yeasts*. Harvard University Press, Cambridge, 1966, 186 p.

RODRIGUES, M. I. & ANDRIETTA, M. G. S. *Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicos*. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, 1995. 54p. (Apostila).

SOARES, E. V.; TEXEIRA, J. A.; MOTA, M. Influence of aeration and glucose concentration in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*. 13 (3), p.207-212, 1991.

TAVARES, F. C. A. . Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos*. 5p. 34-39, 1992.



CAPÍTULO 3

LEVANTAMENTO DAS CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DAS CEPAS

ÍNDICE

Objetivo	61
1. Introdução	61
2. Potencial Fermentativo	62
3. Capacidade Fermentativa	64
4. Avaliação das Linhagens	68
4.1. Determinação dos Parâmetros de Classificação	68
5. Métodos Analíticos	69
5.1. Determinação da Massa Seca	69
5.2. Determinação do Etanol Produzido	69
5.3. Determinação da Glicose	70
5.4. Determinação de $\mu_{\text{máx}}$	71
6. Cálculo dos Parâmetros para Classificação	72
6.1. Determinação da Massa de Etanol Produzida (ETOH)	73
6.2. Determinação da Massa de Glicose Consumida (GLI)	73
6.3. Determinação da Massa Celular Produzida (MX)	74
6.4. Obtenção da Produção Específica de Etanol (Y_p/s)	75
6.5. Obtenção da Produtividade ($\emptyset$)	75
6.6. Obtenção da Velocidade de Consumo de Substrato (VCS)	76
6.7. Determinação do Nível de Conversão do Substrato (NCO)	76
7. Resultados e Discussão	77
8. Bibliografia	82

OBJETIVO

***NESTE CAPÍTULO O OBJETIVO É REALIZAR O LEVANTAMENTO DAS
CARACTERÍSTICA CINÉTICAS DAS 21 CEPAS. A PARTIR DA OBTENÇÃO DESSES
DADOS CLASSIFICÁ-LAS SEGUNDO A CAPACIDADE FERMENTATIVA DESCRITA POR
ANDRIETTA ET AL., 1999.***

1. INTRODUÇÃO

O acompanhamento da dinâmica populacional das cepas de levedura em processos de fermentação alcoólica pode fornecer informações valiosas para sua otimização. As informações obtidas podem ser utilizadas na seleção de leveduras “nativas” com alto potencial fermentativo e na adequação dos processos às suas necessidades através da elaboração e melhoramento de projetos e também da correção de condutas operacionais inadequadas (STROPPA *et al.*, 2000).

As ferramentas utilizadas para a identificação de leveduras incluem desde as taxonomias clássicas (LODDER, 1970) e numéricas (GRIFFITIS, 1981) até as análises sofisticadas de cariotipagem (CARLE & OLSON, 1984; SCHWARTZ & CANTOR, 1984; CHU *et al.*, 1986). Embora toda essas técnicas tenham reconhecido valor como instrumento de estudo não fornecem informações sobre a performance fermentativa da levedura.

Segundo ANDRIETTA *et al.* (1999), o conhecimento da cinética é essencial para o entendimento da dinâmica de população de leveduras nas dornas de fermentação.

Em uma usina, pode ocorrer queda no rendimento durante o processo, sem que o motivo seja conhecido. A detecção de leveduras ao longo do

processo e a sua caracterização fermentativa será importante neste caso, pois fornecerá subsídios para verificar se a diminuição do rendimento é devido à contaminação ou à falhas de operação, ou má qualidade da matéria-prima (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

ANDRIETTA *et al.* (1995), propuseram uma diferenciação entre leveduras baseada em seu potencial fermentativo. Esta técnica foi utilizada no desenvolvimento de um sistema de classificação, designado “capacidade fermentativa” (ANDRIETTA *et al.*, 1999), que separa as leveduras em diferentes grupos de acordo com a associação de seis parâmetros de produção específica e características cinéticas.

2. POTENCIAL FERMENTATIVO

Segundo ANDRIETTA *et al.* (1997) as técnicas tradicionais de identificação de microrganismos são capazes de fornecer gênero e espécie das leveduras e que estas técnicas embora sejam de grande importância não fornecem os parâmetros de interesse industrial. Em função desta limitação foi desenvolvida uma nova técnica, denominada “Potencial Fermentativo”, que permite determinar de forma comparativa, se uma cepa testada é similar a outras e ainda ser capaz de fornecer informações sobre o seu comportamento fermentativo.

A determinação do potencial fermentativo se baseia na determinação de fatores de produção específica entre a cepa testada e aqueles obtidos por uma cepa padrão. As produções específicas estudadas para a obtenção do potencial são:

$$\text{Produção específica de etanol (PEE)} = \frac{\text{etanol produzido}}{\text{ART consumido}}$$

$$\text{Produção específica de glicerol (PEG)} = \frac{\text{glicerol produzido}}{\text{ART consumido}}$$

$$\text{Produção específicas de ácidos (PEAc)} = \frac{\text{acidez produzida}}{\text{ART consumido}}$$

$$\text{Produção de massa celular (PC)} = \frac{\text{massa célula produzida}}{\text{ART consumido}}$$

$$\text{Produção de ART não convertido} = \frac{\text{ART não convertido}}{\text{ART consumido}}$$

A partir das produções específicas são calculados os fatores para a produção de etanol (FE), glicerol (FG), ácidos (FAc), massa celular (FC) e consumo de açúcar (FR) conforme as equações descritas a seguir. Nessas equações os valores obtidos para as linhagens são indicados com a letra t e o da linhagem controle, que é uma levedura que apresenta todas as características favoráveis para o processo, são indicados com a letra c.

$$FE = \frac{(PE_t - PEE_c) \times 100}{PEE_c}$$

$$FG = \frac{(PEG_c - PEG_t) \times 100}{PEE_c}$$

$$FAc = \frac{(PEAcc - PEAct) \times 100}{PEAcc}$$

$$FC = \frac{(PC_c - PC_t) \times 100}{PC_c}$$

$$FR = \frac{(\Delta\Delta ART_e \Delta ART_t) \times 100}{\Delta ART_c}$$

$$PF = 10 \times FE + 5 \times FR + 2 \times FC + 1 \times FG + 0,25 \times FAc$$

Os valores desses parâmetros indicam o quanto às características da cepa são apropriadas para a produção de álcool. Quando o resultado desse parâmetro for próximo de zero, esta cepa é considerada com características adequadas para os processos de fermentação. Caso o resultado seja positivo, indica que a cepa testada possui características fermentativas melhores que a cepa referência. No caso de valores negativos, indica que as características da cepa testada são menos apropriadas para a produção de álcool que a cepa referência.

3. CAPACIDADE FERMENTATIVA

Uma etapa seguinte à determinação do Potencial Fermentativo descrito por ANDRIETTA *et al.*, (1995) é a obtenção da Capacidade Fermentativa, trabalho esse proposto pelo mesmo grupo de pesquisa. Nesta nova proposta ANDRIETTA *et al.*, (1999) classifica as cepas utilizando os seguintes parâmetros:

Produção específica de células ($Y_{x/s}$) - Expressa a massa celular produzida em relação à massa de ART consumida. Este parâmetro fornece a quantidade de massa celular produzida por grama de açúcar consumido. Este parâmetro auxilia na determinação da quantidade de células que podem ser retiradas do processo para secagem ou para descarte. Valores superiores ao do padrão indicam um maior desvio de açúcar para a produção de células em detrimento a produção de etanol. Em casos onde existem unidades de secagem de células esta produção excedente pode ser aproveitada na produção de ração, minimizando o prejuízo.

Velocidade de consumo de ART (VCS) – Expressa a massa de ART consumido (g) por volume (L) de meio em fermentação por unidade de tempo (h). Este parâmetro fornece a velocidade com que a cepa de levedura consome o açúcar disponível. Da mesma maneira que a produtividade, quanto maior for esse parâmetro mais adequado será a cepa para a utilização em processos industriais.

Nível de Conversão de ART (NCO) – este parâmetro indica a quantidade de ART consumida em relação ao ART inicial. Além de estar vinculado a velocidade de consumo de substrato, este mostra-se como bom parâmetro de avaliação da afinidade do microrganismo com o substrato, ou seja, a capacidade que o microrganismo possui de crescer em baixas concentrações de açúcares.

Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) - A taxa de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) é específica para cada microrganismo, sendo assim, este parâmetro é útil para determinar se uma cepa é similar a outra. Nas destilarias brasileiras o valor deste parâmetro para as cepas com características fermentativas satisfatórias está na faixa de 0,5 1/h.

Produtividade (ϕ) - Expressa a massa de etanol produzida (g) por volume (L) de meio em fermentação por unidade de tempo (h). Este parâmetro permite determinar a velocidade de transformação do açúcar em etanol. Quanto maior for este parâmetro melhor será a levedura para o processo;

Produção específica de etanol ($Y_{p/s}$) - Expressa a massa de etanol produzido em relação à massa ART consumido. Este parâmetro fornece o potencial das cepas de levedura no que diz respeito ao rendimento fermentativo, ou seja, indica o máximo rendimento em álcool que esta cepa pode alcançar.

Cada parâmetro contempla 3 faixas distintas de valores, sendo alta (1), média (2), baixa (3), como pode ser observado na Tabela 3.1. Os seis resultados formam uma sequência de números, que pode ser usado para separação das cepas em grupos.

Tabela 3.1 - Limites das faixas de variação dos níveis alto, médio e baixo dos parâmetros utilizados na classificação. Onde: $Y_{x/s}$ = g massa celular produzida (massa seca)/g substrato; VCS = g substrato consumido/Lxh; NCO = % nível de conversão de substrato; $\mu_{\max}$ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); $\emptyset$ = g etanol produzido/Lxh; $Y_{p/s}$ = g etanol produzido/ g substrato.

Nº Parâmetros	Parâmetros	Nível Alto (1)	Nível Médio (2)	Nível Baixo (3)
Primeiro	$Y_{x/s}$	>0,044	$0,044 \leq 0,041$	< 0,041
Segundo	VCS	> 5,7	$5,7 \leq 5,2$	< 5,2
Terceiro	NCO	> 98,5	$98,5 \leq 90$	< 90
Quarto	$\mu_{\max}$	> 0,55	$0,55 \leq 0,45$	< 0,45
Quinto	$\emptyset$	> 2,4	$2,4 \leq 2,2$	< 2,2
Sexto	$Y_{p/s}$	> 0,45	$0,45 \leq 0,42$	< 0,42

ANDRIETTA *et al.* (1999).

Os grupos são definidos pela combinação de 6 algarismos, sendo que cada um deles pode assumir valores de 1 a 3. Com esse agrupamento é possível a obtenção de 729 grupos diferentes, sendo consideradas cepas pertencentes ao mesmo grupo àquelas que apresentam a mesma seqüência numérica.

Para obtenção dos 6 algarismos as cepas têm que ser testadas para obtenção dos parâmetros e seus valores corrigidos para uma base de cálculo única, utilizando valores da cepa de referência obtidos em cada ensaio, corrigidos para os valores médios contidos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valores de referência da base de cálculo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas.

Parâmetro	Unidade	Valor de Referência
Produção específica de células	G MS/g substrato	0,04
Velocidade de consumo de substrato	g Subs/ L x h	5,8
Nível de conversão do substrato	%	99,5
Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max})	l/h	0,5
Produtividade (PROD)	g ET/ L x h	2,5
Produção específica de etanol ($Y_{p/s}$)	G ET/ g substrato	0,46

ANDRIETTA *et al.* (1999).

4. AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS

4.1. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CLASSIFICAÇÃO

Os parâmetros foram obtidos através de balanço de massa de fermentações realizadas em frascos agitados (Erlenmeyers de 250 ml com 100 ml de meio de cultivo estéril) sob temperatura, agitação e tempo controlados (32°C, 150 rpm e 24 horas). O meio de cultivo utilizado foi composto de (g/l): 150g de glicose; 5g de KH_2PO_4 ; 5g de NH_4Cl ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g de KCl e 6g de extrato de levedura. O fechamento dos frascos foi feito com rolha e borracha com orifício central onde foi introduzido um tubo de vidro em “L” (com filtro de algodão) para a saída de CO_2 produzido durante a fermentação.

Inoculação

As culturas crescidas em “slants” de PDA (Potato Dextrose Agar) por 48 a 32°C foram ressuspendidas em água estéril e inoculada nos Erlenmeyers em volume correspondente a 10% do volume do meio de cultivo. Os frascos foram incubados em “shaker” por 24 h a 32°C/150 rpm. Decorrido o tempo de incubação amostras foram retiradas para realização das seguintes análises: etanol, massa celular e ART.

Os ensaios foram conduzidos em triplicatas e em conjunto com uma cepa de referência. Essa cepa possui os parâmetros estudados definidos. Dessa maneira foi possível realizar a correção de desvios que poderiam ter ocorrido entre um ensaio e outro.

Para cada cepa foram determinados através do balanço de massa, os seguintes parâmetros: rendimento em etanol e células, produtividade, velocidade de consumo de substrato, nível de conversão de ART (Açúcares Redutores Totais), produtividade específica e velocidade de consumo de substrato específico.

5. MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1. DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA

Inóculo: Uma alíquota de 10 ml de inóculo é transferida para placa previamente tarada e seca em estufa a 80°C até peso constante. O valor da massa seca é obtido pela diferença de peso da placa ($MS_{inóc.}$).

Vinho fermentado: A determinação é feita pela retirada de alíquotas de 40 ml de vinho fermentado que foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. O centrifugado foi lavado com água destilada e recentrifugado por três vezes. Em seguida transferido para uma placa previamente tarada e o material seco em estufa a 80°C até peso constante. O valor da massa seca será obtido pela diferença do peso inicial da placa (MS_{vinho}).

5.2. DETERMINAÇÃO DO ETANOL PRODUZIDO

A amostra de vinho fermentada é submetida a uma destilação, em microdestilador, para evitar interferência de outras substâncias presentes no mesmo. 25 ml do vinho fermentado é destilado e recolhido em balão de 50 ml, garantindo-se assim a completa destilação do etanol. A concentração de etanol do destilado foi determinada utilizando o método colorimétrico descrito por SALIK & POVH (1993).

Método Colorimétrico

Será utilizado o método espectrofotométrico para a determinação de teores alcoólicos em mistura hidroalcoólicas. O método se baseia na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido (SALIK E POVH, 1993). A solução adquire uma tonalidade verde proporcional a concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro. A quantificação do etanol é

feita através da comparação com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de etanol.

Para esse método a amostra destilada é diluída na proporção de 1 ml da amostra para 25 ml de água destilada em balão volumétrico.

5 ml da amostra são colocado em tubo de ensaio, acrescenta-se 2ml de água destilada e 2 ml de reagente de cor. Os tubos são colocados em banho-maria a 60° por 30 minutos. Logo após o mesmo é resfriado a temperatura ambiente e sua absorbância é lida em espectrofotômetro a 600 nm de comprimento de onda.

5.3. DETERMINAÇÃO DA GLICOSE

Realizado por via enzimática utilizando a glicose-oxidase (kit Laborlab). O princípio do método é a redução de um reativo de cor (aminofenazona e fenol) pela enzima, desenvolvendo uma coloração rosa proporcional a concentração de açúcar na amostra. A concentração de glicose presente é determinada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 505 nm e comparada com uma curva padrão construída.

Para esse método 0,1 ml de vinho fermentado e centrifugado é transferido para tubos de ensaio. Adicionam-se 10 ml de reagente de cor e coloca-se em banho-maria por 10 minutos a 37°C. Em seguida os tubos são resfriados a temperatura ambiente e então sua absorbância é lida.

5.4. DETERMINAÇÃO DE $\mu_{\text{MÁX}}$:

A determinação desse parâmetro será realizada através do acompanhamento do crescimento das linhagens de levedura, em meio de cultura contendo quantidades não limitantes de substrato e onde não estavam presentes fatores de inibição. A incubação será feita a temperatura controlada (32°C), sob agitação (150 rpm) e o acompanhamento do crescimento da levedura feito através da determinação da densidade óptica a intervalos regulares (ANDRIETTA *et al.*, 1995).

Serão preparados Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultivo estéril composto de: Glicose 40g/l; Fosfato diácido de Potássio 5,0 g/l; NaCl 5,0 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g/l; KCl 1,0 g/l; extrato de levedo 6,0 g/l. Os frascos serão inoculados como descrito no item 4.1. Imediatamente após a inoculação, será retirado uma amostra para a leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm e os frascos incubados em "shaker" a uma temperatura de 32°C/150 rpm. As três primeiras amostras serão retiradas de hora em hora. A partir da terceira hora as amostras serão retiradas de meia em meia hora. Os ensaios foram conduzidos até o final da fase exponencial de crescimento caracterizado pela leitura constante da absorbância.

Cálculo do μ_{max}

Experimentalmente o aumento da população está relacionado com a quantidade populacional e uma constante de proporcionalidade μ (taxa específica de crescimento), ou seja:

$$dX/dt = \mu \cdot X,$$

onde:

X – concentração celular (g/l)

t – tempo (h)

Integrando-se a equação acima, obtém-se:

$$\int_0^t \mu^* dt = \int_X^{X_0} \frac{dX}{X}$$

Assumindo-se que μ é constante e igual a $\mu_{\max}$ na fase exponencial, da integração da equação acima obtém-se:

$$\mu_{\max} * t = \ln \frac{X}{X_0}$$

A equação obtida acima é similar a equação de uma reta ($y = a + b * c$), plotando-se $\ln X/X_0$ em função do tempo, obtém-se o coeficiente angular b que é igual ao $\mu_{\max}$.

6. CÁLCULO DOS PARÂMETROS PARA CLASSIFICAÇÃO

A partir dos ensaios realizados foram calculados os seguintes parâmetros: produção específica de células ($Y_{x/s}$), velocidade de consumo de substrato (VCS), nível de conversão de substrato (NCO), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$), produtividade (ϕ) e produção específica de etanol ($Y_{p/s}$). Estes parâmetros tiveram seus valores corrigidos para uma base de cálculo única. A correção foi feita dividindo-se o resultado da cepa padrão pelo respectivo valor de referência (Tabela 02). O resultado obtido para a cepa isolada foi corrigido por este fator encontrado. Os valores dos parâmetros de cada cepa foram utilizados para classificá-las de acordo com suas características em grupos que agregam cepas de comportamento fermentativo similares.

6.1. DETERMINAÇÃO DA MASSA DE ETANOL PRODUZIDA (ETOH)

Foi determinado pela massa do vinho bruto multiplicado pela concentração de etanol.

$$ETOH = \frac{M_{VF} \times C_{EV} \times d_E}{d_V \times 100}$$

onde:

ETOH = massa de etanol produzido (g)

M_{VF} = massa de vinho fermentado (g)

C_{EF} = concentração de etanol no vinho (ml/100ml)

d_e = densidade do etanol (0,79g/ml)

d_v = densidade do vinho (g/ml)

6.2. DETERMINAÇÃO DA MASSA DE GLICOSE CONSUMIDA (GLI)

Foi determinada pela diferença entre a glicose inicial do mosto e a final do vinho fermentado.

$$GLI_i = \frac{M_m \times C_{GM}}{d_m}$$

$$GLI_f = \frac{M_v \times C_{GV}}{d_v}$$

$$GLI = GLI_i - GLI_f$$

onde:

GLI = massa de glicose consumida (g)

M_m = massa do mosto (g)

M_v = massa de vinho (g)

C_{Gm} = concentração de glicose no mosto (g/ml)

C_{GV} = concentração de glicose no vinho (g/ml)

d_M = densidade do mosto (g/ml)

d_v = densidade do vinho (g/ml)

6.3. DETERMINAÇÃO DA MASSA CELULAR PRODUZIDA (MX)

Foi determinada pela diferença entre a massa de célula final e a massa de célula utilizada como inóculo.

$$MX = \left[\frac{M_v}{d_v} \times MS_{\text{vinho}} \right] - \left[\frac{M_{\text{inóculo}}}{d_{\text{inóculo}}} \times MS_{\text{inóculo}} \right]$$

onde:

MX = massa de células produzidas (g)

M_v = massa de vinho (g)

d_v = densidade do vinho (g/ml)

$M_{\text{inóculo}}$ = massa de inóculo (g)

$d_{\text{inóculo}}$ = densidade do inóculo (g/ml)

$MS_{\text{inóculo}}$ = concentração de células no inóculo (g/ml)

6.4. OBTENÇÃO DA PRODUÇÃO ESPECÍFICA DE ETANOL (Yp/s)

Foi determinada pela razão entre o etanol produzido e a glicose consumida.

$$Y_{p/s} = \frac{\text{ETOH}}{\text{GLI}}, \text{ onde:}$$

Yp/s = g de etanol/g de substrato

ETOH = massa de etanol (g)

GLI = massa de glicose (g)

6. 5. OBTENÇÃO DA PRODUTIVIDADE (Ø)

Foi determinada pela razão entre a massa do etanol produzida por volume de meio em fermentação por unidade de tempo.

$$\varnothing = \frac{\text{ETOH}}{V_M \times t_F}$$

onde:

Ø = g de etanol/Lxh

V_m = volume de meio (L)

t_f = tempo de fermentação (horas)

ETOH = massa de etanol (g)

6.6. OBTENÇÃO DA VELOCIDADE DE CONSUMO DE SUBSTRATO (VCS)

Foi determinada pela razão entre a massa de glicose consumida por volume de meio em fermentação por unidade de tempo

$$VCS = \frac{GLI}{m_M \times t_f}$$

onde:

VCS = g de substrato /gxh

GLI = massa de glicose (g)

m_m = massa de meio (g)

t_f = tempo de fermentação (horas)

6.7. DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CONVERSÃO DO SUBSTRATO (NCO)

$$NCO = \frac{GLI_i - GLI_f}{GLI_i} \times 100$$

onde:

NCO = %

GLI_i = massa de glicose inicial (g)

GLI_f = massa de glicose final (g)

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3.3 apresenta os resultados dos parâmetros obtidos para cada isolado testado, já corrigidos para o valor de referência.

Tabela 3.3 - Parâmetros cinéticos, rendimento e produtividade dos 21 isolados onde: $Y_{x/s}$ = g massa celular produzida (massa seca)/g substrato; VCS = g substrato consumido/Lxh; NCO = % nível de conversão de substrato; μ_{max} = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); $\emptyset$ = g etanol produzido/Lxh; $Y_{p/s}$ = g etanol produzido/ g substrato.

USINA	$Y_{x/s}$	VCS	NCO	μ_{max}	$\emptyset$	$Y_{p/s}$
Alvorada	0,0436	5,8128	98,31	0,5136	2,6487	0,4712
Unialco	0,0401	5,4880	96,58	0,4867	2,3798	0,4512
Diamante	0,0490	5,8885	99,59	0,3756	2,6528	0,4617
Diana	0,0409	6,5118	99,64	0,4172	2,8080	0,4502
Jalles Machado	0,0474	5,8823	99,48	0,4129	2,6102	0,4589
Junqueira	0,0401	5,8808	99,46	0,3809	2,6558	0,4719
Goiasa	0,0463	5,5473	99,64	0,4578	2,4686	0,4607
Vale Rosário	0,0391	5,5216	99,17	0,3537	2,3267	0,4399
Bonfim	0,0452	5,6389	99,24	0,5439	2,5122	0,4610
Costa Pinto	0,0469	5,5467	99,63	0,4994	2,3839	0,4466
Guarani	0,0342	5,1921	93,26	0,5695	2,2160	0,4472
Andrade	0,0404	5,5444	99,59	0,5694	2,4629	0,4608
Dacal	0,0368	5,5467	99,63	0,6045	2,4898	0,4660

USINA	Yx/s	VCS	NCO	μ_{max}	$\emptyset$	Yp/s
Dacalda	0,0489	5,5467	99,63	0,5985	2,5167	0,4721
Alcoeste	0,0424	5,5615	97,88	0,5857	2,3967	0,4458
Corol	0,0466	6,5118	99,64	0,5640	2,8419	0,4563
Y-904	0,0423	6,5118	99,64	0,5769	2,8413	0,4531
Y-167	0,0414	6,1035	93,39	0,5658	2,6450	0,4574
Barra Grande	0,0399	5,6500	99,58	0,5767	2,4332	0,4421
Santa Cruz	0,0450	6,5118	99,64	0,4316	2,8420	0,4563
Clealco	0,0440	5,8000	99,50	0,5000	2,5000	0,4600

Os dados da Tabela 3.3 mostram uma diversidade nos resultados. Comparando-se esses resultados com a Tabela 3.1 pode-se observar que a produção específica de células (Yx/s) é representada pelos três níveis sendo que, 40% pelos níveis alto e baixo e apenas 20% pelo nível médio.

Para velocidade de consumo de substrato (VCS) apenas 40% apresentam nível alto, 55% apresentam nível médio e 5% apresentam nível baixo para esse parâmetro.

O nível de conversão (NCO) só apresenta níveis alto e médio, sendo que 70% é representado pelo nível alto, ou seja, os isolados testados possuem capacidade de consumir praticamente todo o ART presente no meio fermentativo.

Em relação ao $\mu_{\max}$ 70% é representado pelo nível alto, 25% pelo nível médio e apenas 5% pelo nível baixo.

Analizando os resultados para a produtividade (ϕ) pode-se observar que 70% das cepas apresentam alto nível de produtividade e as 30% restantes apresentam nível médio para esse parâmetro. O que é excelente para o processo fermentativo.

Em relação ao parâmetro Y_p/s (produção específica de etanol) pode-se observar que 75% das cepas analisadas apresentam este valor no nível alto, ou seja, a maioria das cepas analisadas são excelentes produtoras de etanol, o que é de se esperar, pois se trata de isolados com capacidade de dominar processos industriais sobre forte pressão seletiva do meio. E os 25% restante tem o valor no nível médio, ou seja, nenhuma está no nível baixo de rendimento.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3.3, pode-se fazer a classificação das leveduras que dominaram os processos das 21 Usinas estudadas.

A Tabela 3.4 mostra os valores dos códigos de classificação obtidos para cada levedura isolada.

Tabela 3.4 - Código de classificação das leveduras isoladas das 21 Usinas

GRUPO	CÓDIGO	CEPAS
I	2.1.2.2.1.1	Alvorada
II	3.2.2.2.2.1	Unialco
III	1.1.1.3.1.1	Diamante, Jalles Machado
IV	3.1.1.3.1.1	Diana, Junqueira
V	1.2.1.2.1.1	Goiasa, Bonfim, Santa Cruz
VI	3.2.1.3.2.2	Vale do Rosário
VII	1.2.1.2.2.2	Costa Pinto
VIII	3.3.2.1.2.2	Guarani
IX	3.2.1.1.1.1	Andrade
X	3.2.1.1.2.1	Dacal
XI	2.2.2.1.2.2	Alcoeste
XII	1.1.1.1.1.1	Corol
XIII	2.1.1.1.1.1	Y-904
XIV	3.2.1.1.1.2	Barra Grande
XV	2.1.2.1.1.1	Y-167
XVI	1.2.1.1.1.1	Dacalda
XVII	2.1.1.2.1.1	Clealco

Como pode ser observado na Tabela 3.4 as 21 cepas estudadas se classificaram em 17 grupos diferentes. A maior parte dos grupos está representado apenas por uma cepa, sendo eles: Grupos I (Alvorada), II (Unialco), VI (Vale do Rosário), VII (Costa Pinto), VIII (Guarani), IX (Andrade), X (Dacal), XI (Alcoeste), XII (Corol) XIII (Y-904), XIV (Barra Grande), XV (Y-167), XVI (Dacalda) e XVII (Clealco). Os demais tiveram mais que uma representante, sendo eles: Grupo III (Diamante e Jalles Machado), Grupo IV (Diana e Junqueira), Grupo V (Goiasa, Bonfim e Santa Cruz).

A cepa mais adequada para a fermentação vai depender do que a unidade se propõe a produzir.

A cepa adequada para processos onde não possuem unidades de secagem de leveduras seria uma cepa 3.1.1.1.1.1 ou até mesma uma do tipo 2.1.1.1.1.1, pois nestas unidades é necessário que se tenha cepas com baixas ou no máximo média produção de células (Y_x/s). Alta conversão, alta velocidade de consumo de substrato (VCS), alta velocidade de crescimento (μ_{max}), alta produtividade e alta produção de etanol (Y_p/s) são características desejáveis para uma cepa de uso industrial.

Cepas do grupo 1.1.1.1.1.1 são indicadas para unidades que possuem fábrica de ração acoplada, pois o excesso de massa celular pode ser removido sem causar prejuízos, promovendo um retorno financeiro. A ocorrência de cepas deste grupo em unidades desprovida de fábrica de ração acarreta sérios problemas operacionais devido a dificuldade de eliminação do excesso da massa celular. A não eliminação deste excesso acaba aumentando o volume de creme de levedura a ser tratado, aumentando o consumo de ácido sulfúrico e o volume de fermento tratado a ser reciclado, que por sua vez aumenta o volume de vinho bruto a ser centrifugado, exigindo maior número de centrífuga em operação, o que

não é desejado. Ao optar-se pela eliminação deste excesso, pode-se escolher entre duas possibilidades: a) descarte direto que causaria perda de etanol ou b) descarte para a dorna volante (tanque pulmão dos aparelhos de destilação) que acabaria por causar incrustações nos aparelhos de destilação, aumentando a frequência de limpeza do mesmo diminuindo a produtividade e o gasto de insumos.

8. BIBLIOGRAFIA

ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. *STAB – Açúcar e Álcool e Subprodutos*, v.13, n.4, p.22-25, 1995.

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v. 15, n.6, p.32-35, 1997.

ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. *STAB- Açúcar e Álcool e Subprodutos*, v.17, n.5, p.54-59, 1999.

CARLE, G.F.; OLSON, M.V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acid Research*, n.12, p.5647-5664, 1984.

CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R.W. Separation of large DNA molecules by countour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, 234, p.1582-1585, 1986.

GRIFFTIS, A.J. A numenclature of the yeast . *Antonie van Leeuwenhoek*. 47: 547-563,1981.

LODDER, J. *The Yeast*. 1 ed. North-Holland Publishing Company. London, 1970. 815 p.

RODRIGUES, M. I. & ANDRIETTA, M. G. S. *Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicos*. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, 1995. 54p. (curso de extensão).

SALIK, F.L.M.; POVH, N.P. Método eletrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: *Congresso Nacional da Stab*, 5, Águas de São Pedro, 1993. Anais, p.262-263, Piracicaba.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, v.37, p.67-75, 1984.

STROPPA, C.T.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S., SERRA, G.E. Dinâmica populacional de leveduras em processos industriais de fermentação alcoólica. In: *Simpósio Nacional de Fermentação*, 13. Anais, doc.4, 2000.

WHEALS, A.E., BASSO, L.C., ALVES, D.M.G., AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years", *Trends in Biotechnology*, v.17, n.12, p.482-487, 1999.

CAPÍTULO 4

TAXONOMIA NUMÉRICA

ÍNDICE

Objetivo	87
1. Introdução	87
2. Material e Método	90
2.1. Inóculo	90
2.2. Preparo dos Açúcares para Teste de Assimilação e Fermentação	90
2.3. Assimilação de Nitrato de Potássio (KNO_3)	91
2.4. Crescimento em Presença de Alta Concentração Osmótica	92
2.5. Hidrólise do Amido	92
2.6. Crescimento a 37°C	93
2.7. Forma Celular	93
3. Resultados e Discussão	94
4. Bibliografia	97

OBJETIVO

NESTE CAPÍTULO SÃO APRESENTADOS OS RESULTADOS OBTIDOS QUANDO FOI UTILIZADO, PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS ESTUDADAS, A TAXONOMIA NUMÉRICA DESCRITA POR GRIFFITHS (1981).

1. INTRODUÇÃO

Durante o início do século XX, houve um crescente conhecimento da enorme capacidade dos microrganismos em executar transformações químicas. Foi-se compreendendo que o uso de microrganismos para a produção industrial era dependente da habilidade destes de realizar transformações químicas. Daí foi reconhecida a necessidade de uma informação mais descritiva para caracterizar e diferenciar os microrganismos (PELCZAR *et al.*, 1980).

Com o conhecimento de que existem milhares de espécies de microrganismos no mundo, os cientistas reconheceram então a necessidade de organizar essa quantidade e variedade de organismos. Assim, tentaram colocá-los em grupos baseados em suas similaridades. Nasceu então a ciência da Taxonomia, que inclui a classificação, nomenclatura e identificação. Os taxonomistas agrupam os organismos que compartilham certas características comuns em grupos denominados taxa (singular: táxon). O táxon básico é a espécie, que é uma coleção de cepas com características similares. Uma cepa é constituída de descendentes de uma única colônia em uma cultura pura. Para a classificação nominal das espécies, desenvolveu-se o sistema binomial, onde o nome de uma espécie é sempre dado como a combinação latina de duas partes consistindo no nome do gênero e no nome específico que

denota a espécie. Essa nomenclatura era baseada somente na aplicação de nomes para unidades bacteriais. Para tornar-se o nome mais descritivo, alguns pesquisadores nomeavam os microrganismos com o nome da doença que o hospedeiro sofria (PELCZAR *et al.*, 1996).

HANSEIN, em 1888, diferenciou as culturas de leveduras com base na morfologia celular e ascoporal e introduziu as seguintes características: crescimento em meio líquido, temperatura ótima de crescimento e habilidade em fermentar determinados açúcares (citado por VAN DER WALT, 1987). Com o passar dos anos, os taxonomistas estenderam a lista de Hansein incluindo outras características tais como: a presença ou ausência de estágios sexuais, a formação de pigmentos, a utilização de fontes de carbono, tolerância à alta concentração de glicose, liquefação da gelatina, crescimento em diferentes temperaturas, resistência a ciclohexamida, etc.

O trabalho utilizando taxonomia clássica para identificação de microrganismos é um trabalho exaustivo desempenhado na maioria dos casos por pesquisadores que tem sua linha de trabalho direcionado para esse fim. Para colaborar com grupos que utilizam a classificação como uma ferramenta de seus estudos os taxonomistas vêm desenvolvendo métodos que possam ser aplicados por pesquisadores não taxonomistas. As leveduras, por serem microrganismos de grande utilização para indústria, têm sido amplamente contempladas com esse tipo de trabalhos.

GRIFFITHS (1981) que é um taxonomista, desenvolveu um sistema para identificação de leveduras o qual pode ser utilizado segundo o próprio autor para simplificar os trabalhos de "screening" e diferenciação entre isolados de um dado ambiente.

Para desenvolver o sistema GRIFFITHS (1981) usou as descrições de 429 espécies de leveduras propostas por LODDER (1970) e nas chaves

elaboradas por BARNETT & PAKHURST (1974). O taxonomista utilizou 21 provas. Dessas 21 apenas uma diz respeito à morfologia. Os outros 20 são testes bioquímicos, os quais são facilmente interpretados por pesquisadores não taxonomistas. Os testes são distribuídos em 7 grupos, onde, cada um desses é composto por 3 testes. O resultado negativo ou positivo desses testes gera um número. Com a obtenção da sequência dos 7 grupos é feita uma busca na chave disponibilizada por Griffiths.

Alguns trabalhos de identificação de leveduras de ambientes de doma de fermentação alcoólica, utilizando o trabalho de Taxonomia Numérica, tem sido encontrado na literatura.

MALTO (1997) estudando 14 cepas isoladas de uma Usina no decorrer de uma safra, conclui, utilizando a Taxonomia Numérica, de se tratarem de exemplares de *S. cerevisae*.

CABRINI & GALLO (1999) conseguiram através da Taxonomia Numérica identificar 80,95% das leveduras isoladas de amostras de caldo primário, mosto e leite de levedura de um processo de fermentação alcoólica.

MIGLIARI (2001) utilizou a Taxonomia Numérica para identificar isolados de um processo de fermentação alcoólica que utiliza como substrato resíduo da fabricação de concentrado de laranja. O autor conseguiu identificar 7 dos 10 isolados. Esse mesmo autor identificou, apenas 12 entre 26 isolados, de processo de fermentação de caldo de cana para produção de etanol.

A Tabela 4.1 mostra quais são os testes, com seus respectivos valores, utilizados no trabalho proposto por GRIFFITHS (1981).

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. INÓCULO

Os testes foram conduzidos a partir das leveduras crescidas em YEPD por 24 horas a 32°C.

YEPD (g/l): extrato de levedura – 10; peptona – 20; dextrose – 20.

Para este teste introduziu-se uma linhagem tipo de *S. cerevisiae* (ATCC 7752). Este procedimento foi realizado com objetivo de validar a classificação sugerida por GRIFFITHS (1981).

2.2. PREPARO DOS AÇÚCARES PARA TESTE DE ASSIMILAÇÃO E FERMENTAÇÃO

Todos os açúcares foram dissolvidos em uma solução basal em uma concentração final igual a 2%. No caso da rafinose foi utilizada uma concentração final de 4%. A inoculação foi feita com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD. A solução foi distribuída em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio. Nos tubos referentes a fermentação, tubos de Duran (próprios para verificação de produção de gás) foram adicionados. Os testes de assimilação foram considerados positivos quando houve formação de biomassa para assimilação e de formação de gás no caso de fermentação.

Solução basal para teste de açúcares (g/l): sulfato de amônio – 5; fosfato monobásico – 1; sulfato de magnésio – 0,5; açúcar a ser testado – 20 (no caso da rafinose – 40).

Açúcares a serem testados:

Assimilação: maltose, galactose, lactose, eritritol, ribitol, sacarose, inositol, celobiose, rafinose, manitol, melibiose, xilose.

Fermentação: glicose, galactose, lactose, sacarose.

Todos os açúcares foram esterilizados em autoclave por 3 minutos à 121°C. Foi preparado um tubo onde foi adicionada apenas a solução basal (branco). Esse procedimento foi realizado para descartar um resultado de falso – positivo em função do resíduo da massa de levedura proveniente do inóculo. Todos os testes foram realizados em duplicata. As leituras foram feitas em 24, 48 e 72 horas.

2.3. ASSIMILAÇÃO DE NITRATO DE POTÁSSIO (KNO₃)

Solução basal para nitrato (g/l): sulfato de amônio – 5, fosfato monobásico – 1, sulfato de magnésio – 0,5, nitrato de potássio –1, agar – 1,7 (esterilizada por 15 minutos em autoclave à 121°C).

A inoculação foi feita com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD. A solução basal foi colocada em tubos de ensaio em um volume igual a 5 ml. Este teste foi incubado a 32°C por 48 horas. Passado esse período de incubação foi colocado 3 gotas de uma solução contendo (g/100 ml) : N,N dimetil-naptil-amino – 0,6, ácido acético 5M – e 3 gotas de uma solução contendo (g/100ml) de ácido sulfanílico – 0,8g, ácido acético 5M .

O teste é considerado positivo com a formação de uma coloração rósea a vermelho indicando que houve a utilização do nitrato. No caso de reação negativa (meio não alterado) é feita adição de zinco, na forma pó ao meio para confirmação. Se o nitrato não foi utilizado o zinco o reduzirá quimicamente formando uma cor vermelha.

2.4. CRESCIMENTO EM PRESENÇA DE ALTA CONCENTRAÇÃO OSMÓTICA

É feito a partir do crescimento em meios contendo altas concentrações de soluto. Qualquer um dos meios que apresentem sinais de crescimento das leveduras resulta em resposta positiva.

Meio contendo NaCl 10% (g/l): glicose, 2; peptona, 20; extrato de levedura, 10; cloreto de sódio, 100. Esterilização: 3 minutos em autoclave à 121°C

Meio contendo glicose 50% (g/l): sulfato de amônio – 5, fosfato monobásico – 1, sulfato de magnésio – 0,5, glicose – 500. Esterilização: 3 minutos em autoclave à 121°C

A inoculação foi feita com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD. A solução foi colocada em tubos de ensaio em um volume igual a 5 ml. O teste foi considerado positivo quando houve a formação de biomassa.

2.5. HIDRÓLISE DO AMIDO

Meio (g/l): amido – 20, extrato de levedura – 10, peptona- 10, agar – 15. Este meio depois de esterilizado em autoclave por 15 minutos à 121°C, foi distribuído em placas estéreis (cerca de 20ml/placa).

Lugol: iodeto de potássio – 2g, iodo metálico – 1g, água destilada – 300ml.

Para a condução deste teste a levedura foi crescida, por duas vezes, no meio contendo amido. Estas foram incubadas por 24-48 horas a 32°C. Após o crescimento da cultura adicionou-se uma gota de Lugol. A reação é considerada positiva com a formação de um halo transparente ao redor da colônia, o que indica a hidrólise do amido.

2.6. CRESCIMENTO A 37°C

O meio utilizado foi YEPD distribuído em tubos de ensaio em volume igual a 5 ml. A inoculação foi feita com 0,1 ml de levedura crescida em YEPD. O tubo foi inoculado por 24-48 horas a 37°C. O teste é considerado positivo com formação de biomassa.

2.7. FORMA CELULAR

Meio (g/l): extrato de malte – 6, maltose – 6, dextrose – 6, extrato de levedura – 1,2. Esterilização 15 minutos em autoclave à 121°C.

Foi utilizado meio de extrato de malte para este teste por ser este o meio indicado para descrição de forma celular. O meio foi distribuído em tubos de ensaio em volume igual a 5 ml. A inoculação foi feita com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD. O tubo inoculado foi incubado por 24 horas a 32°C. A forma celular foi observada em microscópio (400X) em lâmina úmida sem coloração. Teste positivo: presença de células alongadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 4.1 mostra a chave proposta por GRIFFITHS (1981). Na Tabela 4.2 é possível observar os resultados obtidos para as cepas testadas.

Tabela 4.1 - Testes envolvidos em cada uma dos 7 dígitos proposta pela Taxonomia Numérica (GRIFFITHS, 1981). No caso de resultado positivo os valores somados para a obtenção de cada dígito são 4, 2 e 1 para o 1º, 2º e 3º testes respectivamente. Em caso negativo o valor é igual a zero para cada um dos testes.

	Dígito 1	Dígito 2	Dígito 3	Dígito 4	Dígito 5	Dígito 6	Dígito 7
1º T e s t e	Maltose ¹	Nitrato ¹	Ribitol ¹	Sacarose ²	Sacarose ¹	Rafinose ¹	Lactose ¹
2º T e s t e	Galactose ¹	Eritritol ¹	37 °C ¹	Galactose ²	Inositol ¹	Manitol ¹	Xilose ¹
3º T e s t e	Lactose ¹	Amido Hidrólise	Alta pressão osmótica ¹	Glicose ²	Celobiose ¹	Melobiose ¹	Células alongadas presentes

¹ – Assimilação; ² - Fermentação

Tabela 4.2 - Resultado da Taxonomia Numérica para as 22 cepas de leveduras.

Cepa	Código	Classificação	Cepa	Código	Classificação
Alvorada	6.0.3.7.4.4.1	<i>S. cerevisae</i>	Andrade	6.0.3.7.4.4.0	<i>S.chevalieri</i>
Unialco	2.0.3.7.4.4.1	<i>S.coreanus</i>	Dacal	6.0.3.7.4.4.1	<i>S. cerevisae</i>
Diamante	6.0.3.7.4.4.1	<i>S. cerevisae</i>	Dacalda	6.0.3.7.4.5.1	n.d.
Diana	6.0.3.7.4.4.0	<i>S.chevalieri</i>	Alcoeste	6.0.3.7.4.4.0	<i>S.chevalieri</i>
J.Machado	2.0.3.7.4.4.1	<i>S.coreanus</i>	Corol	2.0.3.7.4.4.1	<i>S.coreanus</i>
Junqueira	6.0.3.7.4.4.1	<i>S. cerevisae</i>	Y 904	6.0.3.7.4.4.0	<i>S.chevalieri</i>
Goiasa	2.0.3.7.4.6.0	<i>S.coreanus</i>	Y 167	6.0.3.7.4.4.0	<i>S.chevalieri</i>
V.Rosário	6.0.3.7.4.4.1	<i>S. cerevisae</i>	B.Grande	6.0.3.7.4.5.1	n.d.
Bonfim	6.0.3.7.4.4.0	<i>S.chevalieri</i>	Santa Cruz	6.0.3.7.4.4.0	<i>S.chevalieri</i>
C.Pinto	6.0.3.7.4.4.1	<i>S. cerevisae</i>	Clealco	2.0.3.7.4.5.1	<i>S.coreanus</i>
Guarani	6.0.3.7.4.4.0	<i>S.chevalieri</i>	ATCC7752	6.0.3.7.4.4.1	<i>S. cerevisae</i>

n.d. – não identificada

Seguindo a metodologia descrita por GRIFFITHS (1981), foram identificadas 20 das 22 cepas estudadas. Sendo que 36,36 % se apresentaram como representante de *S. chevalieri*, 31,8% de *S. cerevisae* e 22,7% de *S. coreanus*. Como descrito por CABRINI & ROSA (1999) essa metodologia se apresentou eficiente para a classificação das cepas avaliadas neste estudo. Aqueles autores obtiveram 92,3% das suas linhagens identificadas. Neste trabalho 90% das leveduras foram classificadas.

Um fato relevante o qual valida o teste de Taxonomia Numérica é o fato desse ter identificado uma linhagem de *S. cerevisae* ATCC "tipo" como *S. cerevisae*.

A dominância do gênero *Saccharomyces* é um resultado esperado, uma vez que esse, segundo BARNET (1992), é caracterizado pela capacidade de fermentar, em condições de total ou parcial anaerobiose, açúcares em etanol, condições estas encontradas no ambiente de onde essas cepas foram isoladas.

Se forem levadas em conta as considerações feitas por BARNETT (1992) em um trabalho onde esse taxonomista discute sobre gênero de levedura *Saccharomyces* pode-se afirmar que todas as leveduras são pertencente ao gênero *cerevisae*. Esse autor coloca os gêneros *chevalier*, *coreanus*, entre outros, como sinônimo de *S. cerevisae*. Se a chave construída por GRIFFITHS (1981) for analisada em comparação as descrições, quanto aos testes bioquímicos apresentados por BARNETT (1992) nota-se que *S. cerevisae* difere de *S. coreanus* para GRIFFITH (1981) quanto ao crescimento em galactose e lactose como substrato. Enquanto a primeira espécie utiliza os dois açúcares como fonte de carbono a segunda não o faz. Quando se utiliza o teste por BARNETT (1992) o autor apresenta como variável a utilização dos dois açúcares pela espécie *cerevisae*, isto é, ela pode ou não fazer uso desses açúcares. GRIFFITHS (1981) atribui para diferenciar entre as espécies *cerevisae* e *chevalier* a presença de formas celulares alongadas. Enquanto a primeira espécie apresenta esse tipo de células a segunda não o faz.

As duas cepas não identificadas (Dacalda e Barra Grande) mesmo se analisada pelas características descritas por BARNETT (1992) não podem ser classificadas como *S. cerevisae*, uma vez que essa espécie não consome celobiose, açúcar este consumido pelas duas linhagens não identificadas.

De uma forma geral a técnica da taxonomia numérica tem grande aplicação para leveduras isoladas de processos de fermentação alcoólica. Entretanto acredita-se que mesmos sendo 19 cepas caracterizadas como

S. cerevisae se faça necessário um estudo ao nível de "raças" para essas leveduras. Alguns caracteres, como, por exemplo, à floculação, podem ser observados em 6 das linhagens estudadas. Essa característica é atribuída a presença de um gen denominado FLO (LEWIS *et al.*, 1976), que com certeza não está presente em leveduras que não floculam.

O estudo das diferentes linhagens de *S. cerevisae* só pode ser conduzido com a utilização de técnicas de genéticas, as quais estão previstas, como continuidade desse trabalho.

4. BIBLIOGRAFIA

BARNETT, J.A.; PANKHURST. R.J. *A new key to the yeasts*. North Holland Publi.Co, Amsterdam e London, 1974.

BARNETT, J.A. The taxonomy of genus *Sacharomyces* Meyen ex Press: a short review for non-toxonomists, *Yeast*, v.8, p1-23, 1992.

CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de cepas de leveduras no processo de fermentação alcoólica da destilaria Mandú. IN: 7º Congresso STAB, Anais, Londrina, 227-231, 1999.

CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. *Scientia Agrícola*, v.56, n.1, p.1-14, 1999.

GRIFFITHS, A.J. A numenclature of the yeast . *Antonie van Leeuwenhoek*. 47: 547-563,1981.

LEWIS, C.W.; JOHNSTON, J.R.; MARTINN, P.A. The genetics of yeast floculation. *Journal of Institute of Brewing*. 82: 158-160, 1976

LODDER, J. *The yeasts, a taxonomic study*, 2ºed., Amsterdan, 1970

MALTO, M.L. *Estudo de metodologia para caracterização de levedura s da fermentação alcoólica industrial através de taxonomia numérica e potencial fermentativo*. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1997, Tese (Mestrado)

MIGLIARI, P.C. *Classificação das cepas de leveduras dominantes de processos fermentativos utilizando parâmetros fermentativos e taxonomia numérica*. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, 2001, Tese (Mestrado).

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia* Vol 1. MacGraw-Hill do Brasil, 1980. 574p.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia – Conceitos e Aplicações* Vol 1, 2ª ed. Makron Books, 1996.

VAN DER WALT, J.P. The typological yeast species and its delimitation. In: Rose, A.H. e Harrison, J.S. *The Yeasts*. London, Academic Press Vol 1:95-121, 1987.

CAPÍTULO 5

TOLERÂNCIA AO ETANOL

ÍNDICE

Objetivo	101
1. Introdução	101
2. Material e Métodos	104
2.1. Tolerância ao Etanol	104
2.1.1. Condições de Crescimento	104
2.1.2. Condução do Ensaio	105
2.1.3. Cálculo da Tolerância ao Etanol	105
3. Resultados e Discussão	107
4. Bibliografia	112

OBJETIVO

**NESTE CAPÍTULO SÃO APRESENTADOS OS RESULTADOS REFERENTES A
TOLERÂNCIA AO ETANOL PARA AS CEPAS ESTUDADAS**

1. INTRODUÇÃO

Cepas com alta tolerância ao etanol são bastante desejáveis nos processos fermentativos industriais. Linhagens que apresentam esta característica permite uma operação com concentração de etanol no vinho mais elevada. *Saccharomyces cerevisae* é o organismo dentre os procariotas que apresenta uma maior tolerância ao etanol (MISHRA & PRASAD ,1989) sendo que essa característica traz muitas vantagens nos processos industriais podendo citar entre elas:

Economia de vapor na destilação: Com a concentração de etanol mais elevada no vinho é possível operar os aparelhos consumindo menos vapor para uma mesma produção, pois, gasta-se a mesma quantidade de energia para destilar um determinado volume de vinho e se neste volume se encontrar uma maior quantidade de etanol, um volume maior de produto é obtido com o mesmo gasto energético.

Ganho de produtividade dos aparelhos de destilação: Com concentrações elevadas de etanol é possível obter uma quantidade maior de etanol com um mesmo volume de vinho. Desta forma é possível aumentar a produção de um aparelho, mantendo-se a vazão de vinho constante. Todavia deve-se tomar cuidado para não sobrecarregar os condensadores.

Diminuição do volume de vinhaça: Quanto mais concentrado o vinho, menor será o volume de vinhaça gerado na destilação, pois, um volume menor de vinho será necessário para uma dada produção fixa.

Menor necessidade de separadoras centrífugas: Ao se diminuir o volume de vinho necessário para uma dada produção fixa, diminui-se o volume de vinho bruto a ser centrifugado e conseqüentemente a quantidade de máquinas em operação. A operação destas máquinas é dispendiosa, pois, são equipamentos que exigem manutenções freqüentes e consomem uma quantidade significativa de energia.

Pelos motivos descritos acima, busca-se trabalhar sempre com a máxima concentração de etanol possível no vinho, sendo este limitado pelo nível de inibição causado por este produto sobre a cepa de levedura utilizada no processo. Quanto maior for a tolerância da mesma ao etanol, mais elevado pode ser a concentração deste produto no vinho.

Segundo PELCZAR *et al.* (1996) a levedura do genero *Sacharomyces* obtém energia pela degradação de compostos orgânicos que é armazenada principalmente na forma de adenosina trifosfato (ATP) que é formado pela fosforilação da adenosina difosfato (ADP). Existem três vias gerais nas quais a fosforilação da ADP pode ocorrer: fosforilação em nível de substrato, fosforilação oxidativa e fotofosforilação. Na fosforilação oxidativa a energia para a síntese de ATP vem das reações de oxidação. A célula utiliza uma série de reações de oxidação integrada chamadas sistema de transporte de elétron. Este transporte de elétron promove um bombeamento de prótons (H^+) através da membrana, a qual não é permeável a este. Este bombeamento promove um acúmulo de prótons de um lado da membrana gerando uma diferença de carga elétrica promovendo o aparecimento de uma forma de energia potencial chamada força promotiva. Algumas substâncias químicas chamadas desacopladores podem impedir que a energia liberada pelo sistema de

transporte de elétrons seja armazenadas na forma de ATP. Descobriu-se que estas substâncias na verdade acabam destruindo a força promotiva por atuarem como condutores de elétrons. Segundo LEÃO & VAN UDEN (1984) o etanol é uma destas substâncias e promove um aumento exponencial da constante de difusão do fluxo de prótons.

A presença do etanol no meio de fermentação, que é um produto do metabolismo dos microrganismos, faz com que o crescimento celular cesse. Esse efeito é o fator limitante para o aumento no rendimento da fermentação alcoólica. Existem evidências que a toxicidade do álcool é exercida ao nível de membrana citoplasmática. Dessa maneira o entendimento da relação da composição dessa membrana com a tolerância ao etanol pode levar a obtenção de leveduras que suportem uma maior quantidade em etanol e conseqüentemente aumente o rendimento dos processos de fabricação do álcool (MISHRA *et al.*, 1989),

A presença de etanol no meio de fermentação tem influência nas células de leveduras em: crescimento celular (ROSE, 1980); viabilidade das células (THOMAS *et al.*, 1978); composição celular (THOMAS & ROSE, 1979); fluxo de H^+ (LEAO & VAN UDEN, 1984) e na taxa de fermentação (CASEY & INGLEDEW, 1986)

Alguns fatores influenciam a tolerância ao etanol das leveduras. Segundo JIMENEZ & BENITEZ (1987), o crescimento de *Sacharomyces* em meio contendo etanol os lipídios enriquecidos em ácidos graxos C-18:1 são sintetizados. Esta suplementação de ácidos graxos insaturados favorece a tolerância ao etanol pela baixa permeabilidade da membrana citoplasmática. Estes autores acreditam que a permeabilidade da membrana celular é a principal causa da inibição pelo etanol e que esta é afetada pela quantidade de ácidos graxos na mesma. KAJIWARA *et al.* (1996) observou que quando a levedura é induzida a produzir ácidos graxos poli-insaturados, sua resistência ao etanol aumenta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. TOLERÂNCIA AO ETANOL

Utilizou-se metodologia proposta por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985) onde esses pesquisadores apresentam uma técnica rápida que se baseia na queda do pH extracelular. As leveduras mais tolerantes apresentam uma maior queda do pH quando comparadas as menos, em função do etanol provocar um retorno passivo de prótons para dentro da célula, o que faz com que ocorra um aumento do pH extracelular.

2.1.1. Condições de Crescimento

Para a análise de tolerância fez-se um cultivo único, onde todas as cepas foram submetidas às mesmas condições. Este procedimento foi adotado para que não houvesse nenhuma variação nas condições de cultivo (composição do meio, temperatura, agitação, etc).

O cultivo foi realizado em frascos agitados (Erlenmeyers de 500 ml com 300 ml de meio de cultivo estéril) sob temperatura, agitação e tempo controlados (32°C, 180 rpm e 24 horas). O meio de cultivo utilizado foi composto de (g/l): 150g de glicose; 5g de KH_2PO_4 ; 5g de NH_4Cl ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g de KCl; 6g de extrato de levedura e 1g de triptona. O fechamento dos frascos foi feito com rolha e borracha com orifício central onde foi introduzido um tubo de vidro em "L" (com filtro de algodão) para a saída de CO_2 produzido durante a fermentação. O vinho fermentado foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a massa celular novamente centrifugada nas mesmas condições (5 minutos a 5000 rpm) para retirada de possíveis interferentes. A massa celular foi então utilizada para a análise.

2.1.2. Condução do Ensaio

Suspensão de leveduras: As leveduras foram ressuspensas em água destilada de forma a se obter uma suspensão contendo 30% de células (v/v).

Soluções de etanol: Foram preparadas nas concentrações de 0; 2,4; 4,8; 7,2; 9,6 e 12% (v/v) para que as concentrações finais fossem respectivamente 0; 2; 4; 6; 8 e 10 (v/v) de etanol.

Solução de glicose: Preparada em água destilada em concentração de 20%

Frascos contendo 10 ml de solução de etanol (0 a 10%), 1 ml de suspensão de levedura a 30% (v/v) e 1 ml de glicose a 20%. Foram incubados em "shaker" a 150 rpm, 30°C por 2 horas. No final do tempo de incubação foi medido o pH para cada uma das concentrações de etanol. As amostras foram feitas em duplicatas.

2.1.3. Cálculo da Tolerância ao Etanol

A tolerância ou sensibilidade das leveduras ao etanol é expressa pelo parâmetro k , sendo este uma constante exponencial de difusão de prótons. Este parâmetro é determinado através da queda do pH em função da concentração de etanol.

A constante de difusão aumenta exponencialmente com a concentração de etanol e com o parâmetro k , expressa pela seguinte equação:

$$C_x = C_0 e^{kx}$$

onde C_x e C_o são valores das constantes de difusão na concentração X e zero de etanol. Consequentemente a concentração de etanol aumenta o valor do pH final, segundo a equação:

$$\text{pHf} = kX\log_{10}e + (\log_{10}C_o - \log_{10}k_p)$$

Essa equação é do tipo $y = ax + b$, onde:

y = pH final

x = concentração do etanol em molaridade $\times \log_{10}e$

a = coeficiente angular = $k \text{ (M}^{-1}\text{)}$

b = coeficiente linear = $\log_{10}C_o - \log_{10}k_p$

Assim, o valor de k é determinado através de uma correlação linear entre o pH versus $X \log_{10}e$. Quanto maior o valor de k , maior será a sensibilidade da levedura ao etanol, ou seja, menor será sua tolerância ao mesmo. O coeficiente de correlação deve ser superior a 0,95 para que o resultado seja considerado satisfatório.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 5.1 mostra os resultados obtidos da análise de tolerância ao etanol.

Tabela 5.1 – Valores de $k(1/M)$ encontrados para cada cepa.

USINA	K (1/M)	USINA	k (1/M)
Alvorada	0,333	Andrade	0,308
Unialco	0,396	Dacal	0,415
Diamante	0,472	Dacalda	0,451
Diana	0,510	Alcoeste	0,434
Jalles Machado	0,522	Corol	0,326
Junqueira	0,558	Y-904	0,488
Goiasa	0,653	Y-167	0,390
Vale Rosário	0,421	Barra Grande	0,217
Bonfim	0,482	Santa Cruz	0,234
Costa Pinto	0,611	Clealco	0,166
Guarani	0,510	<i>S.cerevisae</i> ATCC 7752	0,354

Pode-se observar pela Tabela 5.1 uma variação nos resultados obtidos em relação aos valores de k que abrangem valores de 0,166 até 0,653 1/M. Desta forma pode-se verificar que dentre as 22 cepas estudadas encontram-se cepas com diferentes níveis de tolerância ao etanol.

Pelos resultados obtidos, nota-se que as cepas Clealco e Barra Grande são as que possuem o menor valor da constante k (0,166 e 0,217 1/M respectivamente), que segundo JIMÉNEZ & Van UDEN (1985) implica na maior tolerância ao etanol entre as cepas testadas. Já as cepas Goiás e Costa Pinto foram as que apresentaram os maiores valores para a constante k (0,653 e 0,611 1/M), sendo portanto as menos tolerantes ao etanol entre as cepas testadas.

As Figuras 5.1 a e b mostram o histograma e o gráfico de probabilidade normal para os valores da constante k para as 22 cepas testadas. Os dados, como mostram as Figuras 5.1.a e b, se ajustam bem ao modelo de distribuição normal ou Gaussiana.

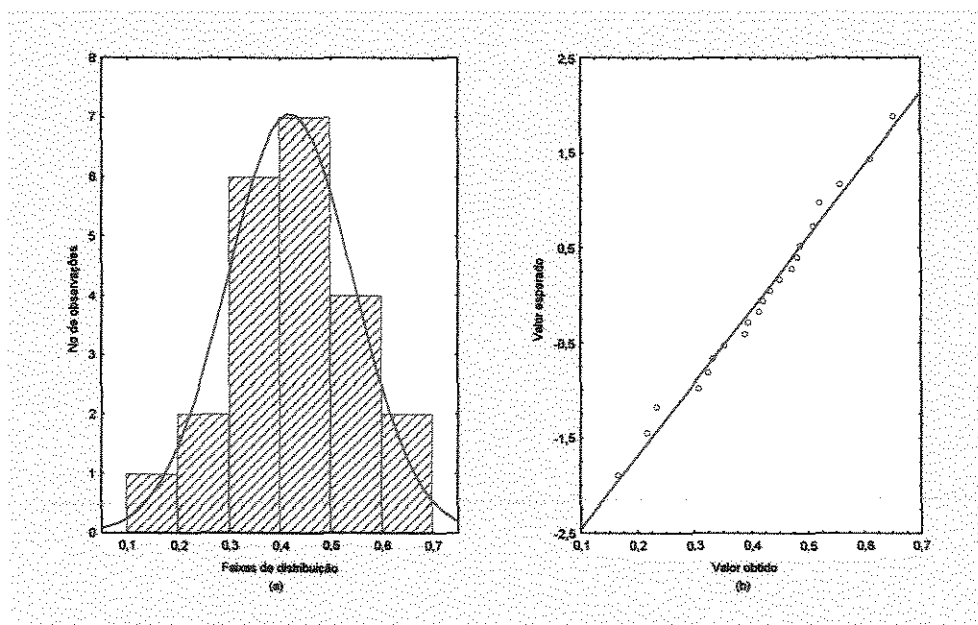


Figura 5.1 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores da constante k

A Tabela 5.2 mostra a média dos valores da constante k, assim como, a variância e o intervalo de confiança ao nível de 95% para as 22 cepas testadas.

Tabela 5.2 - Valores da média, dos intervalos de confiança (-95% e +95%), da variância e do desvio obtidos estatisticamente para os resultados da tolerância do etanol.

Média	- 95%	+ 95%	Variância	Desvio
0,4205	0,3654	0,4756	0,0154	0,1242

Com base nos dados da Tabela 5.2 pode-se separar as cepas em três grupos distintos: a) os de valores da constante k abaixo do limite inferior do intervalo de confiança (Alvorada, Andrade, Corol, Barra Grande, Santa Cruz, Clealco e a *Saccharomyces cerevisae* ATCC 7752); b) os valores contidos no intervalo de confiança (Unialco, Diamante, Vale do Rosário, Dacal, Dacalda, Alcoeste e Y167) e c) os valores acima do limite superior do intervalo de confiança (Diana, Jalles Machado, Junqueira, Goiasa, Bonfim, Costa Pinto, Guarani e Y904). Segundo JIMÉNEZ & Van UDEN (1985), as cepas contidas no grupo "a" são as que possuem maior tolerância ao etanol e as do grupo "c" são as que possuem a menor tolerância. Os valores da constante k encontrados por estes autores, para diversas cepas *Saccharomyces cerevisae* isoladas de diferentes regiões produtoras e vinho variaram entre 0,26 a 0,80 1/M, os quais estão bastante próximo aos obtidos neste trabalho.

4. BIBLIOGRAFIA

CASEY, G.P; INGLEDEW, W.M. Ethanol tolerance in yeast. *CRC Crit. Rev. Microbiolo* 13: 219-280, 1986.

JIMÉNEZ, J.; BENITEZ, T. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. *Appl. and Environmental Microbiology*, Washington, D.C., v.53, n.5, p.1196-1198, May, 1987.

JIMÉNEZ, J.; VAN UDEN, N., Use of extracellular acidification for the rapid testing of ethanol tolerance in yeasts. *Biotechnology Bioengineering*, 27: 1596-1598, 1985.

KAJIWARA, S.; SHIRA, A.; FUJII, T.; TOGURI, T.; NAKAMURA, K; OHTAGUCHI, K. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of ethanol tolerance and the FAD2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*. 30: 24-298, 1996.

LEAO, C.; VAN UDEN, N. Effect of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys Acta* 774:43-48, 1984.

MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae* *Applied and Microbiology and Biotechnology* . 30: 24-298, 1989.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia – Conceitos e Aplicações* Vol 1, 2ª ed. Makron Books, 1996.

ROSE, A.H. Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae* IN: Skinner FA, Passmore SM, Danvenport RR (ed) *Biology and Activity of yeast*. London, Academic Press, p103.

THOMAS, S.D.;HOSSACK, J.A.; ROSE, A.H. Plasma menbrane lipids composition and ethanol tolerance in *Saccaromyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 117: 239-245, 1978.

THOMAS, S.D; ROSE, A.H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccaromyces cerevisiae* as affected by plasma menbrana composition. *Arch. Microbiol.* 122: 49-55, 1979.

CAPÍTULO 6

COMPOSIÇÃO CELULAR: TREALOSE

ÍNDICE

Objetivo	117
1. Introdução	117
2. Material e Métodos	120
2.1. Condições de Crescimento	120
2.2. Metodologia Analítica	121
2.2.1. Extração	121
2.3. Quantificação da Trealose	121
3. Resultados e Discussão	122
3.1. Avaliação da Precisão do Método	122
3.2. Teores de Trealose nas Cepas Estudadas	124
4. Bibliografia	128

OBJETIVO

***NESTE CAPÍTULO SÃO APRESENTADOS OS RESULTADOS REFERENTE À
QUANTIDADE DE TREALOSE PRESENTE EM CADA UMAS DAS CEPAS, QUANDO
ESSAS SÃO COLACADAS NAS MESMAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.***

1. INTRODUÇÃO

A trealose (α -D-glucopiranosil, (1,1) α -D-Glucopiranoside) é um dissacarídeo não redutor constituído por duas unidades de glicose. É um importante composto de armazenamento de células vegetativas e esporos de fungos, sendo que esses organismos também apresentam glicogênio como carboidrato de reserva (GUTIERREZ, 1994).

A biossíntese da trealose é realizada pelas enzimas sintetase de trealose-6-fosfato e trealose-6-fosfatase. Nos períodos de mobilização é hidrolisada pela enzima trealase (THEVELEIN & HOHMANN, 1995).

Em *Saccharomyces cerevisiae* esta molécula constitui cerca de 15% da massa seca da célula durante a privação de nutrientes e em condições de stress como choques de temperatura, etanol e pressão osmótica (LILLIE & PRINGLE, 1980). HOTTIGER *et al.* (1987) e RIBEIRO *et al.* (1994) descrevem que um choque de temperatura induz o acúmulo de trealose. Embora a trealose seja um composto de reserva, o seu papel como protetora de stress em leveduras tem sido bem reconhecido (VAN LAERE, 1989 e WIEMKEN, 1990).

Saccharomyces cerevisiae é capaz de acumular glicogênio e trealose, quando colocadas em diferentes condições de crescimento. Esses

sacarídeos tem um papel em manutenção, diferenciação e sobrevivência. A trealose pode representar um papel importante na preservação da integridade da membrana celular, o que poderia justificar a existência dos dois carboidratos de reserva. Se as leveduras se apresentam com dois carboidratos de reserva e possuem um metabolismo com mecanismo de controle sofisticado, pode-se alertar a uma possível relevância desses compostos na fisiologia das células de leveduras (PANEK & PANEK, 1990).

Em estudos realizados "in vivo" e "in vitro" a trealose tem a propriedade de proteção biológica das membranas e proteínas, sugerindo que a trealose tem um duplo papel tanto como de reserva de carboidratos e de energia como o de protetora de stress em *Saccharomyces cerevisiae* (WIEMKEN, 1990; SINGER & LINQUIST, 1998).

Segundo THEVELEN (1984) e LILLIE & PRINGLE (1980) o acúmulo de trealose em fungos parece estar associado, de maneira geral, com períodos de reduzida taxa de crescimento. LILLIE & PRINGLE (1980) acreditam que a mobilização da trealose ocorre durante o processo de diferenciação e períodos de privação. Foram observadas correlações entre a taxa de crescimento e o acúmulo de trealose em *Saccharomyces cerevisiae* (KUENZI & FIECHTER, 1972) e também que a trealose é metabolizada durante a germinação de esporos (FERGUSON *et al.*, 1973).

Em leveduras, a privação por glicose, nitrogênio, fosfato e enxofre induz o acúmulo de trealose. Um aumento no nível de trealose é também observado durante o crescimento de células na fase de transição e repouso das células (PANEK & MATTOON, 1977). Um processo de maturação de 2 horas, após alimentação de glicose, induz o acúmulo de cerca de 20% de trealose em massa seca, acarretando em um aumento da capacidade e viabilidade da biomassa (GRBA *et al.*, 1975).

A trealose contida em leveduras de panificação esta associada como uma substância chave para sua resistência ao stress (TRIVEDI & JACOBSON, 1986). Esse açúcar, pelo seu papel protetor, tem recebido grande atenção na produção de "levedura seca instantânea" e na preservação da viabilidade de leveduras em situação de congelamento (GÉLINAS *et al.*, 1991 e VAN DIJCK *et al.*, 1995).

ODA *et al.* (1986) também discute a possível função da trealose como a de proteger as leveduras contra o congelamento.

THEVELEIN (1984), defende que a trealose parece servir principalmente como carboidrato de reserva durante os períodos de não-proliferação. É também importante para a manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento de leveduras de panificação (SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961), tendo sido demonstrado por LILLIE & PRINGLE (1980) que durante prolongado jejum a sobrevivência da célula da levedura depende principalmente do nível de trealose.

O desenvolvimento da resistência à pressão osmótica segundo MACKENZIE *et al.* (1988) foi acompanhado por um acúmulo de trealose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise de trealose fez-se um cultivo único, onde todas as cepas foram submetidas às mesmas condições. Este procedimento foi adotado para que não houvesse nenhuma variação nas condições de cultivo (composição do meio, temperatura, agitação, etc.), uma vez que essas variações influenciam na quantidade de trealose acumulada.

2.1. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O cultivo foi realizado em frascos agitados (Erlenmeyers de 500 ml com 300 ml de meio de cultivo estéril) sob temperatura, agitação e tempo controlados (32°C, 180 rpm e 24 horas). O meio de cultivo utilizado foi composto de (g/l): 150g de glicose; 5g de KH_2PO_4 ; 5g de NH_4Cl ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g de KCl; 6g de extrato de levedura e 1g de triptona. O fechamento dos frascos foi feito com rolha e borracha com orifício central onde foi introduzido um tubo de vidro em "L" (com filtro de algodão) para a saída de CO_2 produzido durante a fermentação. O vinho fermentado foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a massa celular novamente centrifugada nas mesmas condições (5 minutos a 5000 rpm) para retirada de possíveis interferentes. A massa celular foi seca em estufa a 60 °C até peso constante.

2.2. METODOLOGIA ANALÍTICA

A trealose, depois de extraída da massa celular, foi quantificada utilizando-se cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

2.2.1. Extração

A trealose foi extraída como descrito por FERREIRA *et al.* (1997). A quantidade utilizada foi de 40 mg de massa seca dissolvida em 2 ml de etanol. Essa mistura foi levada a ebulição. O etanol foi evaporado e o resíduo dissolvido em 10 ml de água nanopure.

2.3. QUANTIFICAÇÃO DA TREALOSE

Equipamento: DIONEX acoplado a um detector de índice de refração (Waters, modelo R 401) com integrador DIONEX 4400.

Coluna: troca iônica na forma hidrogênio (300x7,8mm) acoplada a uma pré-coluna, ambas com a mesma fase estacionária (SDVB na forma hidrogênio),

Fase móvel: H₂SO₄ 0,1N

Condições de operação: Temperatura da coluna: 35 °C; Fluxo: 0,5ml/min; volume de injeção: 25 µl.

A identificação e a quantificação foram feitas pela comparação do tempo de retenção e da altura dos picos dos padrões de diferentes concentrações de trealose. A linearidade foi checada com padrões de trealose usando 6 pontos na faixa de 29,20 à 325,76 ppm, no qual foi perfeitamente adequada para cobrir a faixa de interesse. A precisão do método foi assegurada pelo cálculo do coeficiente de variação dos dados obtidos de 5 diferentes extrações da mesma amostra (Goiasa).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. AVALIAÇÃO DA PRECISÃO DO MÉTODO

A Tabela 6.1 mostra os resultados obtidos das repetições, assim como, a média, os desvios de cada valor individual em relação à média, a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Tabela 6.1 – Porcentagem de trealose (%), média das porcentagens ($\bar{x}$), desvios individuais em relação à média (d^2), variância (V), desvio padrão (s) em porcentagem (%) e o coeficiente de variação (CV) em porcentagem (%).

Repetição	% Trealose	$\bar{x}$	d^2	V	s (%)	CV (%)
1	6,27	6,31	0,0016	0,0286	0,17	2,7
2	6,08	6,31	0,0529			
3	6,27	6,31	0,0016			
4	6,39	6,31	0,0064			
5	6,54	6,31	0,0529			

onde:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i ; d^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 ; V = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N d_i^2 ; s = \sqrt{V} ; CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$

sendo:

$N = n^0$ total de amostras

$X_i = i$ – iésimo valor

Pelos dados contidos na Tabela 6.1, observa-se que o coeficiente de correlação (CV) para as cinco repetições realizadas foi de 2,7%, o que dá ao método uma excelente precisão. FERREIRA *et al.* (1997) obteve um coeficiente de correlação para seu método analítico para a determinação de trealose de 5,1%.

Como pode ser observado este método utilizando um sistema HPLC (bomba, forno e detector de índice de refração) mostra uma precisão adequada e uma simplicidade para análise de rotina de trealose em cepas de leveduras de origem industrial. A coluna de troca iônica e a fase móvel utilizada foram perfeitamente adequadas para esta determinação. O método mostra uma boa linearidade para concentrações entre 25 a 330 ppm de trealose o que é comprovado pelo coeficiente de correlação de 0,999 obtido pela curva padrão.

O detector utilizado (índice de refração) é um detector que possui baixa sensibilidade e seletividade. Entretanto essas características não chegam a comprometer a precisão desta análise, pois, na extração desta substância é possível separar a trealose dos interferentes, obtendo um extrato límpido e em concentrações adequadas a este tipo de detector. A identificação da trealose foi confirmada pela comparação do tempo de retenção do padrão injetado.

3.2. TEORES DE TREALOSE NAS CEPAS ESTUDADAS

A Tabela 6.2 mostra os resultados obtidos para análise de trealose.

Tabela 6.2 – Resultados em % de trealose.

USINA	% TREALOSE	USINA	% TREALOSE
Alvorada	4,07	Andrade	5,61
Unialco	< 0,02	Dacal	1,76
Diamante	4,03	Dacalda	< 0,02
Diana	6,33	Alcoeste	0,71
Jalles Machado	2,07	Corol	5,13
Junqueira	1,27	Y-904	4,74
Goiasa	6,17	Y-167	0,47
Vale Rosário	0,45	Barra Grande	2,78
Bonfim	1,74	Santa Cruz	1,94
Costa Pinto	1,52	Clealco	4,23
Guarani	1,94	<i>S.cerevisae</i> ATCC 7752	< 0,02

Como pode ser observado existe uma variação significativa nos resultados encontrados. A concentração varia de 0,47 a 6,3%.

A Figura 6.1 mostra o ajuste das concentrações de trealose obtidos para as cepas estudadas em um modelo de distribuição normal.

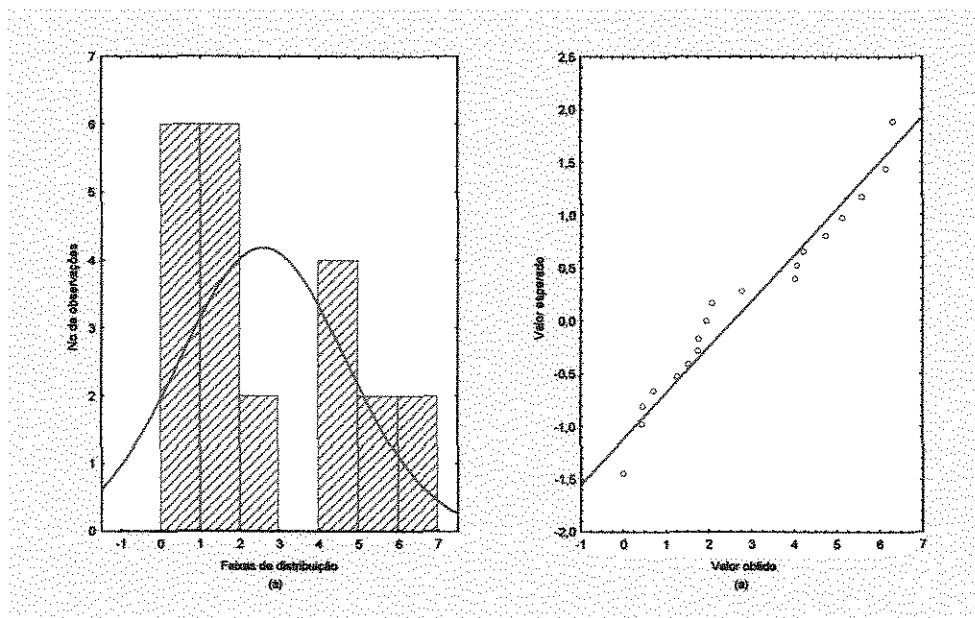


Figura 6.1 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de trealose.

Observa-se pela Figura 6.1 que os dados obtidos para concentração de trealose se ajustam satisfatoriamente ao modelo de distribuição normal.

A Tabela 6.3. mostra a média dos valores da concentração de trealose (%), assim como, a variância e o intervalo de confiança ao nível de 95% para as 22 cepas testadas.

Tabela 6.3 - Valores da média, dos intervalos de confiança (-95% e +95%), da variância e do desvio obtidos estatisticamente para os resultados da concentração de trealose (%).

Média	- 95%	+ 95%	Variância	Desvio
2,5891	1,6604	3,5178	4,3873	2,0946

Utilizando os resultados contidos na Tabela 6.3. pode-se separar as cepas em 3 grupos distintos: a) os de valores da concentração de trealose abaixo do limite inferior do intervalo de confiança (Unialco, Junqueira, Vale do Rosário, Costa Pinto, Dacalda, Alcoeste, Y 167 e a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7752); b) os valores contidos no intervalo de confiança (Jalles Machado, Bonfim, Guarani, Dacal, Barra Grande e Santa Cruz) e c) os valores acima do limite superior do intervalo de confiança (Alvorada, Diamante, Diana, Goiasa, Andrade, Corol, Y 904 e Clealco).

Segundo WIEMKEN (1990), SINGER & LINQUIST (1998) e VAN LAERE (1989), a trealose está associada à resistência ao stress da levedura. Desta forma, pode-se afirmar que as cepas pertencentes ao grupo "c" sejam mais resistentes ao stress quando comparadas as pertencentes ao grupo "a".

Algumas cepas classificadas no capítulo 5 como resistente ao etanol, apresentaram alta concentração de trealose, mas em contrapartida, a cepa Goisa que apresentou o maior valor da constante k, ou seja, menor tolerância ao etanol, apresentou uma das maiores concentrações de trealose. Não foi possível desta forma, correlacionar estas duas variáveis utilizando os resultados obtidos neste trabalho.

Todavia, as concentrações de trealose encontradas nas cepas testadas podem estar relacionadas com as condições nas quais estas foram isoladas. Em unidades onde as condições de operação levam a levedura a um maior grau de stress, cepas com teores de trealose mais elevados podem ser favorecidas no processo de seleção.

4. BIBLIOGRAFIA

FERGUNSON, A.H., MITCHELL, M. & ELBEIN, A.D. Trehalose metabolism in germinating spores of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bacteriology*, 116(2), 1084-1085, 1973.

FERREIRA, J.C., PASCHOALI, V.M., PANEK, A. & TRUGO, L.C. Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. *Food Chemistry*, 60(2), 251-254, 1997.

GÉLINAS, P., FISET, G., WILLEMOT, C. & GOULET, J. Lipid content and cryotolerance of Baker's yeast in frozen doughs. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 463-468, 1991.

GRBA, S., OURA, E. & SUOMALAINEN, H. On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. *European Journal of Applied Microbiology*, 2, 29-37, 1975.

GUTIERREZ, LUIZ EDUARDO. *Tópicos de Bioquímica de Leveduras*. NAPMA publicação nº 1, 1994.

HOTTIGER, T., SCHMUTZ, P. & WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 169: 5518-5522, 1987.

KUENZI, M.T. & FEICHTER, A. Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. *Archives of Microbiology*, 84, 254-265, 1972.

LILLIE, SUE H. & PRINGLE, JOHN R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology*, 143: 1384-1394, 1980.

MACKENZIE, K.F., SINGH, K.K. & BROWN, A.D. Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 134, 1661-1666, 1988.

ODA, Y., UNO, K. & OHTA, S. Selection of yeast for breadmaking by the frozen dough method. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 941-943, 1986.

PANEK, A.D. & MATTOON, J.R. Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 183, 306-316, 1977.

PANEK, ANITA D. & PANEK, ANA C. Metabolism and thermotolerance function of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*: a current perspective. *Journal of Biotechnology*, 14, 229-238, 1990.

RIBEIRO, M.J.S., SILVA, J.T. & PANEK, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during heat-shock. *Biochimical Biophys. Acta* 1200, 139-147, 1994.

SINGER, M.A. & LINQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *Trends of Biotechnology*, 16, 460-468, 1998.

SUOMALAINEN, H. & PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. *Journal of the Institute of Brewing*, 67, 249-254, 1961.

THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in Fungi. *Microbiological Reviews*, 48(1), 42-59, 1984.

THEVELEIN, J.M. & HOHMANN, S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yast? *Trend Biochemistry Science*, 20, 3-10, 1995.

TRIVEDI, N.B. & JACOBSON, G. Recent advances in baker's yeast. *Progress in Industrial Microbiology*, 23, 45-71, 1986.

VAN DIJCK, P. COLAVIZZA, D. SMET, P. & THEVELEIN, J.M. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and non-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Enviromental Microbiology*, 61, 109-115, 1995.

VAN LAERE, A. Trehalose, reserve and/or stress metabolite/ *FEMS Microbiology Review* 63, 201-210, 1989.

WIEMKEM, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antoine van Leeuwenhoek* 58, 209-217.

CAPÍTULO 7

COMPOSIÇÃO CELULAR: PROTEÍNA/AMINOÁCIDOS

ÍNDICE

Objetivo	133
1. Introdução	133
2. Material e Métodos	136
2.1. Condições de Crescimento	136
2.2. Determinação de Proteína na Massa de Levedura Seca	137
2.3. Determinação dos Aminoácidos	139
2.3.1. Metodologia	139
2.4. Quantificação dos Aminoácidos	139
2.5. Tratamento Estatístico dos Dados	141
3. Resultados e Discussão	142
4. Bibliografia	178

OBJETIVO

NESTE CAPÍTULO O OBJETIVO FOI O DE DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS ASSIM COMO AVALIAR A DISTRIBUIÇÃO DE AMINOÁCIDOS NESSAS, PARA AS 21 CEPAS CULTIVADAS SOB AS MESMAS CONDIÇÕES.

1. INTRODUÇÃO

A levedura se apresenta como fonte abundante de proteína. A proteína bruta contida em leveduras ($N_{total} \times 6,25$) situa-se entre 45-55%, dependendo da linhagem e das condições de crescimento (REED, 1981). Cerca de 80% do nitrogênio encontra-se na forma de aminoácidos, 12% na forma de ácidos nucleicos, 8% como amônia e quantidades menores na forma de lecitina, glutatona, ácido adalínico, vitaminas e coenzimas (PEPPLER, 1970).

As leveduras são distinguidas pelo seu alto conteúdo de lisina, no qual fazem delas um bom suplemento de proteína para produtos de cereais (REED, 1981), os quais são deficientes neste aminoácido.

O teor de proteína de *Saccharomyces cerevisiae* é elevado quando comparado a outras fontes protéicas convencionais, sendo superior ao do trigo e do leite e um pouco inferior ao do ovo e da carne (MATELES & TANNENBAUM, 1968).

A produção de levedura seca tem sido produzida em destilarias de álcool, como sub produto da produção de etanol. A Usina São Martinho, por exemplo, que uma das maiores unidades produtoras de álcool e açúcar do mundo, produz aproximadamente 2,0 milhões de litros de álcool/dia,

tendo portanto potencial para gerar 40 toneladas de levedura seca/dia (FURCO, 1996).

A composição química da levedura é amplamente afetada pelas condições químicas e físicas do meio de crescimento, pela espécie e idade da cultura e pela taxa de crescimento, mas basicamente a biomassa de levedura seca pode ser resumida como tendo alto teor de proteína, alto conteúdo de ácidos nucléicos, baixo conteúdo de lipídios, alto conteúdo de cinzas, conteúdo moderado de carboidratos e alto conteúdo de vitaminas (AIBA *et al.*, 1971 e HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). O substrato utilizado é o mais importante, afetando tanto a taxa de crescimento como a composição, principalmente em proteínas e lipídios (HSE, 1961 e VANANUVAT & KINSELLA, 1975).

A Tabela 7.1 mostra a composição química aproximada da levedura seca que é um sub produto da fermentação alcoólica. É importante salientar que no processo de recuperação da levedura, as lavagens sucessivas com água, para eliminar as impurezas do leite de levedo ou do resíduo de fundo de dorna, podem acarretar significativas variações na composição da levedura.

Tabela 7.1 – Composição química aproximada da levedura seca de fermentação alcoólica

Componentes(%)	Fontes			
	MYIADA (1978)	FIALHO <i>et al.</i> (1983)	LIMA (1983)	MOREIRA (1984)
Matéria Seca	90,70	93,90	92,44	96,40
Proteína	30,77	30,62	29,17	30,23
Aminoácidos	25,75	-	25,87	30,62
Lipídios	1,10	1,60	1,22	0,89
Fibra	0,13	2,35	0,79	0,72
Cinzas	9,81	9,82	11,81	14,43
Cálcio	1,48	1,19	1,23	1,52
Fósforo	0,75	0,67	0,59	0,68

Fonte: LAHR FILHO *et al.* (1996)

Em um processo de fermentação, sob condições de “stress”, ou seja, sob temperatura acima de 37°C períodos longos (até 12 horas), com agitação constante e na ausência de uma fonte de carbono, a composição da levedura pode ser alterada. Nestas condições as substâncias de reservas, principalmente os carboidratos acumulados durante a fermentação, são metabolizados liberando energia para as atividades biológicas da célula (LAHR FILHO *et al.*, 1996).

A composição química bruta da biomassa da levedura é de 7,5-9,0% de nitrogênio, 47-56% de proteína (fator 6,25), 6-15% de ácidos nucleicos, 5,0-9,5% de cinzas e 2-6% de lipídios (REED, 1982 e KINSELLA, 1987).

Dentre os aminoácidos determinados em *Saccharomyces cerevisiae* destacam-se lisina (8,43%), leucina (8,13%), valina (6,67%), arginina (5,35%), treonina (5,20%), isoleucina (5,19%), tirosina (4,87%), fenilalanina (4,50%) e outros como histidina, cistina, metionina e triptofano (REED, 1982).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O cultivo foi realizado em frascos agitados (Erlenmeyers de 500 ml com 300 ml de meio de cultivo estéril) sob temperatura, agitação e tempo controlados (32°C, 180 rpm e 24 horas). O meio de cultivo utilizado foi composto de (g/l): 150g de glicose; 5g de KH_2PO_4 ; 5g de NH_4Cl ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g de KCl; 6g de extrato de levedura. O fechamento dos frascos foi feito com rolha e borracha com orifício central onde foi introduzido um tubo de vidro em "L" (com filtro de algodão) para a saída de CO_2 produzido durante a fermentação. O vinho fermentado foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a massa celular novamente centrifugada nas mesmas condições (5 minutos a 5000 rpm) para retirada de possíveis interferentes. A massa celular foi seca em estufa a 60 °C até peso constante.

2.2. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA NA MASSA DE LEVEDURA SECA

O método utilizado foi o de Kjeldahl, o qual se presta para determinação do nitrogênio contido em matérias orgânica, incluindo o nitrogênio protéico e outros compostos nitrogenados não protéicos como aminas, amidas, aminoácidos livres e nitrilas. Neste caso o resultado obtido é expresso em nitrogênio total. Para obter-se o teor de proteína, o nitrogênio total quando é predominante protéico pode ser corrigido pelo fator de conversão de 6,25.

O método de Kjeldahl inclui 3 etapas:

(1) digestão rápida (5 min): É feita com 0,2 g de amostra, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado e 10 ml de água oxigenada 50%, 450°C, sem adição de nenhum sal coadjuvante da digestão, em bloco digestor (Digesdahl). Este é individual e é constituído por um sistema de aquecimento e um condensador que impede a perda dos vapores formados durante a digestão.

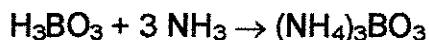
Nessa fase as proteínas e os compostos nitrogenados são decompostos e forma-se o sulfato de amônia.



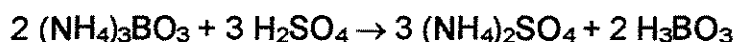
O balão com a amostra digerida é retirado do bloco digestor, resfriado a temperatura ambiente e o volume completado para 100 ml, com água destilada.

(2) destilação da amostra: 25 ml da solução acima são tratadas com 20 ml de solução de hidróxido de sódio 50%. O sulfato de amônia em presença de NaOH libera NH_3 que é recolhido em 50 ml de uma solução de ácido bórico 2% com indicador misto (AOAC, 1984). A referida solução é obtida pela adição de 5 ml de solução de vermelho de metila 0,1% e 25

ml de verde de bromocresol 0,1% (ambos em etanol absoluto), a 1 litro de solução de ácido bórico 2%.



(3) titulação da solução ácido bórico-destilado: onde o NH_3 da solução de H_3BO_3 é titulado com H_2SO_4 0,1 N. O ácido sulfúrico 0,1 N é padronizado com Na_2CO_3 .



O nitrogênio protéico é calculado através da equação abaixo:

$$\% \text{PROT} = \frac{(V_{H_2SO_4} - V_{H_2SO_4 \text{ br}}) \times 14,007 \times N(H_2SO_4) \times 10.000 \times 6,25}{25 \text{ ml} \times \text{massa amostra (mg)}}$$

onde:

$V_{H_2SO_4}$ – volume de H_2SO_4 gasto na titulação da amostra (ml)

$V_{H_2SO_4 \text{ br}}$ – volume de H_2SO_4 gasto na titulação do branco (ml)

14,007 – peso molecular do nitrogênio

$N(H_2SO_4)$ – normalidade do H_2SO_4

10.000 – fator de correção da unidade

6,25 – fator de conversão para obtenção do nitrogênio protéico

25 – volume da amostra para titulação (ml)

massa da amostra – quantidade (g) de massa celular de levedura seca

% PROT – porcentagem de proteína

2.3. DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos foram determinados através de cromatografia líquida alta pressão (HPLC).

2.3.1. Metodologia

Pesou-se o equivalente a 25 mg de proteína de amostra e hidrolisou-se com 10 ml de HCl 6,0 N a vácuo, à temperatura de 110°C por 22 horas. A amostra foi recuperada em diluente pH 2,2 (marca Pickering). Uma alíquota de 25 µl foi injetada no analisador Dionex DX 300 para separação dos aminoácidos em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina, usando-se como referência solução padrão de aminoácidos Pierce (SPACKMAN *et al.*, 1958).

2.4. QUANTIFICAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

Equipamento: DIONEX DX 300 configurado em analisador de aminoácidos.

Coluna: troca catiônica (250x4mm) acoplada a uma pré-coluna

Fase móvel: Gradiente com hidróxido de sódio, acetato de sódio, tetraborato de sódio e metanol.

Condições de operação: Temperatura da coluna: 35 °C; Fluxo: 1,0ml/min; volume de injeção: 25 µl.

Pós-coluna: reagente ninidrina com fluxo de 0,66 ml/min

Detector: UV/VIS, 440 e 570 nm

Princípio do método

A análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica requer o uso de uma coluna recheada com partículas de material constituído de um substrato rígido e polimérico, que é a fase estacionária, como por exemplo, poliestireno divinilbenzeno com adição de ácido sulfúrico. Sendo altamente carregado, o soluto tem cargas de sinais contrários aos da fase estacionária e são seletivamente adsorvidos. Os solutos adsorvidos podem ser subsequenteiramente eluídos, por deslocamento com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Uma fase móvel consiste de uma solução tampão com pH e força iônica conhecidos, que é adsorvido através da coluna até que ocorra uma competição entre as propriedades dos eluentes com as do tampão. Na separação de aminoácidos, eles eluem com tempos de retenção específicos para cada aminoácido. Posteriormente reagem com solução de ninidrina formando um complexo colorido, que absorve luz na região visível do espectro e são registrados em forma de cromatogramas. Estes cromatogramas são comparados quantitativamente com outros cromatogramas de solução padrão de aminoácidos.

A hidrólise da proteína ou polipeptídeo mostra um papel importante na determinação do conteúdo de aminoácidos. A presença de 20 diferentes aminoácidos requer o uso de um agente hidrolítico de ampla especificidade. Deve-se considerar a estabilidade dos diferentes grupos funcionais presentes na proteína nesse agente hidrolítico. O método de hidrólise ácida utilizando-se ácido clorídrico é o mais usado para hidrólise de proteínas.

2.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

A utilização da composição celular como método para a caracterização de cepas de levedura é utilizado com uma certa frequência pelas indústrias de cerveja e vinho. Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura tais como: KINSELLA (1987), HALÁSZ & LÁSZTITY (1991), etc. No entanto este tipo de trabalho é praticamente inexistente para cepas de levedura de uso industrial para obtenção de álcool combustível. Sendo este um trabalho pioneiro, possui uma característica exploratória e portanto seus resultados devem ser analisados de uma forma que permitam inferir sobre uma população muito mais abrangente do que aquela representada por estas 21 cepas estudadas. Desta forma, optou-se por uma análise estatística onde as cepas estudadas foram consideradas uma amostra representativa de uma população formada pelas cepas dominantes de processos fermentativos industriais da região centro sul do Brasil. Desta forma, primeiramente foi avaliado o nível de ajuste dos resultados obtidos ao modelo de distribuição normal ou Gaussiana. Em seguida foram determinadas as médias amostrais, variâncias amostrais, desvio padrão amostrais e o intervalo de confiança ao nível de 95% para a concentração de proteína e para a fração percentual de cada aminoácido em relação a proteína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 7.2^a, 7.2^b, 7.3^c e 7.2^d, mostram os resultados de proteínas e aminoácidos obtidos para cada cepa.

Tabela 7.2^a – Resultados da análise de % proteínas e perfil de aminoácidos para 06 das 21 cepas testadas

Aminoácidos (g/100g proteína)	Alvorada	Unialcol	Diamante	Diana	J.Machado	Junqueira
Ac. Aspártico	11,49	11,75	11,43	12,42	13,00	11,42
Treonina	5,88	5,89	5,07	5,58	5,64	5,01
Serina	5,83	6,08	5,41	6,28	6,36	5,54
Ac. Glutâmico	12,57	12,48	11,21	12,04	12,64	10,77
Prolina	4,21	3,82	3,82	3,94	3,84	3,64
Glicina	5,02	4,74	4,48	5,00	5,41	4,47
Alanina	6,88	7,01	6,14	7,21	7,52	6,53
Cistina	0,50	0,45	0,31	0,42	0,36	0,20
Valina	5,52	5,70	3,67	4,41	4,39	3,58
Metionina	1,24	0,63	1,30	1,38	1,89	1,10
Isoleucina	4,88	4,62	3,01	3,41	3,43	2,93
Leucina	8,09	8,12	6,78	7,45	7,59	6,59
Tirosina	3,97	4,08	3,39	3,73	3,77	3,40
Fenilalanina	4,93	4,97	3,96	4,39	4,43	3,98
Lisina	9,04	9,31	8,89	9,41	9,50	8,16
NH ₃	1,26	1,20	1,38	2,75	1,59	1,48
Histidina	2,64	2,70	2,94	3,13	3,16	2,70
Triptofano	*	*	*	*	*	*
Arginina	6,07	6,05	4,69	6,02	5,86	4,89
% Proteína	42,02	42,63	42,18	42,84	44,00	44,74

Tabela 7.2^b - Resultados da análise de % proteínas e perfil de aminoácidos para 06 das 21 cepas testadas

Aminoácidos (g/100g proteína)	Goiasa	V.Rosário	Bonfim	C.Pinto	Guarani	Andrade
Ac. Aspártico	11,51	10,92	11,40	11,98	11,90	12,20
Treonina	5,16	4,67	5,06	5,20	5,08	5,25
Serina	5,88	5,29	5,75	5,99	5,91	5,92
Ac. Glutâmico	11,20	10,58	11,25	11,61	11,24	11,82
Prolina	3,52	3,42	3,65	3,74	3,90	3,81
Glicina	4,45	4,18	4,59	3,74	3,90	3,81
Alanina	6,32	5,82	6,71	7,09	6,47	7,05
Cistina	0,22	0,14	0,27	0,26	0,21	0,32
Valina	3,54	3,32	3,70	3,68	3,61	4,08
Metionina	0,67	1,07	0,99	0,97	1,24	1,76
Isoleucina	2,74	2,77	3,06	3,00	2,96	3,29
Leucina	6,77	6,54	6,66	6,92	6,92	7,59
Tirosina	3,43	3,26	3,48	3,52	3,57	3,58
Fenilalanina	4,12	3,91	4,07	4,27	4,23	4,26
Lisina	7,99	8,12	8,19	8,30	8,04	8,69
NH ₃	2,11	1,39	1,38	1,50	1,29	1,49
Histidina	2,00	2,83	2,10	2,07	2,01	2,88
Triptofano	*	*	*	*	*	*
Arginina	5,03	4,30	5,45	5,29	5,08	5,18
% Proteína	44,93	48,79	40,53	45,40	48,24	44,41

* Não detectado pelo método utilizado

Tabela 7.2° - Resultados da análise de % proteínas e perfil de aminoácidos para 06 das 21 cepas testadas

Aminoácidos (g/100g proteína)	Dacal	Dacalda	Alcoeste	Corol	Y 904	Y 167
Ac. Aspártico	11,78	12,96	11,26	11,75	12,61	11,65
Treonina	4,95	5,58	4,68	5,06	5,21	4,62
Serina	5,64	6,72	5,54	5,90	6,12	5,59
Ac. Glutâmico	11,54	12,77	10,83	12,41	12,08	10,90
Prolina	3,68	3,94	3,45	3,74	3,94	3,54
Glicina	4,64	5,22	4,53	4,70	5,08	4,31
Alanina	6,57	7,07	6,21	6,97	6,71	5,92
Cistina	0,29	n.d	0,34	0,38	0,30	0,12
Valina	3,39	4,15	3,33	3,53	3,68	3,40
Metionina	1,04	1,26	1,06	1,14	1,25	1,06
Isoleucina	2,80	3,20	2,70	2,77	3,03	2,75
Leucina	6,63	7,64	6,44	6,64	7,03	6,75
Tirosina	3,33	3,84	3,17	3,41	3,60	3,31
Fenilalanina	3,95	4,63	3,85	4,07	4,21	4,09
Lisina	7,97	9,16	7,81	8,62	8,49	8,24
NH ₃	1,29	1,47	1,31	1,45	1,40	1,38
Histidina	1,97	2,16	2,00	3,00	2,12	2,62
Triptofano	*	*	*	*	*	*
Arginina	4,93	5,32	4,80	5,11	5,38	4,66
% Proteína	45,07	42,14	44,41	39,33	47,25	49,18

* Não detectado pelo método utilizado

Tabela 7.2^d - Resultados da análise de % proteínas e perfil de aminoácidos para 03 das 21 cepas testadas

Aminoácidos (g/100g proteína)	Barra Grande	Sta. Cruz	Clealco
Ac. Aspártic	11,63	12,9	12,2
Treonina	5,25	5,40	5,20
Serina	6,35	6,24	5,91
Ac. Glutâmico	11,94	12,00	12,01
Prolina	3,89	3,93	3,83
Glicina	5,02	5,13	4,98
Alanina	7,41	7,02	7,17
Cistina	0,19	0,38	0,33
Valina	3,85	4,04	3,85
Metionina	1,48	1,52	0,95
Isoleucina	3,15	3,14	3,08
Leucina	7,41	7,27	7,23
Tirosina	3,66	3,61	3,61
Fenilalanina	4,42	4,28	4,27
Lisina	8,97	8,45	8,47
NH ₃	1,52	1,49	1,42
Histidina	2,94	2,61	2,12
Triptofano	*	*	*
Arginina	5,78	5,15	5,33
% Proteína	47,25	44,84	45,20

* Não detectado pelo método utilizado

As cepas estudadas apresentam uma faixa de variação no que se refere a % de proteína. Em relação à distribuição de aminoácidos nesta proteína, os resultados mostram que todas se apresentam dentro do perfil de aminoácidos encontrado em literatura para linhagens de *S. cerevisiae*. (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

As Figuras 7.1 a e b mostram respectivamente o histograma e o gráfico de probabilidade normal, onde são mostrados os valores esperados para a distribuição normal e os valores obtidos para a concentração de proteína que se encontram nas Tabelas 7.2.

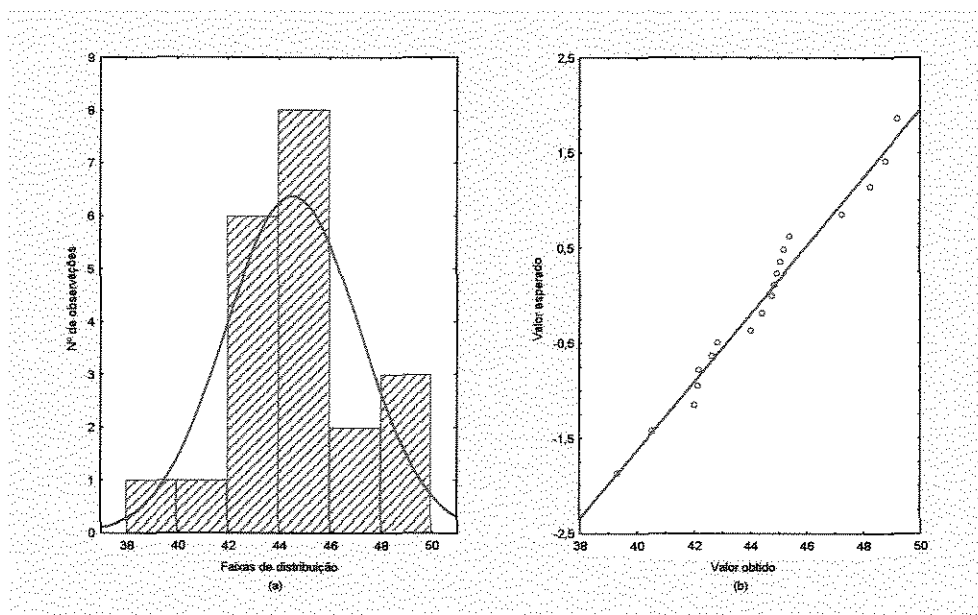


Figura 7.1 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de proteína.

Nota-se pela Figura 7.1 um bom ajuste dos dados experimentais com o modelo de distribuição normal, sendo possível, portanto assumir o modelo de distribuição normal para esta variável.

Observa-se pelas Tabelas 7.2 que os aminoácidos cuja participação é maior na composição do material protéico de todas as cepas testadas são:

ácido aspártico e glutâmico e os cuja participação é menor são: a cistina e a metionina. O ácido aspártico é utilizado na produção de adoçantes “diets” e o ácido glutâmico é o precursor do principal produto dos aditivos de alimento com características de realce de sabor (Glutamato de sódio). Outro aminoácido de grande importância é a lisina, que está em terceiro lugar em abundância nas leveduras testadas.

Atualmente a massa excedente de células de levedura, a qual é considerado um sub-produto, do processo fermentativo, é seca e vendida como ração animal. Essa massa excedente em um processo de produção de etanol pode chegar a 20g de massa seca por litro de álcool produzido. Os estudos da composição da proteína, em relação a % e composição de aminoácidos, da massa de levedura auxiliam no desenvolvimento de novos produtos de maior valor agregado que possam ser obtidos desta massa microbiana excedente. Isto segundo ZANIN *et al.* (2000) pode ajudar o álcool a ser cada vez mais viável economicamente. Em alguns casos pode ser interessante a implantação de uma unidade anexa à fábrica de açúcar, que faça uso do melaço para produção de proteína microbiana para consumo animal, ou mesmo humano. Neste caso o produto obtido deixa de ser apenas um sub-produto.

Os resultados obtidos para a fração porcentual de alanina em relação à proteína também se ajustaram muito bem ao modelo de distribuição normal como pode ser visto na Figura 7.2 a e b.

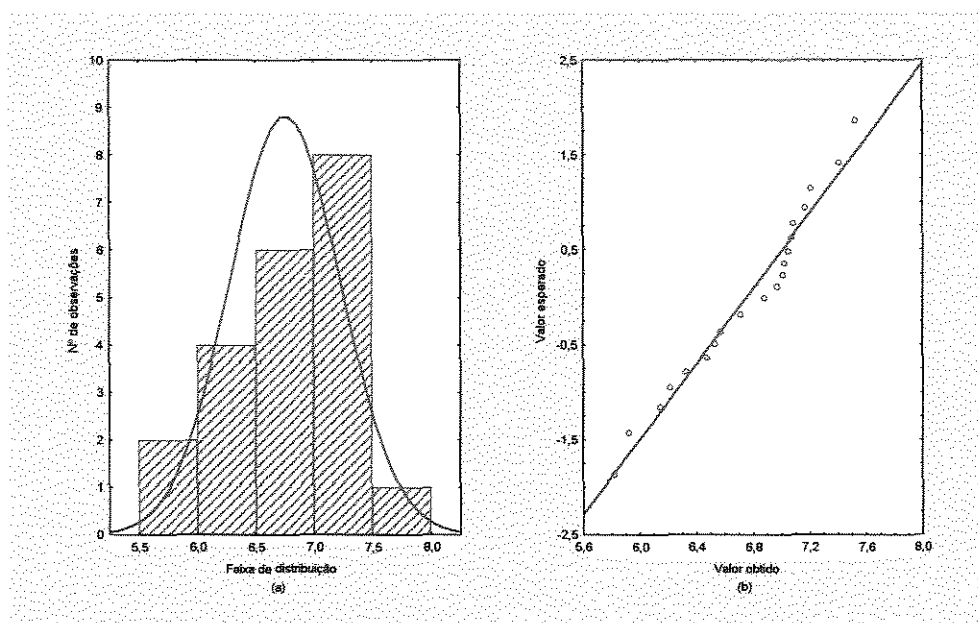


Figura 7.2 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de alanina.

Das variáveis estudadas NH_3 , isoleucina e histidina foram as que apresentaram os maiores desvios quando comparado com o modelo de distribuição normal, como pode ser observado nas Figuras 7.3 a e b, 7.4 a e b e 7.5 a e b.

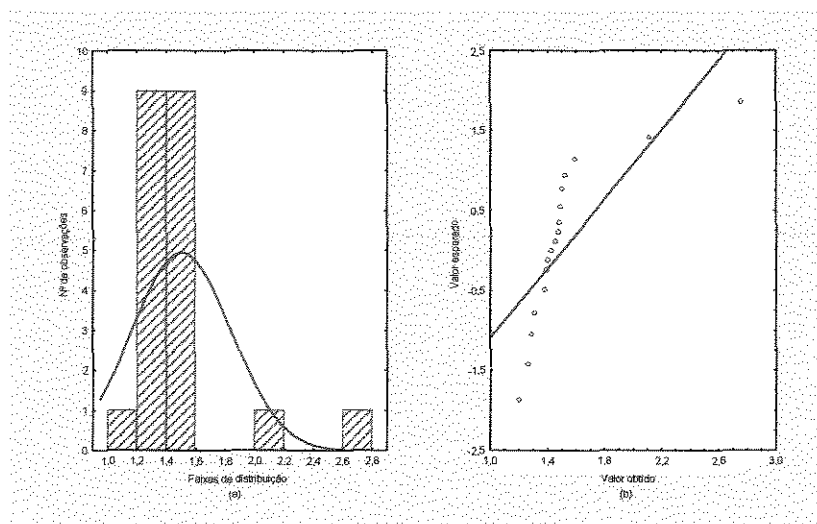


Figura 7.3 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de amônia (NH_3).

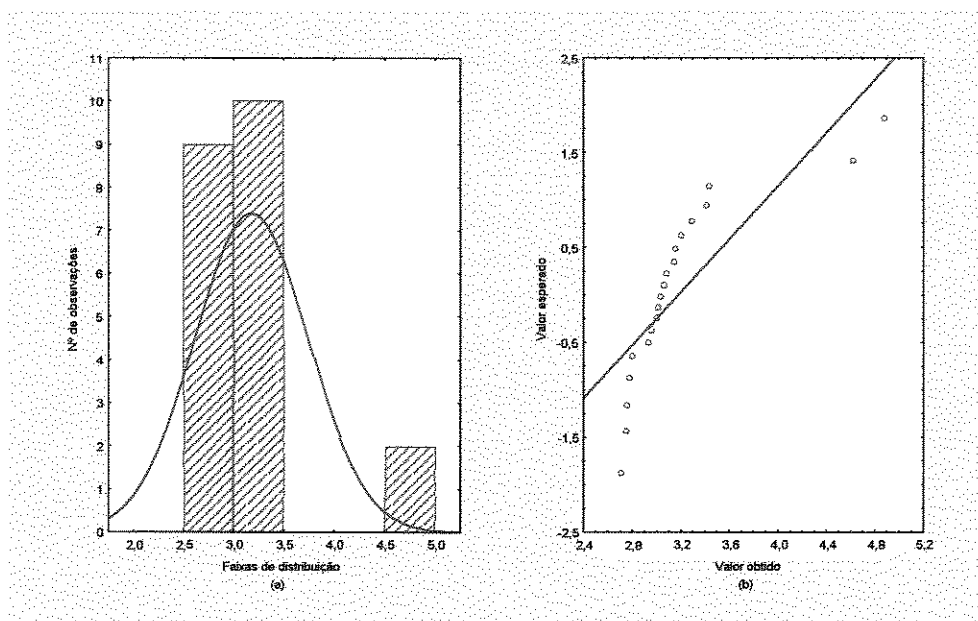


Figura 7.4 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de isoleucina.

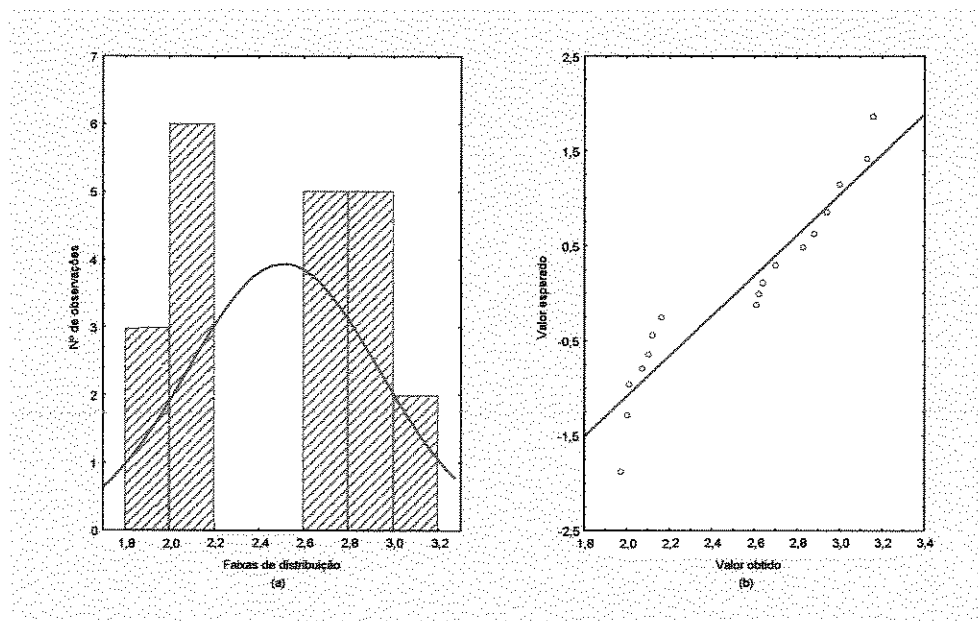


Figura 7.5 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de histidina.

As Figuras 7.6 a e b, 7.7 a e b, 7.8 a e b, 7.9 a e b, 7.10 a e b, 7.11 a e b, 7.12 a e b, 7.13 a e b, 7.14 a e b, 7.15 a e b, 7.16 a e b, 7.17 a e b, 7.18 a e b e 7.19 a e b, mostram respectivamente os ajustes obtidos pelas variáveis arginina, ácido aspártico, cistina, treonina, valina, tirosina, serina, prolina, lisina, metionina, leucina, ácido glutâmico, fenilalanina e glicina com o modelo de distribuição normal.

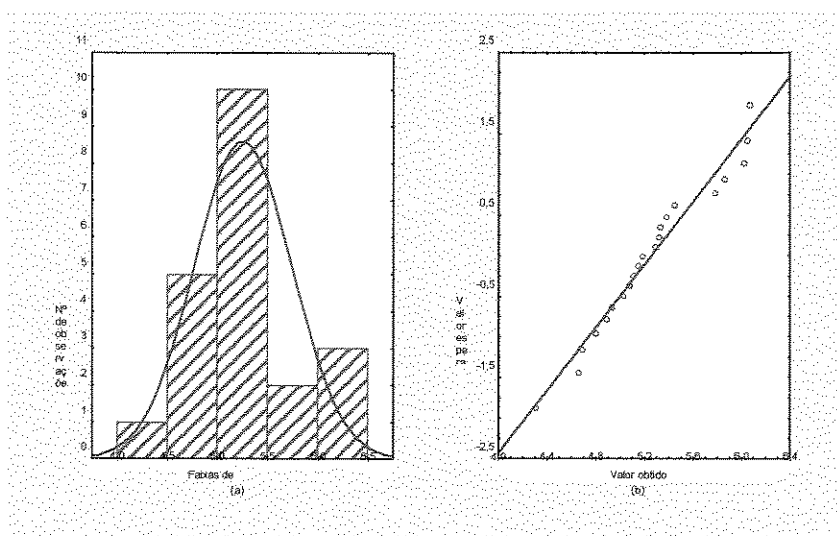


Figura 7.6 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de arginina.

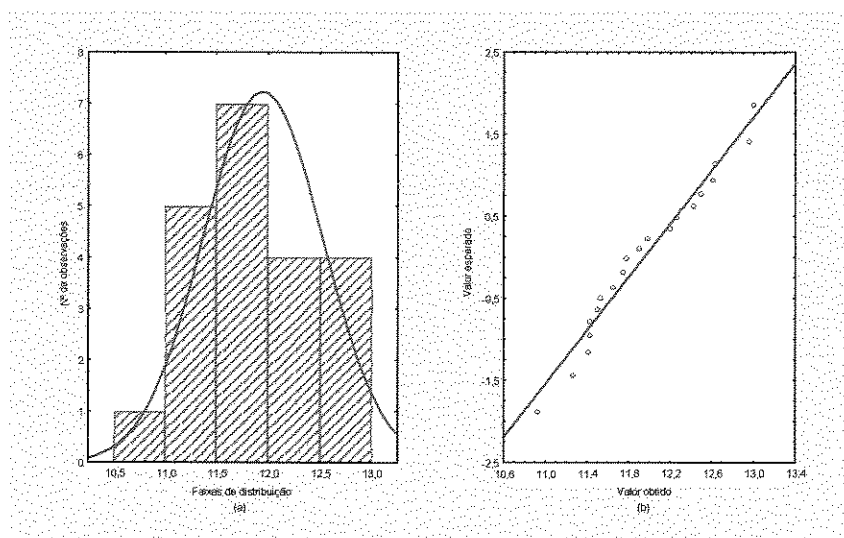


Figura 7.7 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de ácido aspártico.

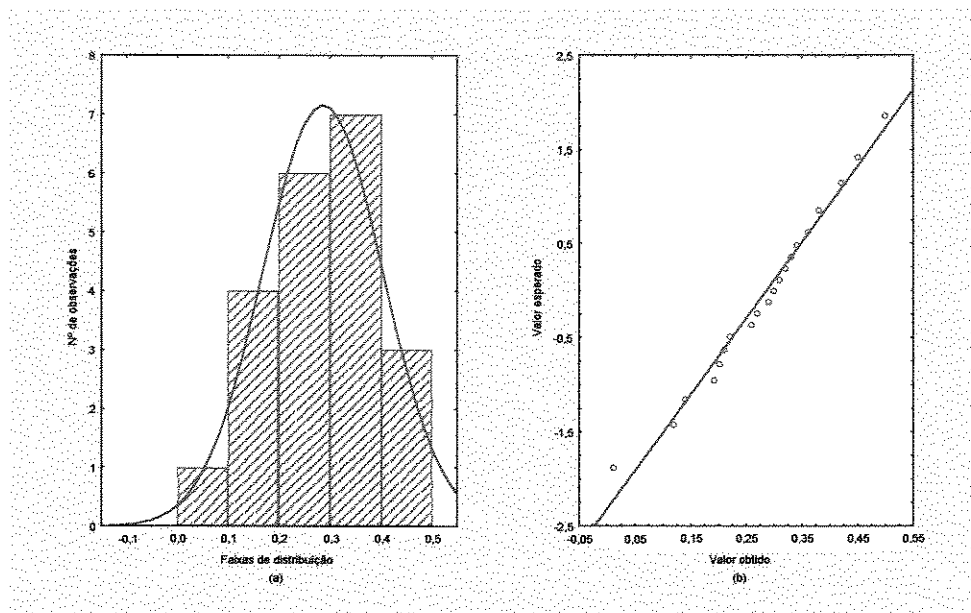


Figura 7.8 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de cistina.

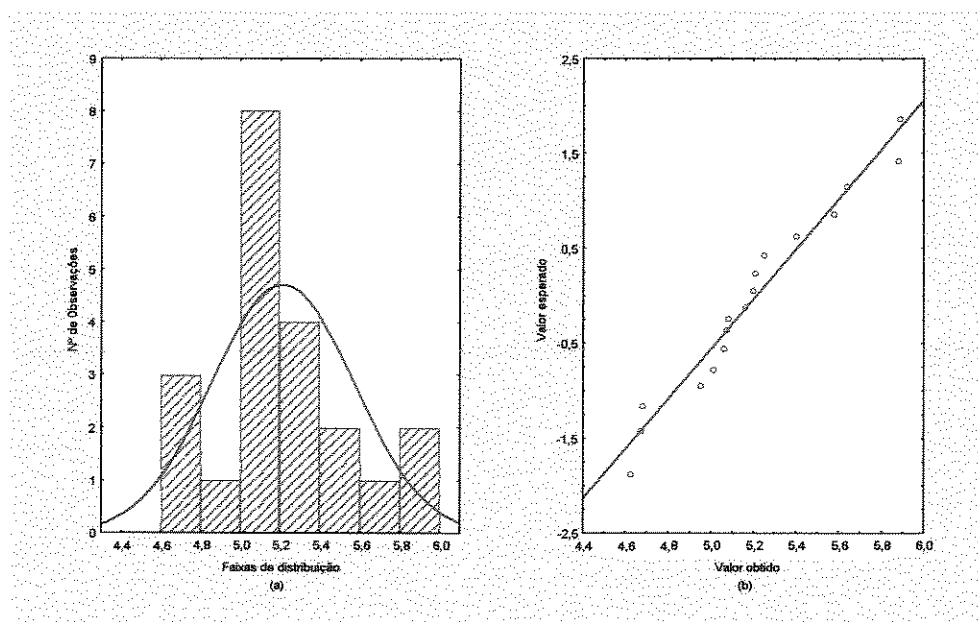


Figura 7.9 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de ácido treonina.

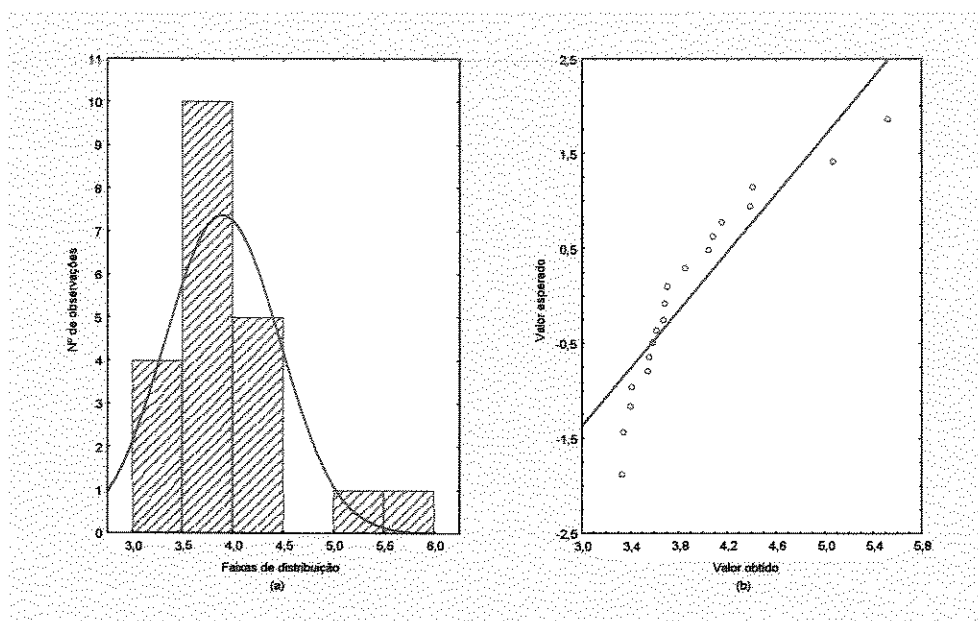


Figura 7.10 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de valina.

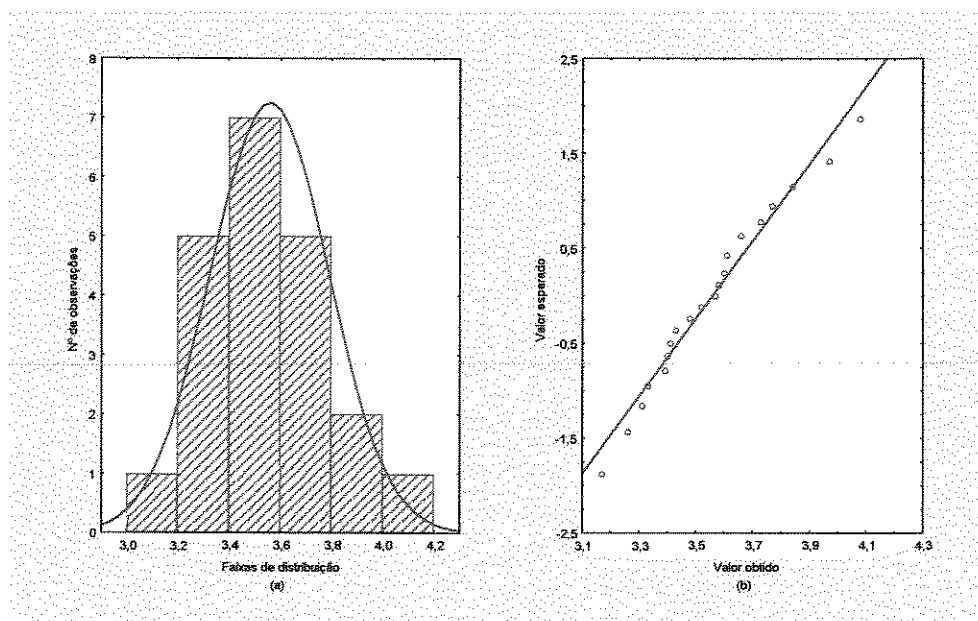


Figura 7.11 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de tirosina.

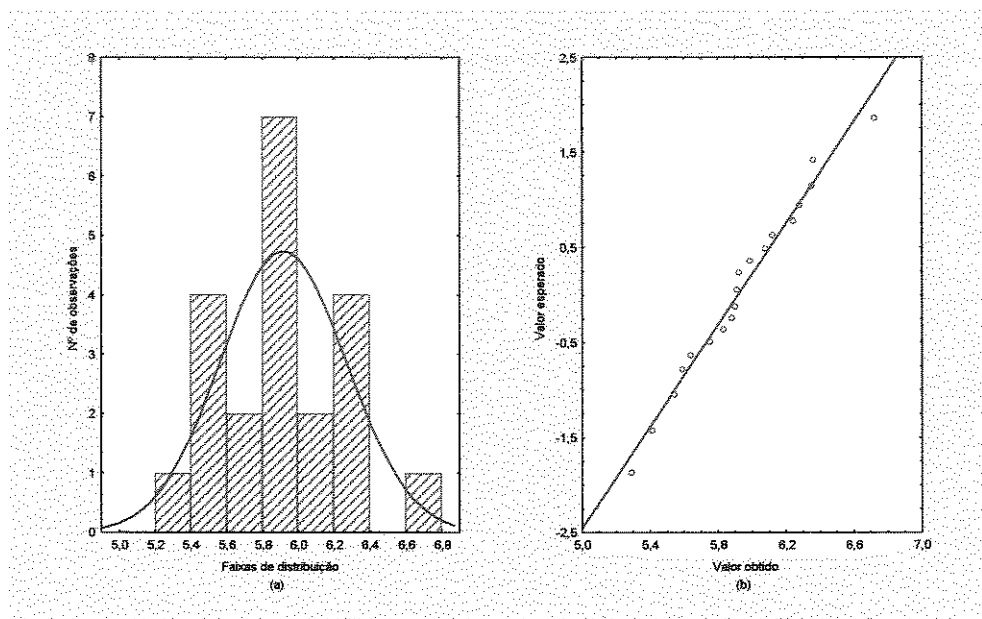


Figura 7.12 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de serina.

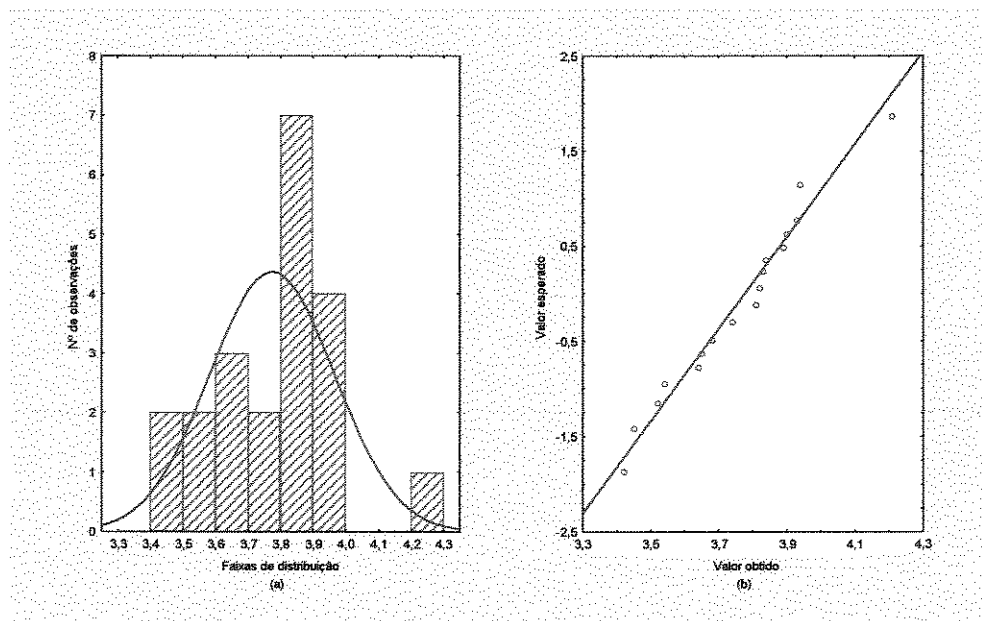


Figura 7.13 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de prolina.

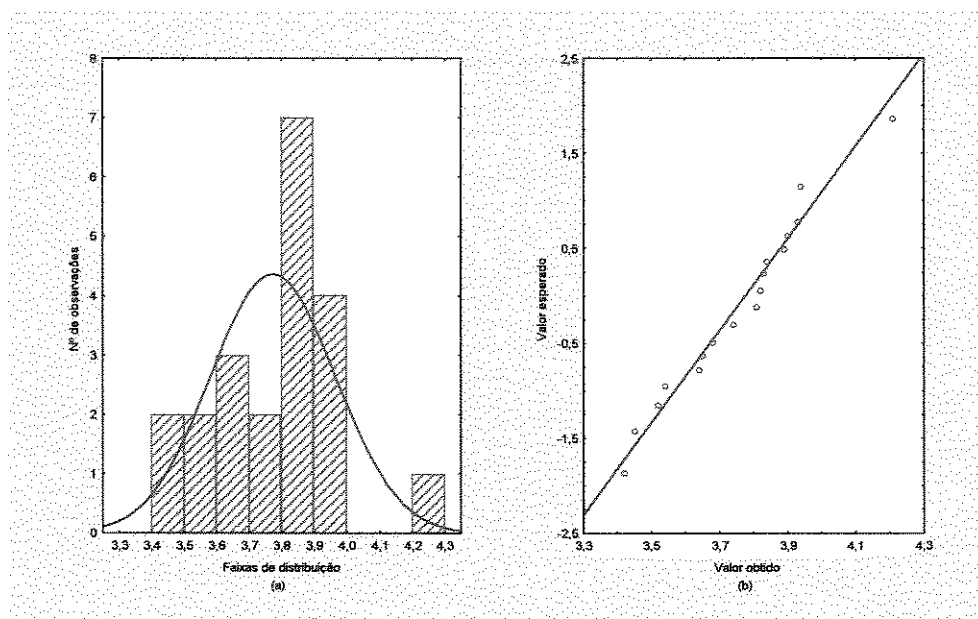


Figura 7.14 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de lisina.

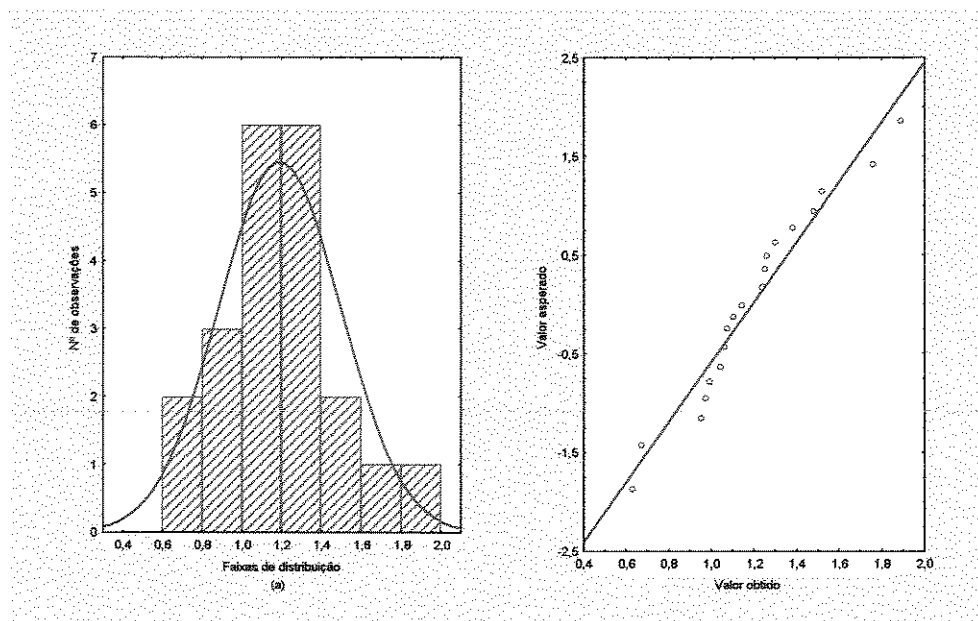


Figura 7.15 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de metionina.

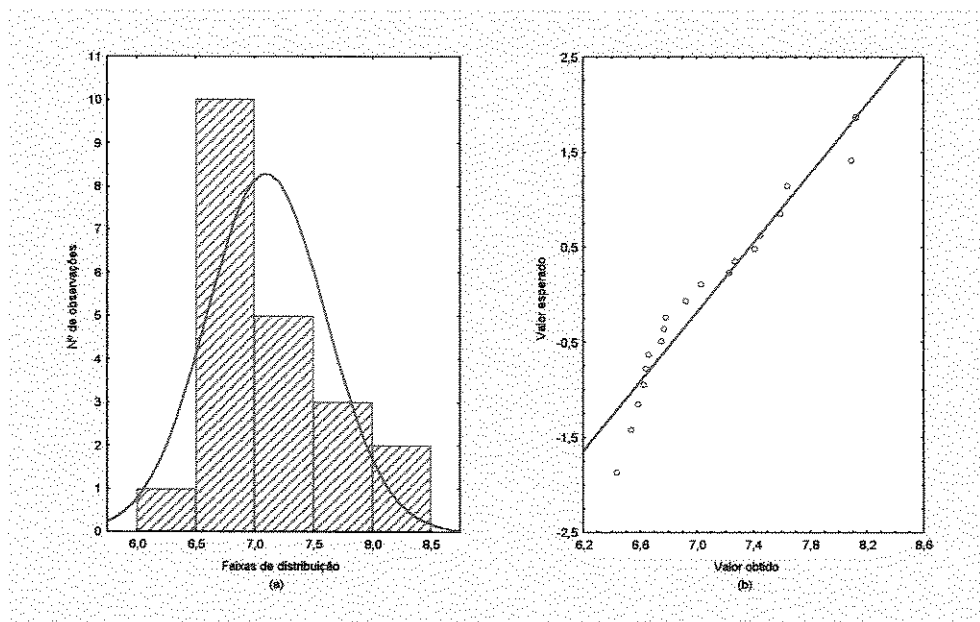


Figura 7.16 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de leucina.

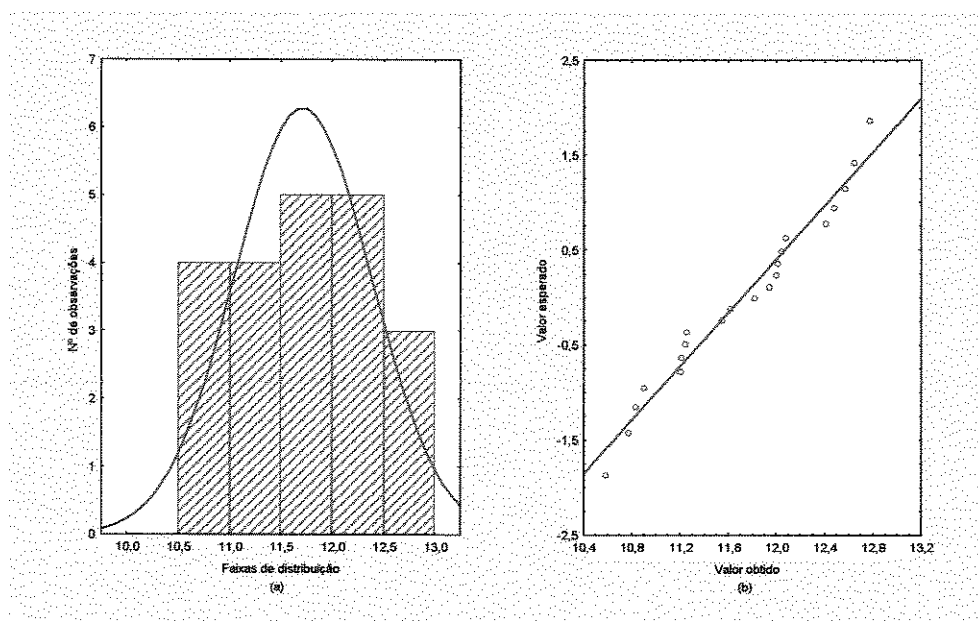


Figura 7.17 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de ácido glutâmico.

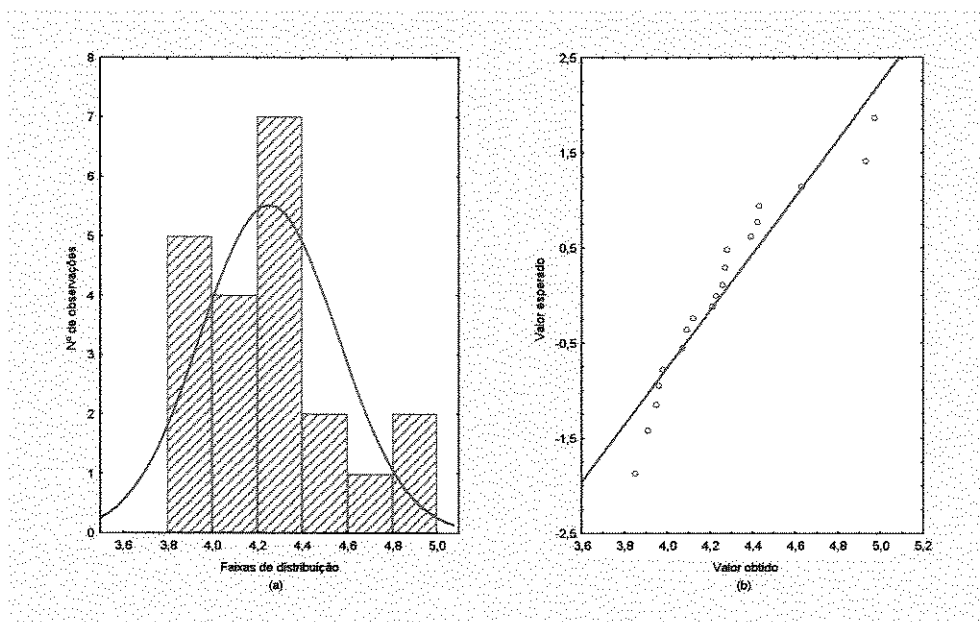


Figura 7.18 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de fenilalanina.

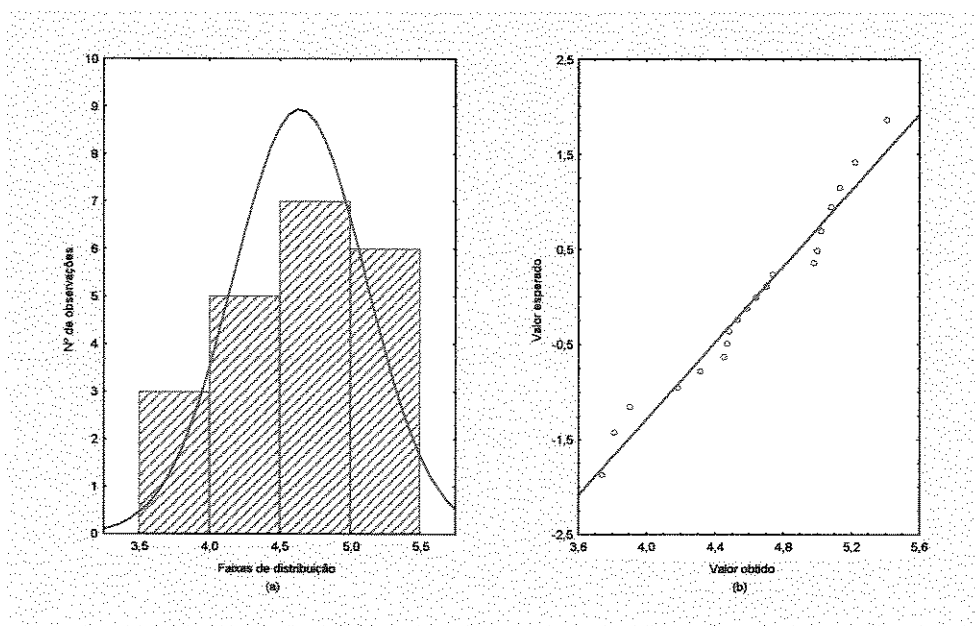


Figura 7.19 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para os valores de concentração de glicina.

Apesar de três variáveis (NH_3 , isoleucina e histidina) não apresentarem um ajuste satisfatório ao modelo de distribuição normal, optou-se por adotar este modelo para todas as variáveis estudadas, já que a grande maioria delas se encaixa nesta distribuição. Desta forma, foram determinados os valores médios, a variância e o intervalo de confiança ao nível de 95% para todas as variáveis estudadas. A Tabela 3. mostra os valores obtidos para cada variável.

Tabela 7.3 – Valor médio, intervalos de confiança (-95% à + 95%) e variância para cada aminoácido analisado.

Aminoácidos	Média	Confiança (+ 95%)	Confiança (-95%)	Variância
Ac. Aspártico	11,9438	11,6807	12,2069	0,3340
Treonina	5,2114	5,0498	5,3731	0,1261
Serina	5,9167	5,7559	6,0774	0,1246
Ac. Glutâmico	11,7091	11,4059	12,0121	0,4434
Prolina	3,7738	3,6866	3,8610	0,0367
Glicina	4,6381	4,4250	4,8512	0,2191
Alanina	6,7524	6,5366	6,9682	0,2247
Cistina	0,2857	0,2325	0,3389	0,0137
Valina	3,8948	3,6367	4,1528	0,3213
Metionina	1,1905	1,0509	1,3307	0,0940
Isoleucina	3,1771	2,9196	3,4347	0,3201
Leucina	7,0981	6,8683	7,3278	0,2548
Tirosina	3,5581	3,4530	3,6632	0,0533
Fenilalanina	4,2519	4,1138	4,3900	0,0920
Lisina	8,5629	8,3297	8,7960	0,2624
NH_3	1,5024	1,3483	1,6564	0,1145

Aminoácidos	Média	Confiança (+ 95%)	Confiança (-95%)	Variância
Histidina	2,5095	2,3159	2,7031	0,1809
Triptofano	*	*	*	*
Arginina	5,2557	5,0342	5,4773	0,2369
% Proteína	44,5419	43,3485	45,7353	6,8738

* Não detectado pelo método utilizado

Para uma melhor visualização e interpretação dos dados apresentados na Tabela 7.3, as Tabelas 7.4 (a,b,c e d) mostram qual valor de cada variável estudada está acima (+), abaixo (-) ou dentro (0) do intervalo de confiança para cada cepa avaliada.

Tabela 7.4^a – Posição relativa ao intervalo de confiança ao nível de 95% para cada variável estudada de 6 das 21 cepas testadas.

Aminoácidos	Alvorada	Unialcol	Diamante	Diana	J.Machado	Junqueira
Ac. Aspártico	-	0	-	+	+	-
Treonina	+	+	0	+	+	-
Serina	0	0	-	+	+	-
Ac. Glutâmico	+	+	-	+	+	-
Prolina	+	0	0	+	0	-
Glicina	+	0	0	+	+	0
Alanina	0	+	-	+	+	-
Cistina	+	+	0	+	+	-
Valina	+	+	0	+	+	-
Metionina	0	-	0	+	+	0
Isoleucina	+	+	0	0	0	0
Leucina	+	+	-	+	+	-
Tirosina	+	+	-	+	+	-
Fenilalanina	+	+	-	0	+	-
Lisina	+	+	+	+	+	-
NH ₃	-	-	0	+	0	0
Histidina	0	0	+	+	+	0
Triptofano	*	*	*	*	*	*
Arginina	+	+	-	+	+	-
% Proteína	-	-	-	-	0	0

* Não detectado pelo método utilizado

Tabela 7.4^b – Posição relativa ao intervalo de confiança ao nível de 95% para cada variável estudada de 6 das 21 cepas testadas.

Aminoácidos	Goiasa	V.Rosário	Bonfim	C.Pinto	Guarani	Andrade
Ac. Aspártico	0	-	-	0	0	0
Treonina	+	-	0	0	0	0
Serina	+	-	0	0	0	0
Ac. Glutâmico	-	-	-	0	+	0
Prolina	-	-	-	0	+	0
Glicina	0	-	0	-	-	-
Alanina	-	-	0	+	-	+
Cistina	-	-	0	0	-	0
Valina	-	-	0	0	-	0
Metionina	-	0	-	-	0	+
Isoleucina	-	-	0	0	0	0
Leucina	-	-	-	0	0	+
Tirosina	-	-	0	0	0	0
Fenilalanina	0	-	-	0	0	0
Lisina	-	-	-	-	-	0
NH ₃	+	0	0	0	-	0
Histidina	-	+	-	-	-	+
Triptofano	*	*	*	*	*	*
Arginina	0	-	0	0	0	0
% Proteína	0	+	-	0	+	0

* Não detectado pelo método utilizado

Tabela 7.4^c – Posição relativa ao intervalo de confiança ao nível de 95% para cada variável estudada de 06 das 21 cepas testadas.

Aminoácidos	Dacal	Dacalda	Alcoeste	Corol	Y 904	Y 167
Ac. Aspártico	0	+	-	0	+	-
Treonina	-	+	-	0	0	-
Serina	-	+	-	0	+	-
Ac. Glutâmico	0	+	-	+	+	-
Prolina	-	+	-	0	+	-
Glicina	0	+	0	0	+	-
Alanina	0	+	-	0	0	-
Cistina	0	-	0	+	0	-
Valina	-	0	-	-	0	-
Metionina	-	0	0	0	0	0
Isoleucina	-	0	-	-	0	-
Leucina	-	+	-	-	0	-
Tirosina	-	+	-	-	0	-
Fenilalanina	-	+	-	-	0	-
Lisina	-	+	-	0	0	-
NH ₃	-	0	-	0	0	0
Histidina	-	-	-	+	-	0
Triptofano	*	*	*	*	*	*
Arginina	-	0	-	0	0	-
% Proteína	0	-	0	-	+	+

* Não detectado pelo método utilizado

Tabela 7.^d – Posição relativa ao intervalo de confiança ao nível de 95% para cada variável estudada de 3 das 21 cepas testadas.

Aminoácidos	Barra Grande	Sta. Cruz	Clealco
Ac. Aspártic	+	+	+
Treonina	0	+	0
Serina	+	+	0
Ac. Glutâmico	0	0	0
Prolina	+	+	0
Glicina	+	+	+
Alanina	+	+	+
Cistina	0	+	0
Valina	0	0	0
Metionina	+	+	-
Isoleucina	0	0	0
Leucina	+	0	0
Tirosina	0	0	0
Fenilalanina	+	0	0
Lisina	+	0	0
NH ₃	0	0	0
Histidina	+	0	-
Triptofano	*	*	*
Arginina	+	0	0
Proteína	+	0	0

A Tabela 7.5 mostra o valor percentual das variáveis que estão acima, abaixo e dentro do intervalo de confiança para cada cepa testada.

Tabela 7.5 – Porcentagem de valores das variáveis posicionados acima, abaixo e dentro do intervalo de confiança para as 21 cepas testadas

Cepa	Acima (%)	Dentro (%)	Abaixo (%)
Alvorada	63	21	16
Unialco	58	26	16
Diamante	10	42	48
Diana	84	10	6
Jalles Machado	79	21	0
Junqueira	0	32	68
Goiasa	16	26	58
V. Rosario	10	11	79
Bonfim	0	53	47
Costa Pinto	5	74	21
Guarani	16	47	37
Andrade	21	74	5
Dacal	0	32	68
Dacalda	58	26	16
Alcoeste	0	21	79
Corol	16	53	31
Y 904	32	64	4
Y167	5	16	79
Barra Grande	64	36	0
Santa Cruz	42	58	0
Clealco	16	74	10

Pelos dados contidos nas Tabelas 7.4 e 7.5 observa-se que nenhuma das cepas testadas apresentaram todos os resultados das variáveis dentro do intervalo de confiança. As que mais apresentaram resultados neste intervalo foram as cepas Costa Pinto, Andrade, e Clealco com 74% das variáveis estudadas e a Y 904 com 64%. As que apresentaram valores acima do limite máximo do intervalo de confiança foram: Diana com 84%, Jalles Machado com 79%, Alvorada e Barra Grande com 64%. As que apresentaram a maioria dos valores abaixo do limite mínimo foram a Vale do Rosário, Alcoeste e Y 167 com 79% e Junqueira e Dacal com 68%.

Entre as cepas estudadas, a Dacalda e Unialco foram as que apresentaram perfis de aminoácidos bastante similares.

A Tabela 7.6 mostra a matriz de correlação entre todos os aminoácidos e a concentração de proteína.

Tabela 7.6. Matriz de correlação de todas as variáveis estudadas, onde: AA - Ac. Aspártico, TR – Treonina, SE – Serina, AG – Ac. Glutâmico, PL – Prolina, GL – Glicina, AL – Alanina, CI – Cistina, VA – Valina, ME – Metionina, IS – Isoleucina, LE – Leucina, TR – Tirosina, FE – Fenilalanina, LI – Lisina, NH – NH₃, HI – Histidina, AR – Arginina e PR - Proteína

	AA	TR	SE	AG	PL	GL	AL	CI	VA	ME	IS	LE	TR	FE	LI	NH	HI	AR	PR
AA	1	,52	,90	,71	,59	,56	,77	,00	,28	,58	,11	,53	,53	,43	,58	,24	,14	,53	-,0
TR	,52	1	,69	,84	,79	,52	,73	,50	,92	,21	,83	,91	,96	,91	,81	,19	,27	,87	-,5
SE	,90	,69	1	,80	,61	,56	,81	,01	,45	,37	,28	,65	,70	,63	,63	,31	,09	,68	-,2
AG	,71	,84	,80	1	,77	,64	,81	,40	,71	,32	,60	,79	,82	,78	,78	,06	,24	,77	-,5
PL	,59	,79	,61	,77	1	,47	,65	,41	,73	,43	,65	,76	,79	,73	,66	,04	,20	,71	-,3
GL	,56	,52	,56	,64	,47	1	,49	,25	,43	,25	,32	,43	,48	,41	,57	,16	,22	,53	-,3
AL	,77	,73	,81	,81	,65	,49	1	,36	,54	,43	,41	,66	,69	,60	,66	,22	,25	,80	-,4
CI	0	,50	,01	,40	,41	,25	,36	1	,58	,09	,59	,39	,37	,34	,34	,09	,28	,54	-,5
VA	,28	,92	,45	,71	,73	,43	,54	,58	1	,17	,97	,92	,91	,92	,75	,06	,34	,82	-,4
ME	,58	,21	,37	,32	,43	,25	,43	,09	,17	1	,02	,29	,16	,07	,44	,11	,54	,19	,02
IS	,11	,83	,28	,60	,65	,32	,41	,59	,97	,02	1	,86	,86	,89	,65	-,1	,28	,75	-,4
LE	,53	,91	,65	,79	,76	,43	,66	,39	,92	,29	,86	1	,95	,95	,81	,06	,33	,81	-,2
TR	,53	,96	,70	,82	,79	,48	,69	,37	,91	,16	,86	,95	1	,97	,79	,07	,23	,87	-,3
FE	,43	,91	,63	,78	,73	,41	,60	,34	,92	,07	,89	,95	,97	1	,73	,00	,19	,82	-,3
LI	,58	,81	,63	,78	,66	,57	,66	,34	,75	,44	,65	,81	,79	,73	1	,27	,65	,74	-,4
NH	,24	,19	,31	,06	,04	,16	,22	,09	,06	,11	-,1	,06	,07	,00	,27	1	,26	,26	-,1
HI	,14	,27	,09	,24	,20	,22	,25	,28	,34	,54	,28	,33	,23	,19	,65	,26	1	,23	-,2
AR	,53	,87	,68	,77	,71	,53	,80	,54	,82	,19	,75	,81	,87	,82	,74	,26	,23	1	-,4
PR	,00	-,5	-,2	-,5	-,3	-,3	-,4	-,5	-,4	,02	-,3	-,2	-,3	-,3	-,4	-,1	-,2	-,4	1

Valor em negrito corresponde a correlações com significância estatística ao nível de 95%.

Pelos dados da Tabela 7.6 observa-se que a treonina e a lisina são as variáveis que mais possuem correlação com as demais, seguidas pelo ácido glutâmico e arginina. Por outro lado, as que possuem o menor número de correlações significativas são o NH_3 com nenhuma, seguido pela histidina (2) e pela proteína (3). A concentração de treonina está bastante correlacionada com a concentração de leucina, tirosina e fenilalanina, mostrando valores de coeficiente de regressão superiores a 0,9. Uma observação importante a ser feita sobre estes resultados é que todas as correlações entre os aminoácidos são positivas, ou seja, a concentração maior de um implica em concentrações maiores dos outros. A concentração de proteína não mostrou correlação com nenhum dos aminoácidos, mostrando que a composição da mesma não é afetada pela concentração desta na massa seca, ou seja, não se pode afirmar que o aumento de massa protéica na célula favoreça o acréscimo ou a diminuição de um dado aminoácido em sua composição.

4. BIBLIOGRAFIA

AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLS, N.F.E. *Engenharia Bioquímica*, 1971. Cap.2: p.16-42.

FIALHO, E.T.; GOMES, P.C.; ALBINO, I.F.T.; COSTA, V. Determinação dos valores de composição química e de digestibilidade de alguns ingredientes nacionais para suínos. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.12, n.2, p.337-356, 1983.

FURCO, A.M. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. *Produção de biomassa de leveduras: utilização em alimentação humana e animal*, Campinas, p.52-58, 1996.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. *Chemical composition and biochemistry of yeast biomass*. Boca Raton: Academic Press, 1991, 312p.

HSE, W. Protein from sugar of Taiwan. *Sugar & Azucar*, v.58, n.7, p.33-36, 1961.

KINSELLA, J.E. Functional proteins from yeast nucleoprotein for food uses: methods for isolation. In: Marcel Dekker ed. *Food Biotechnology*. Dietrich Knorr, New York. 1987. Cap. 14: p.363-391.

LAHR FILHO, D.; GHIRALDINI, J.A.; ROSSEL, C.E.V. Estudos da otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. *Produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal*. Campinas, 1996, p.59-67.

LIMA, G.J.M. *Uso de levedura seca (Saccharomyces cerevisiae) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de matrizes suínas em gestação e lactação*. ESALQ/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983 (mestrado).

MATELES, R.I.; TANNENBAUM, S.R. *Single-cell protein*. Massachussets: MIT Press, 1968. 480p.

MYADA, V.S. *Uso de levedura seca (Saccharomyces cerevisiae) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação suínos em crescimento e acabamento*. ESALQ/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978 (mestrado).

MOREIRA, J.R.A. *Uso de levedura seca (Saccharomyces cerevisiae) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar em rações isocalóricas para suínos e crescimento e acabamento*. ESALQ/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984 (mestrado).

PEPPLER, H.J. Food Yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. EDS. *The yeasts*. London: Academic Press, 1970, cap.8:p.421-457.

REED, G. Use of microbial cultures:yeast products. *Food Technology*, 1981, p.89-94.

REED, G. Microbial biomass, single-cell protein, and other microbial products. In: REED, G. *Prescott & Dunn's Industrial Microbiology*. 4.ed., Westport: AV 1982, p.541-592.

SPACKMAN, D.C.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Analytical Biochemistry*, New York, v.30, p.1190-1206, 1958.

VANANUVAT, P.; KINSELLA, J.E. Amino acid composition of protein isolares form *Saccharomyces fragilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.23, n.3, p.595-597, May-June, 1975.

ZANIN, G.M., SANTANA, C.C., BOM, E.P.S., GIORDANO, R.C.L., MORAES, F.F., ANDRIETTA, S.R., CARVALHO, C.C.N., MACEDO, I.C., FO, D.L., RAMOS, L.P., FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.84-86, p.1147-1161, Spring 2000.

CAPÍTULO 8

COMPOSIÇÃO CELULAR: ÁCIDOS GRAXOS

ÍNDICE

Objetivo	183
1. Introdução	183
2. Material e métodos	186
2.1. Condições de Crescimento	186
2.2. Metodologia Analítica	187
2.2.1. Hidrólise	187
2.2.2. Extração	188
2.3. Quantificação dos Ácidos graxos	188
3. Resultados e Discussão	189
4. Bibliografia	208

OBJETIVO

NESTE CAPÍTULO SERÁ APRESENTADO O RESULTADO OBTIDO DAS ANÁLISES DE ÁCIDOS GRAXOS DAS 22 CEPAS ESTUDADAS TODAS CULTIVADAS SOB AS MESMAS CONDIÇÕES.

1. INTRODUÇÃO

Em 1959 WOLOCHOW, citado por ABEL *et al.* (1963) já acreditava que os microrganismos poderiam ser diferenciados baseados na sua composição química que é específica para cada um deles. Pesquisadores como ABEL *et al.* (1963) também acreditavam que a composição química era a forma mais precisa para essa identificação.

Os ácidos graxos, os quais são caracterizada pela longa cadeia de hidrocarbonetos e um terminal do grupo carboxila, são comumente encontrados como parte do componente lipídeo em todas as células vivas. A natureza de cadeia longa dos ácidos graxos juntamente com a variedade das estruturas entre esses grupos de moléculas fez deles uma opção atrativa para ser usada na taxonomia de microrganismos (BOTHÁ & KOCK, 1993).

ABEL *et al.* (1963) foram os primeiros a demonstrar que a análise qualitativa de ácidos graxos pode ser usado para diferenciar várias bactérias entre si. GANGOPADNYARY *et al.* (1979) estudaram as cadeias longas de ácidos graxos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Torulopsis* e obtiveram resultados significantes o qual permitiu a diferenciação de 38 isoladas.

TREDOUX *et al.* (1987) encontrou evidência que espécie do gênero *Saccharomyces* podia ser identificada pelo seu perfil de ácido graxo.

Nas leveduras, os ácidos graxos insaturados são formados na presença de oxigênio molecular (BLOOMFIELD & BLOCH, 1960; BROWN & ROSE, 1969), sendo que as leveduras são capazes de aproveitar mínimas quantidades de oxigênio dissolvido no meio para síntese de ácidos graxos insaturados (AHVENAINEN, 1982). Os principais ácidos produzidos por linhagens de *Saccharomyces* são palmitoleico e oleico (GIUDICI *et al.* 1983; NAGAR-LEGMANN & MARGALITH, 1987; JIMÉNEZ & BENITEZ 1987),

Para se obter o perfil de ácido graxo que defina uma espécie particular de levedura, linhagens "tipo" devem ser estudada quanto a sua composição. Os perfis de ácido graxos em conjunto com outras características fenóticas foram usados com sucesso pelos vários taxonomistas de levedura para diferenciar (BOTHA & KOCK, 1993).

AUGUSTYN & KOCK (1989), AUGUSTYN (1989) e AUGUSTYN *et al.* (1990, 1991 e 1992), obtiveram um perfil representativo de *Sacharomyces cerevisae* e outras espécies de leveduras associados ao vinho em um extenso levantamento da composição celular de ácidos graxos de 249 linhagens representando 8 gêneros endomicetos. Este trabalho indicou que o perfil de ácidos graxos das cadeias celulares usados isoladamente não é uma técnica de identificação. Entretanto, a técnica pode ser aplicada para diferenciar entre linhagens de espécies (ex. *S. cereisae*).

Devida a importância industrial do gênero *Saccharomyces*, muitos trabalhos tem sido realizado para diferenciar entre as várias espécies e linhagens. (COTTRELL *et al.*, 1986; TREDOUX *et al.*, 1987; AUGUSTYN & KOCK 1989; AUGUSTYN *et al.* 1990). AUGUSTYN *et al.* (1990)

encontram que mesmo linhagens individuais podem ter um perfil de ácidos graxos específico.

As linhagens industriais de *S.cerevisae* são adaptadas para várias condições tecnológicas e, entretanto diferem em suas características a osmotolerância, termotolerância ou tolerância ao etanol. Algumas dessas características, especialmente tolerância ao etanol estão relacionadas à estrutura e função da membrana celular e a composição de ácidos graxos (THOMAS *et. al.*, 1978; MISHRA & PRASAD, 1989).

Tem sido demonstrado uma relação entre a composição em ácidos graxos das leveduras e a tolerância ao etanol. GIUDICI *et al.* (1983) relataram uma correlação linear positiva entre a produtividade de 22 linhagens de *Saccharomyces cerevisae* e o teor de ácido oleico das leveduras enquanto que NAGAR-LEGMANN & MARGALITH (1987) verificaram que as leveduras com alta capacidade fermentativa apresentaram menor teor de ácidos graxos poliinsaturados do que as de baixa capacidade como a *Saccharomyces mellis*.

Como base para classificação de microrganismos em gênero e espécies ABEL *et al.* (1963), propôs a determinação da composição de ácidos graxos pela cromatografia gás-líquido, no qual é relativamente menor o tempo de análise em relação aos testes convencionais. KOCK *et al.* (1986), recomendaram a estimativa do perfil de ácidos graxos como uma alternativa segura e rápida para testes de laboratório para distinguir entre as espécies de *S.cerevisae* nas condições padrões.

ABEL *et al.* (1963) demonstraram que microrganismos podem ser classificados em gêneros e espécies pela análise cromatográfica gás-líquido de ácidos graxos celular. Esta técnica tem sido aplicada para identificação e classificação de uma variedade de microrganismos.

A análise do perfil de ácidos graxos obtido por cromatografia gasosa está sendo usado como um método rápido, fácil e barato para diferenciar linhagens de *S.cerivisae* com objetivo de determinar as causas de erros de fermentações nas indústrias de alimentos e bebidas na África do Sul (BOTHÁ & KOCK, 1993).

Como o perfil celular de ácidos graxos de microrganismos é afetado por um número de parâmetros, rígidas padronizações das condições experimentais e técnicas são um requisito para o sucesso. Outras fontes de erros potenciais incluem extração de ácidos graxos do material celular presente na amostra e a falha para elucidar a exata estrutura do ácido graxo em estudo (SUZUKI & KOMOGATA, 1983; KORN, 1964).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise de ácidos graxos fez-se um cultivo único, onde todas as cepas foram submetidas às mesmas condições. Este procedimento foi adotado para que não houvesse nenhuma variação nas condições de cultivo (composição do meio, temperatura, agitação, etc.), uma vez que essas variações podem influenciar no perfil de ácidos graxos.

2.1. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O cultivo foi realizado em frascos agitados (Erlenmeyers de 500 ml com 300 ml de meio de cultivo estéril) sob temperatura, agitação e tempo controlados (32°C, 180 rpm e 24 horas). O meio de cultivo utilizado foi composto de (g/l): 150g de glicose; 5g de KH_2PO_4 ; 5g de NH_4Cl ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g de KCl ; 6g de extrato de levedura e 1g de triptona. O

fechamento dos frascos foi feito com rolha e borracha com orifício central onde foi introduzido um tubo de vidro em “L” (com filtro de algodão) para a saída de CO₂ produzido durante a fermentação. O vinho fermentado foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a massa celular novamente centrifugada nas mesmas condições (5 minutos a 5000 rpm) para retirada de possíveis interferentes. A massa celular foi seca em estufa a 60 °C até peso constante.

2.2. METODOLOGIA ANALÍTICA

Os ácidos graxos extraídos da massa celular foram identificados utilizando-se um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massa. A identificação foi feita através da comparação de dados do equipamento e com injeções de padrões autênticos.

2.2.1. Hidrólise

Aproximadamente 0,12 g de massa celular seca de cada cepa testada foi transferida para um balão de 25 ml e adicionado 5 ml de solução 15% de KOH em metanol/água 50%. A amostra foi hidrolizada em um sistema de refluxo onde permaneceu por 30 minutos. Após a hidrólise, o pH foi ajustado para 2.

2.2.2. Extração

Com o material da hidrólise procedeu-se a extração dos ácidos graxos com 3 alíquotas sucessivas de 10 ml de clorofórmio, onde a fase aquosa foi descartada e os extratos foram combinados e recolhidos em um balão de 50 ml. Evaporou-se até a secura e resuspendeu-se com 5 ml de éter etílico. Foi então, feita a esterificação com o reagente diazometano e evaporado até secura. As amostras foram ressuspendidas com acetato de etila e injetadas para a identificação.

2.3. QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Equipamento: Cromatógrafo HP 5890 com detector de massa HP 51971

Coluna: capilar HP-5 (25m x 0,2mm x 0,33 μ de filme)

Temperatura do injetor: 220°C

Temperatura do detector: 253°C

Temperatura da coluna: gradiente com início de 60°C, taxa de 3°C/min até 240°C, permanecendo por 7 minutos nesta temperatura.

Gás de arraste: He, 1m/min

Injetor: Split 1/40, volume de injeção 2 μ l.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6 e 8.7 mostram respectivamente os resultados das cinco repetições realizadas para a determinação do erro experimental das análises dos seguintes ácidos graxos C12:0 (ácido láurico), C14:0 (ácido mirístico), C14:1 (ácido miristoleico), C16:0 (ácido palmítico), C16:1 (ácido palmitoleico), C18:0 (ácido esteárico) e C18:1 (ácido oleico) na cepa tipo de *Sacharomyces cerevisiae* ATCC7752. Os resultados estão expressos em porcentagem do ácido graxo analisado em relação ao total de ácidos graxos encontrados na amostra.

Tabela 8.1 - Análise de coeficiente de variação da análise de ácido graxo C12:0 em *Sacharomyces cerevisiae* ATCC7752, em cinco extrações diferentes de uma mesma amostra.

Ácido Graxo	Repetição	Resultado (%)	Média (%)	Quadrado do desvio	Desvio padrão	Coeficiente variação
C12:0	1	0,490	0,476	0,000173	0,078	16,44
	2	0,464	0,476	0,000172		
	3	0,406	0,476	0,005043		
	4	0,604	0,476	0,016078		
	5	0,421	0,476	0,003118		

Pelos resultados contidos na Tabela 8.1 observa-se que o coeficiente de variação é bastante elevado, sendo que a faixa de variação devido ao erro experimental é de $0,476 \pm 0,078$, levando os valores a oscilar entre 0,398 e 0,554. Este foi o maior coeficiente de variação encontrado entre todos os ácidos graxos analisados, talvez pela sua concentração ser baixa em relação aos outros.

Tabela 8.2 - Análise de coeficiente de variação da análise de ácido graxo C14:0 em *Sacharomyces cerevisiae* ATCC7752, em cinco extrações diferentes de uma mesma amostra.

Ácido Graxo	Repetição	Resultado (%)	Média (%)	Quadrado do desvio	Desvio padrão	Coeficiente variação
C14:0	1	1,563	1,538	0,00063	0,104	6,73
	2	1,691	1,538	0,02371		
	3	1,471	1,538	0,00448		
	4	1,419	1,538	0,01402		
	5	1,544	1,538	0,00004		

Na Tabela 8.2, observa-se que o coeficiente de variação para os resultados das análises do ácido graxo C14:0 foi bem menor do que aquele encontrado para o C12:0, levando os resultados a uma faixa de variação devido ao erro experimental mais estreita ($1,538 \pm 0,104$), ou seja, os valores oscilam entre 1,434 e 1,642.

Tabela 8.3 - Análise de coeficiente de variação da análise de ácido graxo C14:1 em *Sacharomyces cerevisiae* ATCC7752, em cinco extrações diferentes de uma mesma amostra.

Ácido Graxo	Repetição	Resultado (%)	Média (%)	Quadrado do desvio	Desvio padrão	Coeficiente variação
C14:1	1	0,319	0,347	0,000761	0,0397	11,44
	2	0,401	0,347	0,002925		
	3	0,315	0,347	0,001008		
	4	0,352	0,347	0,00003		
	5	0,351	0,347	0,00003		

Na Tabela 8.3 observa-se que os resultados das análises do ácido graxo C14:1 mostraram um coeficiente de variação elevada, tendo seus valores oscilados entre 0,307 e 0,387. Da mesma forma que para o ácido graxo C12:0 esta variação elevado pode ser devido a sua baixa concentração em relação aos outros ácidos.

A Tabela 8.4 mostra os resultados obtidos na determinação do ácido graxo C16:0. Estes resultados apresentaram o mesmo coeficiente de variação obtido entre todos os ácidos graxos estudados, sendo a faixa de oscilação dos valores devido ao erro experimental restritas a 16,373 e 16,935.

Tabela 8.4 - Análise de coeficiente de variação da análise de ácido graxo C16:0 em *Sacharomyces cerevisiae* ATCC7752, em cinco extrações diferentes de uma mesma amostra.

Ácido Graxo	Repetição	Resultado (%)	Média (%)	Quadrado do desvio	Desvio padrão	Coeficiente variação
C16:0	1	16,277	16,654	0,1420	0,2813	1,69
	2	16,507	16,654	0,0218		
	3	16,653	16,654	0		
	4	17,002	16,654	0,1214		
	5	16,831	16,654	0,0313		

Os resultados contidos na Tabela 8.5, referentes à determinação do ácido C16:1, mostram também um pequeno coeficiente de variação, ficando a faixa de oscilação devido ao erro experimental entre 37,80 e 39,74.

Tabela 8.5 - Análise de coeficiente de variação da análise de ácido graxo C16:1 em *Sacharomyces cerevisiae* ATCC7752, em cinco extrações diferentes de uma mesma amostra.

Ácido Graxo	Repetição	Resultado (%)	Média (%)	Quadrado do desvio	Desvio padrão	Coeficiente variação
C16:1	1	39,422	38,770	0,4242	0,9711	2,50
	2	37,111	38,770	2,7531		
	3	39,494	38,770	0,5233		
	4	38,789	38,770	0,0003		
	5	39,037	38,770	0,0708		

Na Tabela 8.6 estão os resultados obtidos na determinação do ácido graxo C18:0, o qual mostrou um coeficiente de variação satisfatório, restringindo a faixa de oscilação dos valores devido ao erro experimental entre 5,951 e 6,731.

Tabela 8.6 - Análise de coeficiente de variação da análise de ácido graxo C18:0 em *Sacharomyces cerevisiae* ATCC7752, em cinco extrações diferentes de uma mesma amostra.

Ácido Graxo	Repetição	Resultado (%)	Média (%)	Quadrado do desvio	Desvio padrão	Coeficiente variação
C18:0	1	6,713	6,341	0,1381	0,3897	6,14
	2	5,695	6,341	0,4168		
	3	6,435	6,341	0,0088		
	4	6,548	6,341	0,0428		
	5	6,314	6,341	0,0007		

Na Tabela 8.7 estão os dados referentes à determinação do ácido graxo C18:1, com um coeficiente de variação bastante pequeno, levando a uma faixa de oscilação dos valores entre 34,894 e 37,301.

Tabela 8.7 - Análise de coeficiente de variação da análise de ácido graxo C18:1 em *Sacharomyces cerevisiae* ATCC7752, em cinco extrações diferentes de uma mesma amostra.

Ácido Graxo	Repetição	Resultado (%)	Média (%)	Quadrado do desvio	Desvio padrão	Coeficiente variação
C18:1	1	35,216	36,097	0,77553	1,2031	3,33
	2	38,131	36,097	4,13564		
	3	35,542	36,097	0,30868		
	4	36,241	36,097	0,02077		
	5	35,356	36,097	0,54986		

Os baixos coeficientes de variação encontrados para a determinação dos ácidos graxos C16:1 e C18:1, é de grande importância pois, segundo JIMÉNEZ & BENITEZ (1987), a concentração de ácidos graxos insaturados é que estão ligados ao nível de tolerância ao etanol das cepas de levedura.

A Tabela 8.8 mostra os resultados da composição porcentual dos ácidos graxos obtidos para cada cepa estudada.

Tabela 8.8 - Composição porcentual de cada ácido graxo em relação ao total e a relação de ácidos graxos total de cada cepa em função da concentração destes na *Sacharomyces Cerevisae*.

Usinas	C-12:0	C-14:0	C-14:1	C-16:0	C-16:1	C-18:0	C-18:1
Alvorada	0,404	0,797	n.d	21,175	39,154	6,901	31,568
Unialco	0,700	0,979	0,128	20,414	41,872	6,336	29,571
Diamante	0,680	1,054	n.d.	22,478	37,181	7,598	31,008
Diana	0,613	0,844	n.d.	20,601	39,345	7,047	31,548
Jalles Machado	0,585	1,059	n.d.	21,467	36,283	9,037	31,568
Junqueira	0,709	0,814	n.d.	21,080	37,894	7,718	31,784
Goisa	0,634	0,958	n.d.	23,738	37,142	8,946	28,582
Vale do Rosário	1,295	0,938	0,189	16,637	41,432	6,230	33,306
Bonfim	1,059	1,312	0,225	19,678	40,574	6,452	30,699
Costa Pinto	0,946	1,272	0,354	18,836	39,117	7,542	31,932
Guarani	0,974	1,602	n.d.	30,670	34,159	8,309	24,285
Andrade	1,077	0,874	0,166	19,754	40,214	6,424	31,490
Dacal	0,825	1,288	0,242	19,530	40,305	7,982	29,827
Dacalda	0,959	1,023	0,197	17,754	39,466	7,295	33,305
Alcoeste	1,074	1,393	0,289	15,611	41,990	5,398	34,248
Corol	0,773	1,172	0,272	19,370	42,638	5,873	29,901
Y 904	0,586	1,006	n.d.	16,596	39,811	7,173	34,827
Y 167	0,053	1,135	n.d.	22,754	36,568	10,307	29,212
Barra Grande	1,100	1,778	0,409	17,834	39,830	6,488	32,561
Santa Cruz	0,818	1,172	0,201	23,440	42,249	0,832	31,286
Clealco	0,648	1,450	0,287	19,957	41,033	6,98	29,716
S. Cerevisae	0,477	1,537	0,346	16,654	38,771	6,341	36,097

Nota-se pelos resultados contidos na Tabela 8.8 que os ácidos graxos que possuem a maior participação porcentual em relação aos ácidos graxos totais são o C-16:1 e o C18:1, justamente aqueles definidos por JIMENEZ & BENITEZ (1987) e ALTERTHUM & CRUZ (1987) como sendo os responsáveis pela tolerância ao etanol. Este resultado era esperado, já que todas as cepas estudadas foram selecionadas de processos industriais de produção de etanol, o que exige um mínimo de tolerância a este produto.

GUTIERREZ *et al.* (1990) encontrou para a *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em condições aeróbicas, as seguintes concentrações de ácidos graxos: > C-16:0 = 0,83; C-16:0 = 18,2; C16:1 = 42,7; C-18:0 = 4,05; C-18:1 = 34,2 (% sobre total de ácidos graxos). Estas concentrações são similares àquelas encontradas neste trabalho. Estes mesmos autores mostram a necessidade da presença de oxigênio para síntese dos ácidos C-16:1 e C18:1. Este fato vem mostrar a importância da aeração das cubas, durante o tratamento ácido nos processos industriais.

As Figuras 8.1 a 8.7, mostram os ajustes das concentrações de ácidos graxos C-12:0, C-14:0, C-14:1, C-16:0, C-16:1, C-18:0 e C-18:1 para o modelo de distribuição normal.

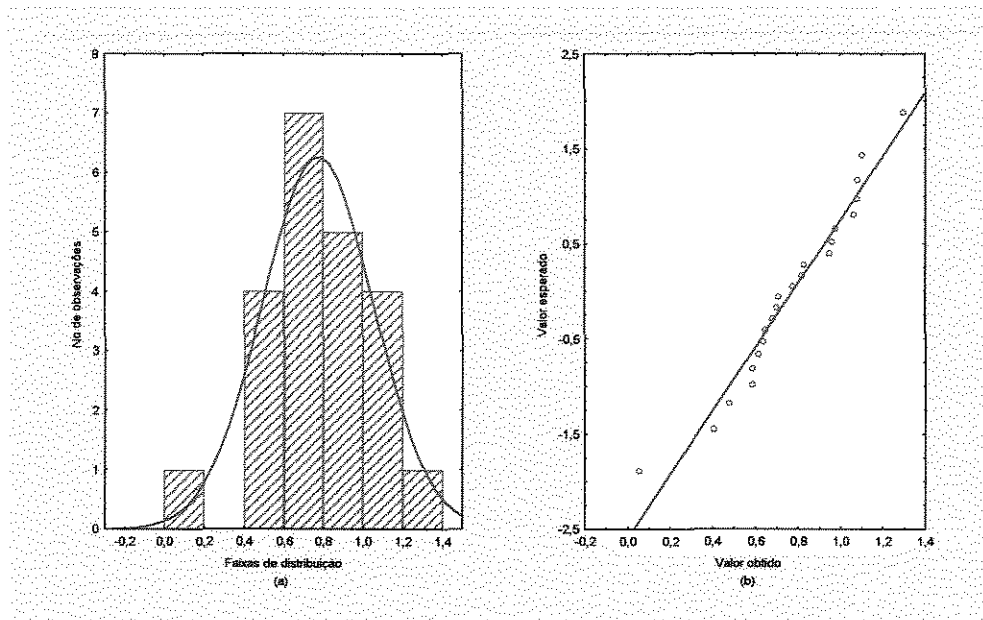


Figura 8.1 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para as concentrações do ácido graxo C-12:0.

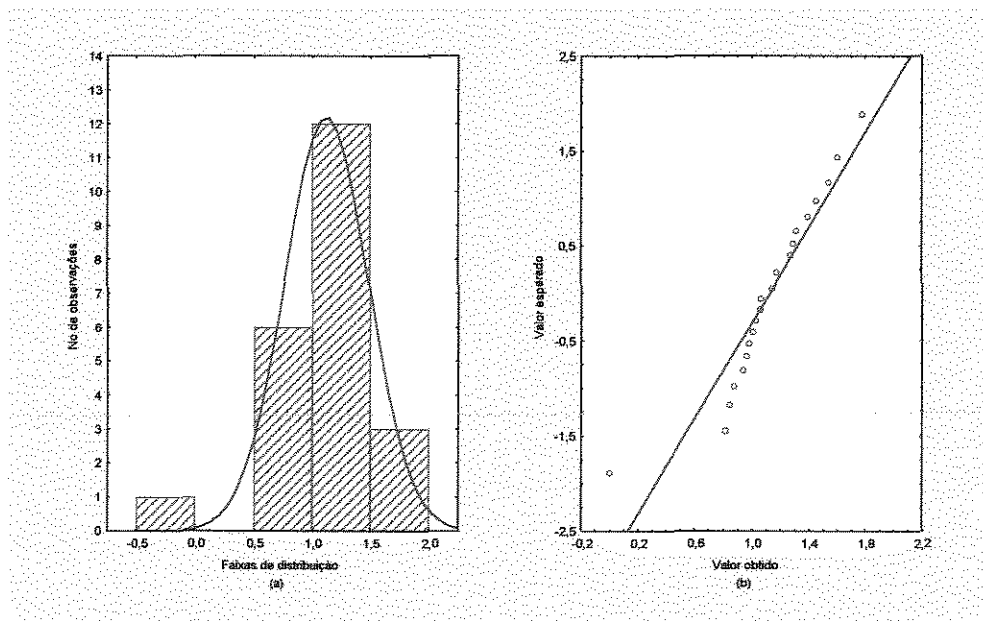


Figura 8.2 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para as concentrações do ácido graxo C-14:0.

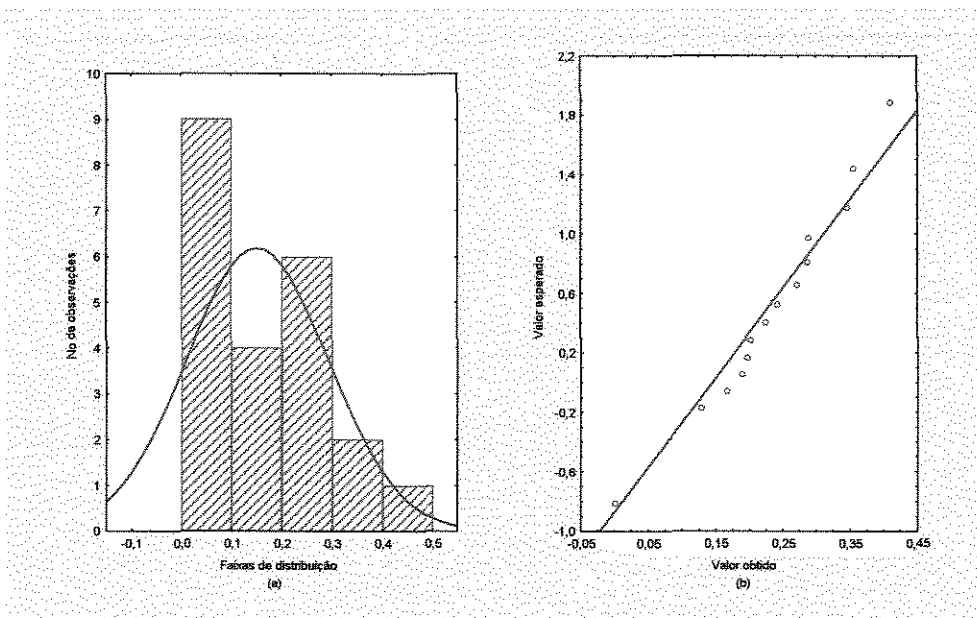


Figura 8.3 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para as concentrações do ácido graxo C-14:1.

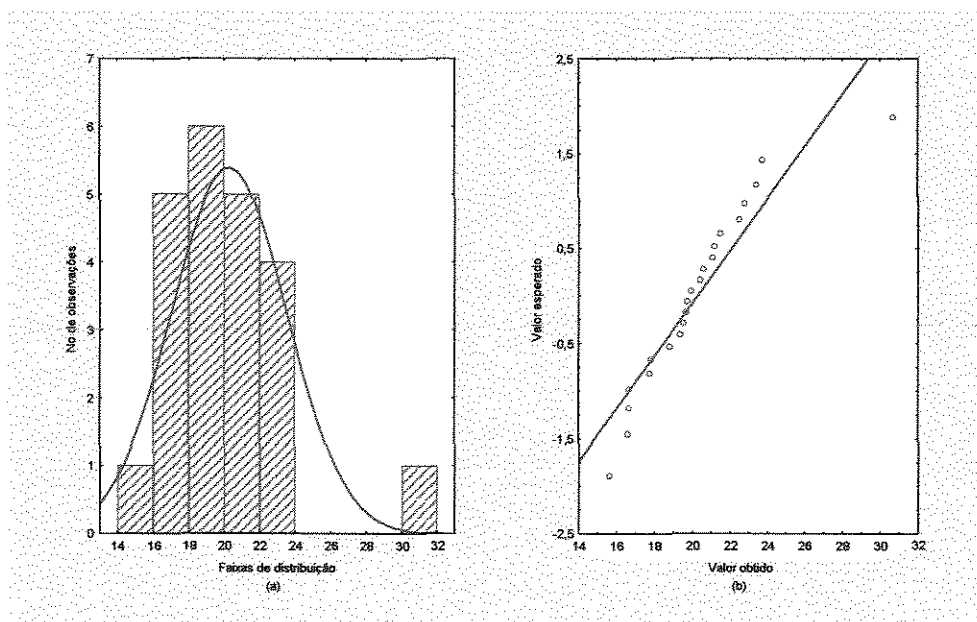


Figura 8.4 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para as concentrações do ácido graxo C-16:0.

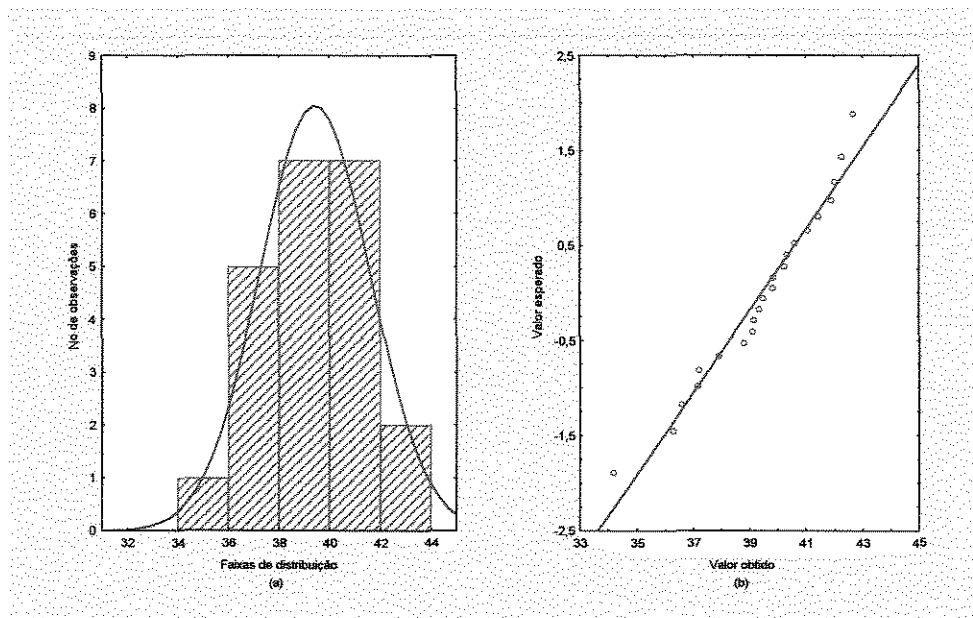


Figura 8.5 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para as concentrações do ácido graxo C-16:1.

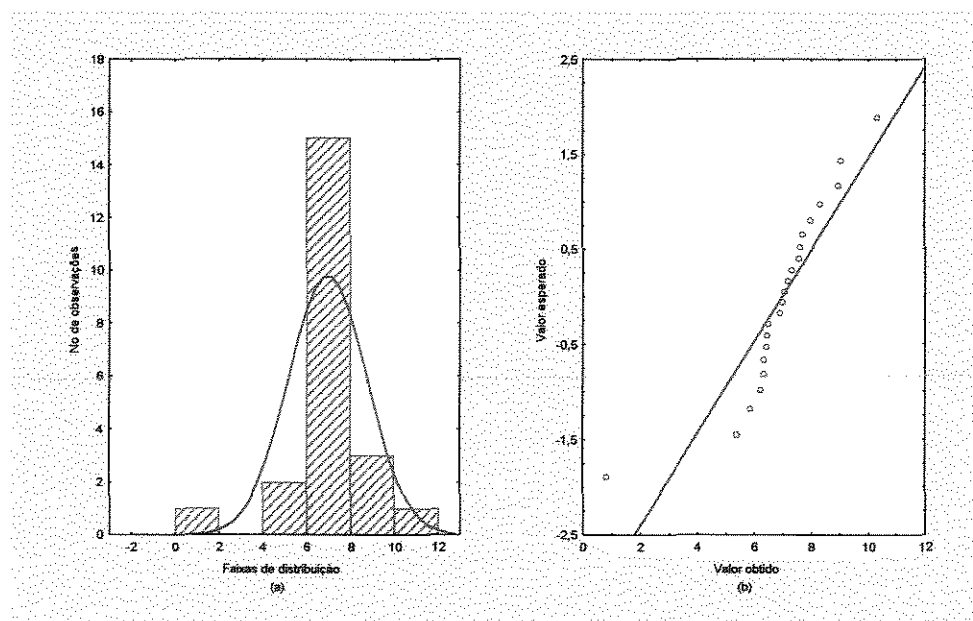


Figura 8.6 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para as concentrações do ácido graxo C-18:0.

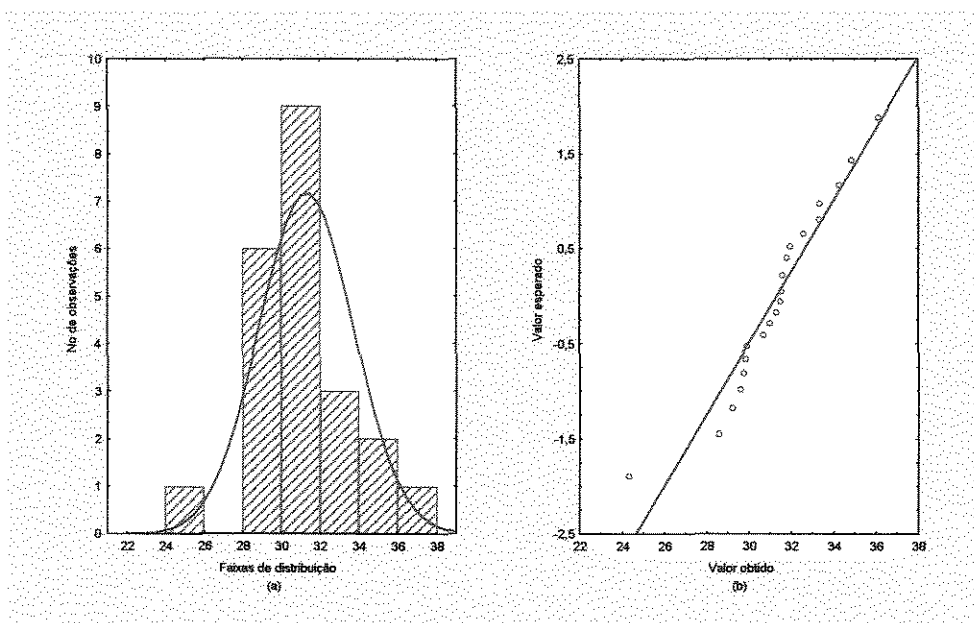


Figura 8.7 - Histograma e gráfico de probabilidade normal para as concentrações do ácido graxo C-18:1.

Observa-se pelas Figuras 8.1 a 8.7 que todos os ácidos graxos estudados ajustaram-se satisfatoriamente ao modelo de distribuição normal, podendo desta forma assumir este modelo para análise da população.

A Tabela 8.9 mostra a média dos valores da concentração dos ácidos graxos C-12:0, C-14:0, C-14:1, C-16:0, C-16:1, C-18:0 e C-18:1 (% em relação ao total de ácidos graxos), assim como, a variância e o intervalo de confiança ao nível de 95% para as 22 cepas testadas.

Tabela 8.9. Valores da média, dos intervalos de confiança (-95% e +95%), da variância e do desvio obtidos estatisticamente para os resultados dos ácidos graxos C-12:0, C-14:0, C-14:1, C-16:1, C-18:0 e C-18:1 (% em relação ao total de ácidos graxos).

Ac. Graxos	Média	-95%	+95%	Variância	Desvio
C-12:0	0,7722	0,6481	0,8963	0,0783	0,2799
C-14:0	1,1209	0,9616	1,2820	0,1291	0,3593
C-14:1	0,1503	0,0873	0,2132	0,0202	0,1420
C-16:0	20,2740	18,8318	21,7162	10,5805	3,2528
C-16:1	39,4104	38,4454	40,3753	4,7364	2,1763
C-18:0	6,9640	6,1717	7,7564	3,1934	1,7870
C-18:1	31,2873	30,2027	32,3720	5,9846	2,4463

Para melhor visualização dos resultados, a Tabela 8.10 mostra o posicionamento das concentrações dos ácidos graxo C-12:0, C-14:0, C14:1, C-16:1, C-18:0 e C-18:1 em relação ao intervalo de confiança para todas as cepas testadas.

Tabela 8.10 - Posicionamento das concentrações dos ácidos graxo C-12:0, C-14:0, C-16:0, C-16:1, C-18:0 e C-18:1 em relação ao intervalo de confiança ao nível de 95%. Abaixo do intervalo inferior (-), dentro do intervalo de confiança (0) e acima do limite superior.

Usinas	C-12:0	C-14:0	C14:1	C-16:0	C-16:1	C-18:0	C-18:1
Alvorada	-	-	-	0	0	0	0
Unialco	0	0	0	0	+	0	-
Diamante	0	0	-	+	-	0	0
Diana	-	-	-	0	0	0	0
J. Machado	-	0	-	0	-	+	0
Junqueira	0	-	-	0	-	0	0
Goisa	-	-	-	+	-	+	-
V. Rosário	+	-	0	-	+	0	+
Bonfim	+	+	+	0	+	0	0
Costa Pinto	+	0	+	0	0	0	0
Guarani	+	+	-	+	-	+	-
Andrade	+	-	0	0	0	0	0
Dacal	0	+	+	0	0	+	-
Dacalda	+	0	0	-	0	0	+
Alcoeste	+	+	+	-	+	-	+
Corol	0	0	+	0	+	-	-
Y904	-	0	-	-	0	0	+
Y167	-	0	-	+	-	+	-
B. Grande	+	+	+	-	0	0	+
Sta Cruz	0	0	0	+	+	-	0
Clealco	0	+	+	0	+	0	-
S. Cerevisae	-	+	+	-	0	0	+

Pelos dados contidos na Tabela 8.10, pode-se observar que as cepas apresentaram concentrações de ácidos graxos C-16:1 e C-18:1 acima do limite superior do intervalo de confiança foram: Vale do Rosário e a Alcoeste. Estas duas cepas possuem valores da constante k dentro do intervalo de confiança (Tabela 5.2), ou seja, tolerância ao etanol média entre as cepas testadas. Segundo JIMENEZ & BENITEZ (1987) e ALTERTHUM & CRUZ (1987) era de se esperar uma tolerância ao etanol acima da média. Isto também ocorre com a cepa Clealco que apresentou valores da constante k abaixo do limite mínimo do intervalo de confiança (Tabela 5.2), isto é, tolerância ao etanol acima da média, apresentou concentração do ácido graxo C-18:1 abaixo do limite inferior do intervalo de confiança (Tabela 8.10). Já a Goiasa que apresentou a menor tolerância ao etanol, apresentou concentrações dos ácidos graxos C16:1 e C18:1 abaixo do limite inferior do intervalo de confiança como era de se esperar.

Com os dados obtidos neste trabalho não foi possível determinar a existência de uma correlação entre a concentração dos ácidos graxos C-16:1 e C18:1 com a tolerância ao etanol como esperado. Todavia, é necessário frisar que as cepas aqui estudadas foram isoladas de processos industriais, sendo portanto adaptadas a condições extremas de processo tornando-as muito semelhantes. Este fato pode dificultar a determinação de uma correlação entre as variáveis, pois, a ordem de grandeza das variações podem ser menor que os erros metodológicos.

4. BIBLIOGRAFIA

ABEL, K.; DE SCHMERTZING, H.; PETERSON, J.I. Classification of micro-organisms by analysis of chemical composition. 1. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriology*, 85, p.1039-1044, 1993.

AHVENAINEN, J. Lipid composition of aerobically and anaerobically propagated brewer's bottom yeast. *Journal of Institute of Brewing*, v.88, p.367-370, 1982.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M. aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja. *Revista de microbiologia*, v.18(1), p.52-57, 1987.

AUGUSTYN, O.P.H. Differentiation between yeast species and strains within a species by cellular fatty acid analysis. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Enolic Viticulture*, v.10, p.8-17, 1989.

AUGUSTYN, O.P.H; KOCK, JLF. Differentiation between yeast species and strains within a species by cellular fatty acid analysis. 1. strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Methods*, v.10, p.9-23, 1989

AUGUSTYN, O.P.H; KOCK, JLF., FERREIRA, D. Differentiation between yeast species and strains within a species by cellular fatty acid analysis. 3. *Saccharomyces sensu lato*, *Arxiozyma* and *Pachytispora*. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.13, p.44-55, 1990.

AUGUSTYN, O.P.H; FERREIRA, D; KOCK, JLF. Differentiation between yeast species and strains within a species by cellular fatty acid analysis. *Saccharomyces sensu stricto*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* and *Wickerhamiella*. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.14, p.324-334, 1991.

AUGUSTYN, O.P.H; KOCK, J.L.F., FERREIRA, D. Differentiation between yeast species and strains within a species by cellular fatty acid analysis. 5. A feasible technique? *Syst. Appl. Microbiol.*, v.15, p.105-115, 1992.

BLOOMFIELD, D.K.; BLOCK, K. The formation of unsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*, v.235(2), p.337-345, 1960.

BOTHA, A.; KOCK, J.L.F. Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, v.19, p.39-51, 1993.

BROWN, C.M.; ROSE, A.H. Fatty-acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolved-oxygen tension. *Journal of Bacteriology*, v.99(2), p.371-378, 1969.

COTTRELL, M.; VILJOEN, B.C.; KOCK, J.L.F.; LATEGA, P.M. The long-chain fatty acid compositions of species representing the genera *Saccharomyces*, *Swanniomyces* and *Lipomyces*. *J. Gen. Microbiol.*, v.132, p.2401-2403, 1986.

GANGOPADHYAY, P.K.; THADEPALLI, H.; ROY, I.; ANSARI, A. Identification of species of *Candida*, *Cryptococcus* and *Torulopsis* by gas-liquid chromatography. *J. Infect. Dis.*, v.40, p. 952-958.

GIUDICI, P.; GUERZONI, M.E.; CONTE, L. Relationship of cellular fatty acid composition to the ethaol productivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Vini D'Italia*, v.25(145), p.147-153, 1983.

GUTIERREZ, L.E.; ANICHINO, A.V.L.O.; LUCATTI, L. Capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, v.47(2), p.575-596, 1990.

JIMÉNEZ, J.; BENITEZ, T. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. *Appl. and Environmental Microbiology*, Washington, D.C., v.53, n.5, p.1196-1198, May, 1987.

KOCK, J.L.F.; COTTRELL, M.; LATEGAN, P.M. A rapid method to differentiate between five species of the genus *Saccharomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.23, p.499-501, 1986.

KORN, E.D. The fatty acids of *Euglena gracilis*. *J. Lipid Res.*, v.5, p.352-362, 1964.

MISHRA, P.; PRASSAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.30, p.294-298, 1989.

NAGAR-LEGMAN, R; MARGALITH, P. A comparative study of the lipid composition of yeast with different fermentative capacities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.26, p.49-54, 1987.

SUZUKI, K.I.; KOMOGATA, K. Taxonomic significance of cellular fatty acid compositions in some coryneform bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.33, p.188-200, 1983.

THOMAS, D.S.; HOSSACK, J.A.; ROSE, A.H. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, v.117, p.239-245, 1978.

TREDOUX, H.G.; KOCK, J.L.F.; LATEGAN, P.M. The use of cellular long-chain fatty acid composition in the identification of some yeasts associated with the wine industry. *System. Appl. Microbiolog.*, v.9, p.299-306, 1987.

CAPÍTULO 9

CONCLUSÕES

OBJETIVO

**NESTE CAPÍTULO SÃO APRESENTADAS AS CONCLUSÕES EM QUE FOI POSSÍVEL SE
CHEGAR APÓS AVALIAÇÃO COMPLETA DOS RESULTADOS OBTIDOS EM CADA
CAPÍTULO**

- ✓ As cepas testadas mostraram diferenças em seu desempenho fermentativo, dando origem a 17 grupos quando classificadas pela metodologia da capacidade fermentativa (ANDRIETTA *et al.*, 1999). Apesar das diferenças observadas, estas cepas apresentaram um comportamento fermentativo bastante satisfatório, estando elas englobadas em grupos com características fermentativas adequadas para uso industrial.
- ✓ Quando classificadas pela metodologia da taxonomia numérica, foi possível identificar 20 das 22 cepas testadas. Entre as identificadas, 8 são *Saccharomyces chevalieri*, 7 são *Saccharomyces cerevisae* e 5 são *Saccharomyces coreanus*, segundo GRIFFITHS (1981). Segundo BARNET (1992) as 20 cepas identificadas na taxonomia numérica são consideradas *Saccharomyces cerevisae*.
- ✓ As duas cepas, entre as 22, que não foram identificadas quando a metodologia GRIFFITHS (1981) foi utilizada, são cepas que apresentaram a capacidade de assimilação de celobiose. Estas cepas podem possuir ainda características celulolíticas, podendo ser importantes para obtenção de etanol de material celulósico.

- ✓ Quanto à tolerância ao etanol, quando foi utilizada a metodologia descrita por JIMÉNEZ & Van UDEN (1985) foi possível verificar diferenças entre as cepas testadas. Entre estas cepas, destaca-se a Clealco, Barra Grande e Santa Cruz como as mais tolerantes e a Costa Pinto e a Goiasa como as menos tolerantes. Todavia, esta comparação serve somente para diferenciar estas cepas uma das outras, pois é de se esperar que todas tenham uma alta tolerância ao etanol devido ao meio onde foram isoladas.
- ✓ As cepas testadas mostraram grande variação do teor de trealose em sua composição, sendo as cepas Diana e Goiasa com maior teor de trealose e as Unialco, Dacalda e *S. cerevisiae* ATCC 7752 as que apresentaram valores abaixo da faixa de detecção do método. No caso de se associar o nível de trealose com a resistência ao stress, pode-se afirmar que os processos fermentativos da Destilaria Nova Avanhadava e da Goiasa operam em condições desfavoráveis à levedura, levando a uma seleção de cepas com alta resistência ao stress.
- ✓ Não foi possível relacionar a tolerância ao etanol com as concentrações de trealose.
- ✓ Os níveis de proteína encontrados nas cepas testadas foram bastante diversos. Estes podem ser relacionadas com o rendimento em massa celular. Quanto maior o valor de $Y_{x/s}$ (produção específica de massa celular) menor o nível de proteína na massa celular.
- ✓ Não foi possível relacionar a quantidade dos aminoácidos, componentes da proteína, com a concentração de proteína nas células, ou seja, o aumento da massa protéica nas células não é responsável pelo aumento da proporção de um dado aminoácido na mesma.

- ✓ ácido aspártico, o ácido glutâmico e a lisina são os aminoácidos mais abundantes na composição das proteínas componentes das células de levedura testadas. Característica esta, peculiar quando a proteína de *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada.
- ✓ Existem correlações entre a concentração de alguns aminoácidos no material protéico, sendo estas sempre positivas, ou seja, quando a concentração de um aumenta, o mesmo ocorre com a do outro.
- ✓ Todas cepas testadas apresentaram os ácidos graxos C-12:0, C-14:0, C-16:0, C-16:1, C-18:0 e C-18:1 em sua composição. Algumas cepas apresentaram ainda o ácido graxo insaturado C14:1.
- ✓ Os ácidos graxos insaturados (C-16:1 e C-18:1) são os de maior abundância no material graxo que compõe as cepas testadas, que segundo alguns autores estão vinculados com a tolerância das cepas ao etanol. Alguns indícios de relação entre o teor de ácidos graxos C-16:1 e C-18:1 e a tolerância ao etanol pode ser observado, mas uma correlação exata não pode ser determinada.
- ✓ As cepas isoladas dos diversos processos fermentativos apresentaram variações comportamentais e de composição celular. Desta forma é possível afirmar que essas diferem entre si. Isto confirma a hipótese que cada processo seleciona sua própria linhagem, e que a mesma é habitante natural da matéria-prima que a unidade processa.