

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E DE COMPOSIÇÃO EM  
*Saccharomyces cerevisiae* SOB CONDIÇÕES NÃO  
PROLIFERANTES**

**ANDRÉ EDUARDO DE SOUZA BELLUCO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre  
em Ciências, Área de Concentração: Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Julho - 2001

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E DE COMPOSIÇÃO EM  
*Saccharomyces cerevisiae* SOB CONDIÇÕES NÃO  
PROLIFERANTES**

**ANDRÉ EDUARDO DE SOUZA BELLUCO**

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JORGE HORII**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em  
Ciências, Área de Concentração: Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

**P I R A C I C A B A**

Estado de São Paulo - Brasil

Julho – 2001

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP**

Belluco, André Eduardo de Souza

Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes / André Eduardo de Souza Belluco. - - Piracicaba, 2001.

84 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.

Bibliografia.

1. Autólise 2. Levedura 3. Trealose 4. Viabilidade I. Título

CDD 589.23

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

**Aos meus pais,  
Celso Belluco e  
Neide Gumbis de Souza Belluco,**  
Dedico

**Às minhas irmãs,  
Claudia e Cristina,  
querida Elaine e  
aos meus pequenos sobrinhos,  
Gabriel, Kim e Kimberly,**  
Ofereço

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela existência e força para percorrer a trilha da vida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela formação profissional e apoio de seus funcionários e professores.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos oferecida durante o curso de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pela amizade, orientação durante a realização do trabalho e por proporcionar amplo conhecimento de vida.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez, pela amizade, e auxílios em Bioquímica.

À Profa. Dra. Marília Oetterer, pela amizade, apoio e ensinamentos durante o curso.

Ao Prof Dr. André Ricardo Alcarde, pela amizade e incentivo.

À amiga Regina Helena Gonçalves, pelo enorme auxílio nas análises laboratoriais.

À Silene Paulillo, pela amizade e incentivo.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pela colaboração nas análises estatísticas.

À Rosemeire Dichaune e Cel-Lep escola de idiomas pelo auxílio nas correções do SUMMARY.

Às Bibliotecárias Beatriz Helena Giongo e Midian Gustinelli, pela amizade e auxílio na organização das referências bibliográficas.

À todos os meus amigos de pós-graduação, Anny, Antonio, Ariovaldo, Carlos, Evelise, Juliana, Mariana, Patrícia, Solange e todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização do trabalho.

Aos meus familiares, pelo apoio e compreensão, com destaque para Alfredo, Antonia, Sergio, Waldir, Euclides, Edviges, Kathia, Lygia, Marcio, Maria, Joaquim e Marco.

À empresa Mauri do Brasil, pelo fornecimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Y904.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Crescimento de leveduras.....	3
2.2 Carboidratos de reserva.....	8
2.2.1 Glicogênio.....	11
2.2.1.1 Acúmulo de glicogênio em leveduras.....	11
2.2.1.2 Mobilização de glicogênio em leveduras.....	12
2.2.2 Trealose.....	13
2.2.2.1 Acúmulo de trealose em leveduras.....	14
2.2.2.2 Mobilização de trealose em leveduras.....	16
2.3 Viabilidade celular em leveduras.....	17
2.4 Óleo vegetal em leveduras.....	20
2.5 Condições não favoráveis à proliferação.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Microrganismo.....	26
3.2 Meios de cultura.....	26
3.2.1 Meios de manutenção e de reativação das células desidratadas.....	26

3.2.2 Meio de cultivo para fermentação.....	27
3.3 Verificação da pureza da levedura comercial desidratada.....	28
3.3.1 Reativação da cultura desidratada para isolamento.....	28
3.3.2 Isolamento e purificação das culturas de leveduras.....	28
3.4 Fermentação e obtenção das leveduras para análise.....	29
3.4.1 Monitoramento das alterações fisiológicas na suspensão celular.....	30
3.5 Análise estatística.....	31
3.6 Tratamentos.....	31
3.7 Análises físico-químicas e microbiológicas.....	31
3.7.1 Viabilidade celular.....	31
3.7.2 Teor alcoólico.....	31
3.7.3 Concentração de leveduras.....	32
3.7.4 Nitrogênio total, na matéria seca.....	32
3.7.5 Carboidratos totais.....	32
3.7.6 Carboidratos de reserva.....	33
3.7.6.1 Teor de glicogênio.....	33
3.7.6.2 Teor de trealose.....	33
3.7.7 Levedura referência.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Fermentação.....	34
4.2 Monitoramento das alterações fisiológicas na suspensão celular.....	38
4.2.1 Viabilidade celular.....	38
4.2.2 Nitrogênio total.....	42
4.2.3 Carboidratos.....	45
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICES.....	62



## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Metodologia para isolamento e purificação de leveduras.....	29
2 Acompanhamento da fermentação pela diferença média de massa em pesagens sucessivas.....	37
3 Perfil da viabilidade celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y904 em condições não proliferantes, sob agitação.....	40
4 Concentração celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em condições não proliferantes ao longo do período de 8 dias.....	42
5 Nitrogênio total na suspensão celular e no meio líquido.....	43
6 Nitrogênio na massa seca de leveduras.....	44
7 Carboidratos totais obtidos na suspensão celular de leveduras, após coleta de células e lavagem.....	45
8 Trealose em leveduras mantidas em condições não proliferantes ao longo de 192 h. Teores percentuais em relação à matéria seca.....	47
9 Teores de trealose expressos em porcentagem dos carboidratos totais no decorrer de 192 h, em condições não proliferantes de <i>S. cerevisiae</i> , em solução fisiológica de KCl 0,154M.....	47
10 Glicogênio em leveduras. Teores percentuais em relação a matéria seca de <i>S. cerevisiae</i> mantida em condições não proliferantes ao longo de 192 h.....	49

## LISTA DE TABELAS

	Página
1 Composição molecular de levedura comercial e melaço.....	4
2 Composição química aproximada da levedura seca.....	5
3 Teores de N na matéria seca do fermento e na água ácida da suspensão em função do tempo (h) e dos tratamentos.....	7
4 Caracterização e quantificação dos carboidratos presentes em leveduras.....	9
5 Composição de carboidratos de algumas linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
6 Resultados de concentração celular (g/L), em ensaios com mosto de 310 g ART/L, com 3 repetições.....	18
7 Viabilidade celular (%), nos ensaios com mosto de 310 g ART/L, com 3 repetições.....	19
8 Meio de cultura YEPD ágar “Yeast extract peptone dextrose agar” para manutenção da linhagem e plaqueamento.....	26
9 Meio de cultivo YEPD líquido “Yeast extract peptone dextrose” para reativação da linhagem comercial.....	27
10 Meio de cultivo YEPS “Yeast extract peptone sucrose” para fermentação.	27
11 Viabilidade celular em leveduras para realização da fase de fermentação..	35
12 Contagem das unidades formadoras de colônias de leveduras após fase de reativação.....	36
13 Teor alcoólico das amostras fermentadas em presença ou ausência de óleo de soja.....	37

14 Viabilidade celular, nitrogênio total, carboidratos totais, trealose e glicogênio em levedura reidratada em água.....	39
--	----

## **ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E DE COMPOSIÇÃO EM *Saccharomyces cerevisiae* SOB CONDIÇÕES NÃO PROLIFERANTES**

Autor: ANDRÉ EDUARDO DE SOUZA BELLUCO

Orientador: Prof. Dr. JORGE HORII

### **RESUMO**

As leveduras são de relevante importância dentro da agroindústria sucroalcooleira devido sua participação no processo fermentativo de produção de álcool. Deste modo, faz-se necessário o conhecimento deste agente fermentativo com destaque para *Saccharomyces cerevisiae*, principal gênero.

O objetivo deste trabalho foi estudar a linhagem de levedura *S. cerevisiae* Y904, exposta a condições não proliferantes, após fermentação em meio que sofreu adição de óleo vegetal e sua possível correlação com manutenção da viabilidade celular. Foram realizadas análises para contagem de unidades formadoras de colônias, viabilidade celular, concentração celular, nitrogênio total na levedura e no meio, carboidratos totais, trealose e glicogênio.

As leveduras submetidas a condições não proliferantes apresentaram menores teores de carboidratos totais, com destaque para trealose e glicogênio, em relação às leveduras comerciais.

*Saccharomyces cerevisiae* sofreu queda de viabilidade acentuada após 24 h em solução fisiológica, em condições não proliferantes, sob agitação

de 90 rpm e temperatura de  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , seguida de uma acentuada autólise a partir de 120 h (5º dia), provavelmente, devido ao teor de carboidratos de reserva da célula que se encontravam em valores extremamente baixos, da ordem de 0,15 mg de trealose em 100 mg da matéria seca e 4 mg de glicogênio em 100 mg da matéria seca. A partir desse ponto entraram em total desorganização celular.

## **PHYSIOLOGICAL AND COMPOSITION CHANGES IN *Saccharomyces cerevisiae* UNDER NON-PROLIFERATING CONDITIONS**

Author: ANDRÉ EDUARDO DE SOUZA BELLUCO

Adviser: Prof. Dr. JORGE HORII

### **SUMMARY**

Yeast is highly important in sugar and alcohol agroindustry due to its role in the fermentative process of alcohol production. Thus, it is necessary to know this microorganism, most specially the *Saccharomyces cerevisiae*, the main species.

The objective of this work was to study the strain Y904 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under non-proliferating conditions after fermentation in a medium in which it was added vegetable oil and verify its possible correlation with the maintenance of the cellular viability.

Analyses were performed in order to determine colony forming units, cellular viability, cellular concentration, total nitrogen in yeast and in medium, total carbohydrates and trehalose and glycogen contents.

The yeast submitted to non-proliferating conditions presented a lower content of total carbohydrates, specially trehalose and glycogen, when compared to commercial yeasts.

The viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Y904 markedly decreased after 24 hours in physiological solution under non-proliferating conditions in a shaker for 90 rpm at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . It was observed an accentuated autolysis from the 120<sup>th</sup> hour (5<sup>th</sup> day) on. This was probably because of the very low content of the carbohydrates of reserve in the cells, 0.15 mg of trehalose and 4.0 mg of glycogen in 100 mg of dry weight. From this point the cells began a total cellular disorganization.

## 1 INTRODUÇÃO

A fermentação é uma transformação bioquímica provocada num substrato por fermento vivo ou por um princípio extraído deste fermento. A importância deste processo está diretamente relacionada com diversos setores da agroindústria, com destaque para a alcooleira. O setor alcooleiro, no Brasil, utiliza-se, de leveduras, do gênero *Saccharomyces*, predominantemente a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e suas diversas linhagens de grande adaptação às condições industriais.

Devido ao considerável gerador econômico que o setor representa, a produtora de álcool enquadra-se entre as principais, que compõem a agroindústria.

A produção de álcool etílico ultrapassa a 12 bilhões de litros (Carvalho, 2000), e levando-se em consideração que toda a produção de álcool no país é derivada de processo fermentativo, tem-se uma grande preocupação no conhecimento do agente responsável pela fermentação. Assim sendo, é de relevante interesse conhecer, o comportamento do microrganismo no tocante a velocidade específica de crescimento, da formação de produto, e toda sua relação com substrato mas, também conhecer a resistência a condições estressantes e não proliferantes como por ocasião de paradas na indústria.

Neste trabalho procurou-se monitorar a *Saccharomyces cerevisiae* quando exposta a condição não proliferante, isenta de reações adversas, após uma fermentação alcoólica, mantendo-se entretanto o sistema agitado, com maior gasto de energia de manutenção. Foram avaliados os efeitos nas substâncias nitrogenadas, carboidratos de reservas, concentração celular e



viabilidade celular das leveduras, entre outros fatores, que pudessem interferir, significativamente, dentro deste contexto na ação das leveduras.

### **Objetivos**

O escopo desta pesquisa foi estudar a:

- influência do teor de carboidratos de reserva sobre o tempo de sobrevivência das células sob condições não proliferantes;
- possibilidade de lipídeos, de óleo de soja comercial adicionado ao substrato da fermentação, exercer alguma influência sobre a sobrevivência destas leveduras.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Crescimento de leveduras**

Segundo Ribeiro et al. (1987), as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais durante o processo de fermentação alcoólica, os quais influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool.

O nitrogênio devido a sua importância para as leveduras, é considerado um elemento essencial para a multiplicação e crescimento das leveduras. Este nutriente entra como constituinte de várias substâncias orgânicas encontradas nas leveduras, como os aminoácidos, proteínas, enzimas, piridinas, purinas, pigmentos respiratórios (citocromos), lecitina, vitaminas e cefalina (White, 1954).

Ainda, segundo Harrison (1971), o nitrogênio é um dos principais elementos presentes em leveduras além do carbono, hidrogênio e oxigênio, os quais, normalmente, representam cerca de 94 % da matéria seca, como pode ser observado na Tabela 1. Desta maneira, estes elementos formam as substâncias como os carboidratos glicogênio, celulose e mananas e as substâncias nitrogenadas como as proteínas, ácidos nucleicos e bases orgânicas piridinas e purinas. Do total de nitrogênio presente na levedura, 70% está, provavelmente, na forma de proteína, enquanto uma menor parte, cerca de 8 a 10 % aparece como purinas e 4 % como piridinas, sendo que o restante do nitrogênio, deve estar presente na forma de componentes solúveis, como aminoácidos e nucleotídeos (White, 1954).

Tabela 1. Composição molecular de levedura comercial e melação.

Constituinte	Levedura (g/100g de matéria seca)	Melação (g/100g de matéria seca)
Carbono (C)	45,00 - 47,00	39,00 - 41,00
Hidrogênio (H)	6,00 - 6,50	6,30 - 6,80
Oxigênio (O)	31,00 - 32,00	47,00 - 50,00
Nitrogênio (N)	7,50 - 9,00	0,10 - 2,80
Potássio (K)	0,90 - 3,50	0,80 - 5,20
Fósforo (P)	1,10 - 2,00	0,01 - 0,90
Enxofre (S)	0,30 - 0,50	0,15 - 0,20
Magnésio (Mg)	0,15 - 0,50	0,007 - 0,75
Cálcio (Ca)	0,04 - 0,90	0,018 - 1,20
Sódio (Na)	0,02 - 0,20	0,82 - 1,40
Zinco (Zn)	0,004 - 0,13	0,0006 - 0,013
Ferro (Fe)	0,003 - 0,10	0,01 - 0,021
Cobre (Cu)	0,002 - 0,012	0,0001 - 0,006
Manganês (Mn)	0,0004 - 0,0035	0,001 - 0,004
Cobalto (Co)	0,0005	0,00004 - 0,0001
Molibdênio (Mo)	0,000005 - 0,000009	0,000009 - 0,000026
Cloro (Cl)	0,004 - 0,10	1,30
Iodo (I)	0,00005 - 0,0004	-
Chumbo (Pb)	0,0001 - 0,0007	0,0006
Arsênio (As)	0,00001	-
Silício (Si)	-	0,028
Estrôncio (Sr)	-	0,005
Boro (B)	-	0,0002 - 0,0004

Fonte: Harrison (1971)

A composição das leveduras, varia em função de diversos fatores, como o substrato no qual é cultivada, a espécie de levedura, o método de

fermentação, o modo e as condições de secagem e a idade das células, segundo já citava Desmonts (1968). Além destes fatores, Ghiraldini & Rossell (1997) citam que no processo de obtenção de levedura de recuperação, as lavagens sucessivas com água, com objetivo de eliminar as impurezas do leite de levedo ou do resíduo do fundo de dornas, podem ocasionar mudanças no que se refere a composição da levedura.

Na Tabela 2, é mostrada a composição química, aproximada, da levedura seca, de recuperação. A composição de proteína bruta está em torno de 30 % (Lahr Filho et al., 1996).

Segundo Caballero Córdoba et al. (1997), os teores da composição centesimal da biomassa de levedura de cervejaria *Saccharomyces sp.*, apresenta elevados teores de proteínas (48,51 %), além de cinzas (8,33 %), ácido ribonucléico (7,52 %) e fibra solúvel (9,59 %), enquanto os teores de lipídeos totais são baixos (3,44 %) e os de carboidratos totais representam um terço da biomassa (32,86 %).

Tabela 2. Composição química aproximada da levedura seca.

Discriminação	Fonte			
	Miyada (1978)	Fialho et al. (1983)	Lima (1983)	Moreira (1984)
Matéria seca (%)	90,70	93,90	92,34	96,40
Proteína bruta (%)	30,77	30,62	29,17	30,23
Extrato etéreo (%)	1,10	1,60	1,22	0,89
Fibra bruta (%)	0,13	2,35	0,79	0,72
Materia mineral (%)	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)

Consta ainda que a composição de aminoácidos das leveduras é bem balanceada, destacando-se os teores elevados de lisina, metionina e treonina (Ghiraldini & Rossell, 1997).

Morris citado por Ribeiro et al. (1987), destacou a importância da adição de nitrogênio extracelular para que possa ocorrer uma contínua produção de novas células e a levedura possa obter este elemento através de aminoácidos, sais de amônia, amidas e nitratos. A forma como este nutriente se encontra disponível no meio é de grande importância para seu aproveitamento, sendo a mais favorável a amoniacal; na sua ausência são utilizadas outras fontes, e como consequência há um aumento de produção de compostos secundários, como os álcoois isoamílico, amílico e propílico (Ribeiro et al., 1987 e Vasconcelos, 1987).

A levedura em suspensão em água ácida sofre mudanças nos componentes nitrogenados podendo ocorrer eventuais excreções deste elemento para o meio, como mostraram Amorim & Gomes (1988), apresentada na Tabela 3. Ainda, Amorim & Gomes (1987) observaram a ocorrência de perda de potássio na levedura, sendo que o nitrogênio e as proteínas não sofreram alterações ou apenas pequenas elevações no decorrer do tratamento; isto se deve a hipótese de que há uma perda de material não nitrogenado em maior proporção do que o nitrogenado.

*Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e VR-1, no período de 6 e 8 h de fermentação de acordo com as linhagens, apresentaram baixos teores de nitrogênio no vinho, mas após este tempo com a ocorrência de autólise celular, Ferreira (1998) observou aumento acentuado de nitrogênio no vinho e além de queda da viabilidade celular proporcional ao fenômeno em pauta.

Tabela 3. Teores de N na matéria seca do fermento e na água ácida da suspensão em função do tempo (h) e dos tratamentos.

			Células de fermento				Água ácida da suspensão (N ppm)		
			N (%)						
Temperatura	pH	%células	0 h	1,5 h	3 h	6 h	1,5 h	3 h	6 h
Ambiente	2,00	30,00	7,21	7,45	7,56	7,28	14,00	21,00	25,00
		40,00	6,58	6,86	7,21	6,65	41,30	46,20	48,20
	2,50	30,00	6,96	6,82	6,82	6,83	26,60	32,90	34,30
		40,00	6,75	6,65	6,58	6,72	35,70	38,50	38,50
30°C	3,00	30,00	6,51	6,51	6,77	7,00	13,44	14,00	13,72
		40,00	7,07	6,58	6,23	6,37	24,64	25,40	25,40
	2,00	30,00	6,93	6,72	7,00	7,00	25,00	26,00	31,00
		40,00					17,50	21,70	25,20
40°	2,50	30,00					24,60	24,48	30,00
		40,00	6,55	5,88	5,95	6,44	25,00	26,00	29,00
	3,00	30,00	5,89	6,93	6,60	6,44	10,00	11,34	11,06
		40,00	6,78	6,65	6,65	6,65	30,00	33,00	37,00
40°	2,00	30,00					16,38	17,64	23,00
		40,00	6,37	6,09	6,23	6,16	28,28	33,60	40,74
	2,50	30,00	6,16	6,37	6,65	6,37			
		40,00	6,37	6,44	6,58	6,51	21,28	26,60	27,02
3,00	30,00	6,79	6,65	6,80	7,00	10,50	13,00	15,54	
	40,00	6,37	6,16	6,44	6,72	41,44	54,04	73,36	

Fonte: Amorim & Gomes (1988)

As proteínas presentes nas leveduras, além de exercerem importantes funções metabólicas, apresentam grande interesse comercial. Nogueira & Oliva Neto (2000) apontaram que a levedura resultante da fermentação alcoólica industrial está sendo recuperada na forma de subproduto para ser comercializada como alimento protéico, para ração animal, no mercado interno e externo; é também destacado que geralmente o conteúdo protéico dos microrganismos é mais elevado em relação à maioria das outras fontes. Caballero Córdoba et. al. (1997) destacaram que a produção de isolados e concentrados protéicos, a partir de microrganismos, como as leveduras, bactérias e algas, tem sido muito considerado nestas últimas décadas, sendo que Halász et al. (1988) afirmaram, que estes são boas fontes protéicas não convencionais, devido ao teor elevado de proteínas que apresentam (45-65%).

Ghiraldini & Rossell (1997), relataram um aumento no teor de proteínas da levedura, através do consumo dos carboidratos de reserva, os quais resultaram em álcool, ocorrendo conseqüentemente uma perda de matéria seca no processo.

## **2.2 Carboidratos de reserva**

O açúcar que se encontra no mosto é utilizado pela levedura para a produção de etanol, gás carbônico, massa celular, glicerol, ácidos succínico e acético, álcoois superiores, ésteres, trealose, entre outros produtos.

Segundo Peppler (1970) as leveduras utilizadas em alimentação têm, em sua composição, 22 % a 34 % de carboidratos, sendo que este varia com a composição do meio de crescimento e o nível de aerobiose mantido. Chen (1959) verificou que 25 % do peso seco das células era carboidrato e isolou quatro frações que calculava ser aproximadamente 94 % do total (Tabela 4). Manners (1971), mostrou diversos teores de carboidratos em leveduras de panificação e de cervejaria e um baixo conteúdo de trealose quando a mesma foi submetida a crescimento em condições aeróbias (Tabela 5). White (1954),

relatou uma composição de glicogênio de 1 até 30 % de matéria seca de levedura.

Tabela 4. Caracterização e quantificação dos carboidratos presentes em leveduras.

Carboidratos	25 % da matéria seca da levedura
	Carboidratos (%)
Trealose	33
Glucanos	27
Mananas	21
Glicogênio	12

Fonte: Chen (1959)

Tabela 5. Composição de carboidratos de algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Carboidrato	Conteúdo de carboidratos (%)				
	Panificação		Cervejaria		
	77	4236	4236*	7000	7001
Trealose	5	8	1	5	6
Glicogênio	62	76	38	71	52
Manana	16	7	36	12	24
$\beta$ - Glucana	16	9	26	12	19

Fonte: Manners (1971)

\* Levedura crescida aerobicamente. Todas outras leveduras foram crescidas anaerobicamente, a 25°C, e por tempo de 48h.



A fermentação endógena em *Saccharomyces cerevisiae*, é processo metabólico de conversão de carboidratos de reserva em etanol, na ausência de substratos exógenos. Ferreira et al. (1999), citaram que a fermentação endógena é um processo, no qual a levedura mobiliza os seus carboidratos de reserva (trealose e glicogênio) para a formação de álcool, como fonte alternativa para obtenção de energia para sua sobrevivência.

Segundo Alcarde & Basso (1997) a trealose e o glicogênio já foram considerados apenas substâncias de reserva energética para a levedura, mas atualmente diversos autores sugerem que a trealose possua função de proteção para a célula de levedura quando esta se encontra em uma situação de estresse, como altas temperaturas, choque osmótico, efeitos tóxicos do etanol e desidratação; sendo assim, o glicogênio seria então o principal carboidrato de reserva em leveduras. Um ponto importante foi destacado por Lillie & Pringle (1980) quando observaram que um composto para ser considerado de reserva ele deve ser acumulado em condições nas quais as fontes externas de nutrientes sejam abundantes para serem utilizados em períodos desfavoráveis, fato este que não ocorre com a trealose, acumulada durante a fase lag da diauxia, quando o meio se encontra quase exaurido em glicose. Alcarde & Basso (1997) verificaram que o acúmulo de trealose estava relacionado a períodos de reduzida taxa de crescimento, sendo que Lillie & Pringle (1980), mostraram que aumentando-se a disponibilidade de nitrogênio no meio fermentativo, havia menor acúmulo de trealose. Stupiello & Horii (1981) citaram que em condição de limitação de nitrogênio, há também limitação do crescimento e conseqüentemente, pode-se ter uma significativa parte de glicose convertida em reserva como glicogênio.

Segundo Martin et al. (1986) o aspecto de proteção exercido pela trealose está relacionado com o fato de que as membranas podem, na presença de trealose, serem dessecadas, sem perder a sua integridade estrutural e funcional.

## 2.2.1 Glicogênio

O glicogênio proveniente de células animais ou de microrganismos, é composto de moléculas com múltiplas ramificações, de alto peso molecular, com numerosas cadeias compostas de D-glicose com ligações  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4). Estas cadeias contém, normalmente, uma média de 12 resíduos D-glicose, sendo que, individualmente, as cadeias variam consideravelmente de comprimento (Manners, 1971).

O modelo da molécula de glicogênio compõe-se de unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 - 4) e  $\alpha$  (1 - 6), sendo as cadeias de dois tipos, A e B. As cadeias do tipo A, se ligam à molécula por ligações  $\alpha$  (1 - 6), não sofrendo ramificações e sendo sempre exteriores. As cadeias do tipo B, ou cadeias principais, são constituídas por ligações  $\alpha$  (1 - 4) e ramificadas por cadeias do tipo A (Leão, 1972).

O glicogênio foi extraído pela primeira vez, em 1857, por Claude Bernard e estudado posteriormente por Meyer em 1943 (Leão, 1972).

De acordo com Trevelyan & Harrison (1956b), o método de extração de carboidratos de células de leveduras, pelo processo de fracionamento, forma distintamente uma fração de glicogênio alcali e outra ácida solúvel. Berck & Rothstein (1957), afirmam que as duas formas de glicogênio (solúvel e insolúvel) são quimicamente idênticas sendo, deste modo, a fração ácida solúvel apenas uma etapa da extração alcalina, desaparecendo no momento que se utiliza alcali forte para a extração.

### 2.2.1.1 Acúmulo de glicogênio em leveduras

Para que a biossíntese de glicogênio possa ocorrer, necessita-se de duas enzimas distintas, sendo uma responsável pela formação de ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4) e outra pela formação de ligações  $\alpha$  (1-6). De uma forma resumida, a biossíntese de glicogênio acontece da seguinte maneira:

fosforilação da glicose pela hexoquinase; conversão da glicose - 6 - fosfato em glicose - 1 - fosfato; formação da uridil - difosfato - glicose pela pirofosforilase; ação combinada da glicogênio sintase e enzima ramificadora (Ferreira, 1998)

Segundo Quain et al. (1981), *Saccharomyces cerevisiae* quando submetidas a uma fermentação alcoólica (com adição de ar saturado), apresentam-se, da seguinte maneira, em relação às duas formas de glicogênio: o glicogênio solúvel básico não sofre significativas mudanças ficando em torno de 5 % do peso seco da levedura; o glicogênio ácido solúvel apresenta-se em três diferentes fases durante a fermentação, que são: a) nas duas horas iniciais, antecedendo o crescimento, a concentração cai de 40 % para 6 % do peso seco da levedura; b) na fase de crescimento da levedura ocorre um acúmulo deste polissacarídeo, chegando a teores comparáveis ao inicial; c) quando as leveduras param de crescer, o glicogênio vai diminuindo, lentamente.

### **2.2.1.2 Mobilização de glicogênio em leveduras**

Segundo Ferreira (1998), em células animais, a degradação do glicogênio é controlada pelo AMP<sub>c</sub> (adenosina - 5 - monofosfato cíclico) e realizada pela enzima fosforilase, sabendo-se que esta existe em duas formas interconversíveis: a forma fosforilada ativa (fosforilase a) e a forma desfosforilada inativa (fosforilase b), sendo que a remoção do grupo fosfato da fosforilase a é realizada pela ação de uma fosforilase, resultando fosforilase b, sendo esta refosforilada por uma fosforilase quinase, a qual é ativada pelo AMP<sub>c</sub>. Mas, em leveduras, a situação é diferente, pois segundo Sagartia et al. (1971) citados por Gomes (1988), a enzima fosforilase não é AMP<sub>c</sub> sensível, não ocorrendo em duas formas (a e b), sendo inibida competitivamente “in vitro” pela G-6-P, UDP glicose e glicose. No entanto, estes metabólicos não regulam a atividade da fosforilase “in vivo”, deste modo sugeriu-se que a não atuação dos inibidores competitivos “in vivo”, deve-se ao fato da fosforilase estar ligada,

de maneira saturada, às partículas de glicogênio, sendo a concentração de grupos terminais na molécula, muito elevada.

Segundo Quain et al. (1981), no momento inicial da fermentação, com oxigênio presente no meio fermentativo (até 2h) o açúcar não foi consumido pela levedura; neste momento ocorre um aumento substancial da síntese de lipídeos, assim os autores concluíram que o glicogênio foi a única fonte de energia metabólica para as leveduras.

### **2.2.2 Trealose**

Segundo Wiemken (1990) a trealose (1- $\alpha$ -D-glucopiranosil -  $\alpha$ -D-glucopiranosídeo), cuja designação é oriunda de um confeito denominado “trehala manna” produzido da pupa de um besouro que vivia no deserto, é um dissacarídeo não redutor.

Em Matiazi (1995) encontramos citação sobre a trealose de que teria sido primeiramente isolada da ferrugem do centeio por Wiggers, em 1832. A trealose foi extraída de células de levedura por Koch & Koch, em 1925 (Manners, 1971 e Matiazi, 1995).

A trealose é encontrada em diversos organismos na natureza, tendo sido isolada nos fungos, tanto no esporo destes como nas formas vegetativas. É um importante carboidrato de reserva nos ovos, larvas e pupas de insetos, tendo também nos fungos outra função, ou seja, carboidrato de proteção contra agentes estressantes (Gutierrez, 1997).

Atualmente, em relação à função da trealose, é mais aceito que ela exerça um papel de proteção às células quando as mesmas se encontram em período de estresse, descartando-se assim a hipótese de que ela exerça a função de carboidrato de reserva (Matiazi, 1995).

### 2.2.2.1 Acúmulo de trealose em leveduras

O mecanismo de biossíntese de trealose em levedura de cervejaria, envolve a transferência do resíduo de D-glicose do nucleotídeo UDP - glicose para glicose - 6 - P, através da ação da enzima trealose- 6-fosfato sintase, formando trealose-6-fosfato e uridina fosfato, sendo que a remoção do grupo fosfato da trealose-6-P para liberação de trealose, é realizada por fosfatase específica (trealose-6-P fosfatase) (Cabib & Leloir, 1958).

Segundo Leão (1972), as leveduras em condições não proliferantes, apresentaram síntese de trealose, utilizando glicose como fonte externa de carbono.

Suomalainen & Pfaffli (1961) demonstraram que em leveduras, a síntese de trealose é favorecida por condições aeróbias, em relação a anaeróbias. No entanto, Alcarde & Basso (1997) conseguiram, em anaerobiose, através de uma solução tampão de citrato de potássio 2 M, pH = 4, acrescida de 2 % de glicose, com tratamento de 45°C por 2 h, obter um acúmulo de trealose de 0,85 para 6,33 mg por 100 mg de matéria seca, em cepas TA (M-300-A) de *Saccharomyces cerevisiae*; o mesmo ocorreu com Gutierrez (1990) que através de uma fermentação alcoólica em meio anaeróbio, obteve resultados de até 14,97 g de glicose por 100 g de matéria seca.

Num processo fermentativo e logo após a inoculação, as leveduras apresentaram mobilização parcial da trealose acompanhada de aumento da taxa de fermentação, sendo que a menor quantidade de trealose coincidiu com a máxima taxa de fermentação. Posteriormente à mobilização, ocorreu um período de ressíntese, o qual foi interrompido pela exaustão do substrato fermentável, e um comportamento estável da trealose após este processo. Quando as leveduras foram inoculadas em diversos meios fermentativos com a presença de glicose, houve no início, aumento da taxa de fermentação e mobilização da trealose na levedura, sendo posteriormente observado onde se omitiu o nitrogênio, apreciável ressíntese de trealose em relação aos outros;

isto se deve a inibição da ressíntese deste carboidrato, em presença de nitrogênio assimilável (Trevelyan & Harrison, 1956a).

Segundo Thevelein (1984), as células de leveduras quando se encontram em fase de crescimento exponencial em glicose, contém baixas concentrações de trealose.

As leveduras expostas a uma fermentação prévia, em meio com glicose e ausência de nitrogênio, sofreram mobilização da trealose, com posterior ressíntese (decrécimo parcial da reserva de aminoácido), alcançando aos 80 minutos de fermentação teores semelhantes ao inicial, e neste momento, as leveduras ao serem expostas a um meio fermentativo, sem adição de nitrogênio, não apresentaram a fase de mobilização, ocorrendo aumento do teor de trealose. Este fato também aconteceu quando as leveduras, ao invés de realizar uma fermentação prévia sem nitrogênio, foram inoculadas em um meio completo, e aos 60 minutos, as reservas de nitrogênio foram mantidas, mas ao serem colocadas em meio com ausência de nitrogênio, ocorreu aumento do teor de trealose, porém inferior ao obtido no primeiro nas duas horas iniciais de fermentação (Trevelyan & Harrison, 1956a).

Durante a fermentação, utilizando levedura de panificação, ocorreram pequenas variações em carboidrato solúvel em ácido tricloroacético, do qual, o principal constituinte é a trealose. O fator considerado responsável por este metabolismo, foi a baixa concentração de glicose presente no meio, cerca de 5mM, a qual teria restringido a síntese de trealose (Trevelyan et al., 1952).

Segundo Gutierrez (1990), as leveduras de panificação *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* IZ 1904, apresentaram aumento no acúmulo de trealose com maiores concentrações de sacarose no meio. Enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A teve uma redução de trealose quando o meio variou de 8 para 11 % de sacarose e um aumento quando exposta a 11 para 16 % de sacarose.

Mas Alcarde & Basso (1997) verificaram que o acúmulo de trealose ocorreu devido ao estímulo de um agente estressante, dependendo do tempo

de exposição, sendo este fato demonstrado por vários autores que conseguiram, em tratamento térmico, com aumento de temperatura de 23-30° para 36-45°C, proporcionar o estímulo ao acúmulo de trealose endógena em leveduras.

Hottiger et al. (1987) observaram que *Saccharomyces cerevisiae* quando submetida a elevação de temperatura de 27°C para 40°C, promovia maior acúmulo de trealose mas ao se retornar à temperatura inicial, ocorria uma diminuição do nível de trealose na mesma.

Gutierrez (1990), verificou alterações nos teores de trealose, quando as leveduras foram submetidas a diferentes valores de pH, como aconteceu com a levedura *Saccharomyces* M-300-A e de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*), que em fermentações com pH 4,5, mostrou maiores teores de trealose do que em fermentações conduzidas a pH 3,0, tendo ocorrido o inverso com a levedura *Saccharomyces uvarum* IZ-1904.

#### **2.2.2.2 Mobilização de trealose em leveduras**

Em *Saccharomyces cerevisiae* a enzima responsável pela degradação da trealose é a trealase. Esta enzima, afirmaram Keller et al. (1982), está localizada em vacúolos enquanto a trealose, no citosol. Ferreira (1998) destacou que em *Saccharomyces cerevisiae*, é conhecida apenas uma enzima capaz de hidrolisar a ligação glicosídica da molécula de trealose, a trealase ( $\alpha$ . $\alpha$ . trealose-1-D-glicoidrolase)

Segundo Soumalainen & Pfaffli (1961), a maior viabilidade celular e a atividade da levedura eram decorrentes de elevado teor de trealose; deste modo, a função do mesmo seria de proteção as células contra a autólise.

Após fermentação da glicose por 80 minutos, em meio com ausência de nitrogênio, as leveduras ressintetizaram, aproximadamente, o total de trealose perdida no período de mobilização inicial, no entanto, no momento em

que foi adicionado cloreto de amônio (nitrogênio assimilável), este ocasionou declínio do teor de trealose (Trevelyan & Harrison, 1956a).

### **2.3 Viabilidade celular em leveduras**

Alguns fatores podem modificar o desenvolvimento da fermentação alcoólica, como a temperatura que afeta a velocidade de crescimento e fermentação, sendo os controles para estes efeitos dependentes de fatores nutricionais e genéticos (Laluce, 1991). Gutierrez (1991) observou que a levedura Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) multiplicada em condições anaeróbias, com adição de ergosterol e ácidos graxos insaturados, apresenta em fermentação à temperatura de 30°C, viabilidade celular maior que à temperatura de 35°C, e que tal fato ocorreu com os teores de 32; 48; 60 e 120 ppm de ácido linoléico e 5 ppm de ergosterol, e também foi constatado aumento na viabilidade celular com doses crescentes de ácido linoléico, em ambas as temperaturas.

Marques (1997) em ensaios enfocando concentração celular (Tabela 6) e viabilidade celular (Tabela 7) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* utilizando mosto com 310 g de ART/L em 8 fermentações consecutivas, com inóculo separado em 2 tratamentos, um convencional, tratado com vinho e um denominado beneficiado, tratado com água, encontrou resultados, mais positivos, para o inóculo beneficiado em relação ao convencional, em ambos os experimentos, mas foi verificada uma queda acentuada de viabilidade celular nos dois inóculos, não explicada pelo autor.



Tabela 6. Resultados de concentração celular (g/L), em ensaios com mosto de 310 g ART/L, com 3 repetições.

Ordem da Fermentação	Concentração celular (g/L)	
	Inóculo convencional	Inóculo beneficiado
1º	39,73 <sup>A a</sup>	39,73 <sup>A ab</sup>
2º	29,79 <sup>B c</sup>	34,77 <sup>A cd</sup>
3º	22,44 <sup>B d</sup>	33,29 <sup>A d</sup>
4º	20,22 <sup>B d</sup>	36,76 <sup>A bcd</sup>
5º	27,09 <sup>B c</sup>	37,90 <sup>A bc</sup>
6º	35,20 <sup>A b</sup>	38,64 <sup>A abc</sup>
7º	37,78 <sup>A ab</sup>	40,64 <sup>A ab</sup>
8º	35,61 <sup>B ab</sup>	42,47 <sup>A a</sup>
Médias	30,98 <sup>B</sup>	38,02 <sup>A</sup>

Fonte: Marques (1997)

Letras maiúsculas diferentes na linha e letras minúsculas diferenças na coluna a 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan.

*Saccharomyces uvarum* IZ 1904, foi submetida a 6 ciclos fermentativos, utilizando-se meio de HTM (High Test Molasses) com adição de 3 g/L de óleo de soja. Foi constatado em meio com adição do óleo, um nível mais elevado do teor de glicogênio na levedura, um comportamento mais equilibrado entre o acúmulo e a mobilização de trealose durante os ciclos e uma amplitude de variação na concentração dos carboidratos de reserva mais homogênea, durante a acumulação e mobilização. Levando-se em consideração este comportamento relacionado às reservas, pode-se concluir que esta seja a causa da maior viabilidade celular mantida por células cultivadas na presença de óleo de soja (Duarte et al., 1997).

De acordo com Ball & Atkinson (1975), a perda de viabilidade de células, em condições aeróbias, está diretamente relacionada com o consumo de reservas por estas células.

Tabela 7. Viabilidade celular (%), nos ensaios com mosto de 310 g ART/L, com 3 repetições.

Ordem da Fermentação	Viabilidade celular (%)	
	Inóculo convencional	Inóculo beneficiado
1º	91,17 <sup>A a</sup>	91,17 <sup>A a</sup>
2º	19,29 <sup>B c</sup>	58,65 <sup>A b</sup>
3º	26,59 <sup>A c</sup>	30,35 <sup>A d</sup>
4º	29,70 <sup>B c</sup>	54,75 <sup>A b</sup>
5º	27,75 <sup>A c</sup>	35,73 <sup>A d</sup>
6º	26,18 <sup>B c</sup>	50,50 <sup>A bc</sup>
7º	46,60 <sup>A b</sup>	38,47 <sup>A cd</sup>
8º	22,32 <sup>B c</sup>	57,61 <sup>A b</sup>
Médias	36,20 <sup>B</sup>	52,15 <sup>A</sup>

Fonte: Marques (1997)

Letra maiúsculas diferenças na linha e letras minúsculas diferenças na coluna à 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan.

Amorim & Gomes (1988) descreveram os tratamentos adotados para se fazer a conservação das leveduras, durante uma interrupção no processo fermentativo, às temperaturas de 25, 30 e 40°C e em condições de pH de 2; 2,5 e 3. Os resultados levaram os autores a concluir que houve pouca influência na viabilidade e na capacidade fermentativa, até um período de 6 h de tratamento.

Segundo Wilson & Mcleod (1976), a diminuição da viabilidade das leveduras quando estas se encontram em jejum, não é devida à deficiência de reservas endógenas mas sim é ocasionada pelas alterações das funções das membranas, pela deficiência de esteróides e ácidos graxos insaturados, uma vez que, na constituição das membranas celulares, estão presentes componentes como as proteínas e fosfolipídios; podem ser os ácidos graxos responsáveis pela formação dos fosfolipídios, saturados e insaturados.

## 2.4 Óleo vegetal em leveduras

Segundo Gutierrez & Silva (1993), o álcool no Brasil, é produzido basicamente a partir do caldo e melaço de cana de açúcar, os quais são ricos em ácido linoléico, sendo este o principal ácido graxo encontrado no melaço de cana-de-açúcar, nos teores de aproximadamente 42 % do total de ácidos graxos.

Brown & Rose (1969), afirmaram que a composição dos ácidos graxos dos microrganismos varia com a espécie do microrganismo, idade da cultura, temperatura e composição do meio de cultura.

O teor de lipídios totais das leveduras varia, largamente, com as espécies, sendo que em geral é possível reconhecer dois grupos: o primeiro grupo que enquadra a maioria das leveduras, e apresenta entre 7 e 15 % do peso seco; e o segundo grupo, às vezes chamado de “fat yeasts”, que contém de 30 %, até acima de 60 % do peso seco (Hunter & Rose, 1971 e Halász & Lásztity, 1991). A composição de ácidos graxos é caracterizada pela presença de um alto teor de ácidos graxos insaturados, sendo o fluxo de oxigênio durante a etapa de cultivo das células, o parâmetro que mais influencia a composição de ácidos graxos (Halász & Lásztity, 1991).

Andreasen & Stier (1953) citado por Gutierrez (1991) destacaram que as leveduras *Saccharomyces* exigem para sua multiplicação, em meio anaeróbio, da presença de ácidos graxos insaturados e ergosterol. Bloomfield & Bloch (1960), afirmaram que a dessaturação de ácidos graxos necessita da presença de oxigênio molecular, este não podendo ser substituído por outros aceptores de elétrons. Gutierrez (1991), em sua pesquisa com adição de ergosterol e ácidos graxos insaturados, em meio anaeróbico, obteve formação de ácidos graxos insaturados como palmitoleico e oleico, isto devido provavelmente a diminutas quantidades de oxigênio dissolvido no meio. Leveduras utilizadas para produção de álcool em destilarias, não são capazes de produzir ácidos graxos poliinsaturados como linoleico e linolênico, mas

produzem ácidos oleico e palmitoleico (Bendová et al., 1991). Resende & Alterthum (1986) relataram que as leveduras foram capazes de absorver os ácidos graxos que se encontravam no meio fermentativo.

De acordo com Alterthum & Cruz (1987), em escala industrial, na fermentação alcoólica, o oxigênio dissolvido no meio é consumido em pouco tempo, sendo que em sua ausência, a levedura se torna incapaz de sintetizar ácidos graxos insaturados e esteróis essenciais, necessários para a manutenção da membrana citoplasmática, em boas condições fisiológicas.

Segundo Gutierrez & Silva (1993), as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A e *Saccharomyces uvarum* IZ -1904 quando submetidas à multiplicação, em meio fermentativo de melaço, foram capazes de incorporar ácidos graxos, sendo encontrado, nestas leveduras, predominância de ácido linoléico e palmítico.

Carvalho et al. (1980), constataram que *Saccharomyces cerevisiae*, quando submetidas a cultivo, em anaerobiose, com fornecimento de esterol e ácidos graxos insaturados (esterol: ergosterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e colesterol; ácidos graxos: oleico, linoleico e linolênico), conseguiram incorporá-los às membranas citoplasmáticas.

Durante a fermentação alcoólica, mínimas quantidades de oxigênio ou uma adequada quantidade de ácidos graxos insaturados no meio fermentativo podem restaurar a atividade celular das leveduras e a produtividade em etanol (Hayashida et al., 1974). Por outro lado, Duarte et al. (1997), verificaram que na ausência de oxigênio - uma condição que é provocada pela fermentação - as células são incapazes de crescer, pois elas não sintetizam ácidos graxos insaturados e esterol.

Ainda, em Gutierrez et al. (1990), as leveduras quando cultivadas em meio aeróbio, apresentaram grandes quantidade dos ácidos graxos insaturados palmitoleico e oleico, não tendo sido detectado ácido linoleico, havendo menor formação de ácidos graxos de cadeia curta; já em meio anaeróbio, houve principalmente a formação de ácido palmítico acompanhado de grandes

quantidades de ácidos graxos de cadeia curta. No caso de meio anaeróbio, com adição de ácidos graxos saturados e insaturados, a levedura teve a capacidade de absorvê-los e incorporá-los.

Segundo Quain (1988), em células de leveduras, baixos níveis de glicogênio limitam o potencial para nova síntese de lipídios; a deficiência de glicogênio, fez com que houvesse problemas relacionados à viabilidade celular durante o processo fermentativo, fato diretamente relacionado à insuficiência na síntese de lipídios. A dimensão e natureza da saturação das cadeias foi uma resposta altamente dependente das condições prévias de cultura do microrganismo considerado. E, em Alterthum & Cruz (1987) encontramos que em temperaturas elevadas, ocorre a formação de cadeias carbônicas saturadas e longas, enquanto que em temperaturas baixas, há a formação de componentes com maior grau de insaturação e menor comprimento das cadeias. Na levedura cultivada a temperatura de 30°C, os principais ácidos graxos insaturados são o palmitoleico e oleico, sendo que os saturados são palmítico e esteárico.

Fonseca & Gutierrez (1974) destacaram que o óleo de soja é rico em ácido linoleico e Alterthum & Cruz (1987), relataram um aumento do rendimento da fermentação alcóolica com a adição do mesmo.

De acordo com Duarte et al. (1997), foram encontrados altos valores médios de viabilidade celular nas leveduras expostas à fermentação com 3 g/L de óleo de soja, em relação às leveduras em condições fermentativas, sem adição do mesmo; assim no primeiro caso, encontraram um valor de viabilidade celular de 77 % ao final do sexto ciclo fermentativo, contra uma viabilidade de 65 % do segundo.

Os ácidos graxos estão diretamente relacionados à composição das membranas celulares das leveduras, sendo que Quastel (1967) aponta que a proporção de um saturado para dois insaturados seria considerado ideal, para produzir uma necessária porosidade, fluidez e estabilidade das membranas.

Thomas & Rose (1979), observaram que as membranas de células ricas em ácidos graxos saturados, mostraram-se menos permeáveis ao etanol, deste modo, conclui-se que células ricas em insaturações liberam mais etanol ao meio.

## **2.5 Condições não favoráveis à proliferação**

Os métodos de preservação tem como finalidade manter a viabilidade e a estabilidade dos organismos e para alcançar esta condição, por um longo período, necessita-se de uma paralisação ou o retardamento do metabolismo celular. Para conseguir atingir estas condições, tem-se utilizado de diversos processos que se constituem nos métodos de conservação, dentre os quais se destacam: subcultivo ou repiques sucessivos, secagem ou desidratação, congelamento e liofilização (Alcarde & Basso, 1997).

Suomalainen & Pfaffli (1961) verificaram, que leveduras de panificação, durante período de armazenamento, mantiveram sua viabilidade celular, devido a trealose.

Segundo Alcarde & Basso (1997), o acúmulo da trealose endógena pelas leveduras proporcionou uma maior taxa de manutenção da viabilidade celular, após o processo de desidratação por liofilização, em comparação com as leveduras que não passaram pelo processo de acúmulo de trealose.

Trevelyan & Harrison (1956a), destacaram que a levedura em meio com ausência de substratos fermentáveis, apresentava estabilidade do conteúdo de trealose.

Quando uma suspensão de leveduras é exposta a uma condição de repouso em água ácida, há uma grande dificuldade para se estabelecer uma correlação entre a diminuição de viabilidade e as quantidades de carboidratos de reserva; isto se deve, possivelmente, ao fato que os tratamentos efetuados afetaram muito pouco o fermento, podendo ser devido ao curto tempo de tratamento (6 h). Mas, verifica-se que ocorreu uma discreta queda nos teores

de trealose, em temperaturas de 25 e 40°C, principalmente em pH mais baixos, e que os teores de glicogênio permaneceram inalterados, enquanto a 30°C observou-se, após 6 h de tratamento, valores praticamente iguais de trealose. Com tempos de tratamento mais prolongados, foi demonstrado a ocorrência de quedas significativas nos teores de trealose (Amorim & Gomes, 1988).

*Saccharomyces cerevisiae* quando mantida na ausência de substrato, estaticamente, em pH entre 4,5 - 5,5 e à temperaturas de 32°C, 36°C e 42°C, numa concentração de 50 % e 20 % p/v de células por um período de 72 h, apresentou (a 50 % p/v de levedura), em 8 h de fermentação endógena, teores de 43,6 % e 43 % respectivamente de proteína nas temperaturas de 36°C e 42°C; e que após 72 h, a temperatura de 32°C o teor protéico foi superior (44,1 %) a qualquer tempo e temperatura e inferior (37,8 %) a 42°C. Isto está relacionado a autólise nas temperaturas mais elevadas em maior tempo, indicado pela elevação de proteína solúvel na suspensão de levedura, 1,26 % a 36°C, 1,61 % a 42°C e 0,78 % a 32°C. O teor de etanol (no meio) foi relacionado com o alto teor protéico, 0,1 % a 32°C, 0,08 % a 36°C e 0,06 % a 42°C. A biomassa seca permaneceu constante em 11 % a 32°C pelo período de 72 h, enquanto que em temperaturas mais elevadas ocorreu um decréscimo deste valor, sendo este fato correlacionado com a diferença de viabilidade celular, 32°C (48,5 %), 36°C (3,3 %) e 42°C (10,1 %); na suspensão 20 % p/v foi encontrado um menor teor protéico a 42 % a 36°C e 42°C em 8 h de fermentação e 42,9 % a 32°C com 72 h (Nogueira & Oliva Neto, 2000)

Nos processos de desidratação-hidratação e congelamento-descongelamento, tem-se modelos que explicam o efeito de proteção da trealose na membrana da célula de levedura. O modelo que merece destaque é o de Crowe et al. (1984), que aponta uma interação entre trealose e grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana. Neste caso, a água ligada aos terminais polares dos fosfolipídios em condições favoráveis, seria substituída pela trealose, em uma situação de estresse. Com esta substituição

seria evitada as separações laterais dos componentes das membranas, pois não haveria assim alterações do espaçamento entre os fosfolípidios. Devido à substituição das moléculas de água pela de trealose, não teríamos a passagem de fase fluída para fase gel da membrana e desta forma, se manteria a integridade e a fluidez da membrana, conseqüentemente, a viabilidade celular.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nesta pesquisa, foi uma linhagem de levedura, espécie *Saccharomyces cerevisiae* Y904, cedida pela Mauri do Brasil - Pederneiras - SP.

#### 3.2 Meios de cultura

##### 3.2.1 Meios de manutenção e de reativação das células desidratadas

Para a realização do experimento, foi necessária a utilização de dois meios de cultura (Tabela 8 e 9), com a função de manutenção e reativação das células desidratadas.

Tabela 8. Meio de cultura YEPD ágar “Yeast extract peptone dextrose agar” para manutenção da linhagem e plaqueamento.

	Composição
Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar	15 g
H <sub>2</sub> O destilada	1.000 mL

Fonte: (Ribeiro, 1997)

Tabela 9. Meio de cultivo YEPD líquido “Yeast extract peptone dextrose” para reativação da linhagem comercial.

	Composição
Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Dextrose	20 g
H <sub>2</sub> O destilada	1.000 mL

Fonte: (Ribeiro, 1997)

Os meios foram esterilizados em autoclave a uma atmosfera de pressão, a 121°C durante 15 minutos.

### 3.2.2 Meio de cultivo para fermentação

As células desidratadas, foram reativadas no meio 3.2.1 e inoculadas em alíquotas de 10 mL para fermentação em meio YEPS por 24 h, para ocorrer o processo fermentativo.

Tabela 10. Meio de cultivo YEPS “Yeast extract peptone sucrose” para fermentação.

	Composição
Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Sacarose	100 g
H <sub>2</sub> O destilada	1.000 mL

Os meios de cultivo, passaram por um processo de esterilização idêntico ao do item 3.2.1.

### **3.3 Verificação da pureza da levedura comercial desidratada**

#### **3.3.1 Reativação da cultura desidratada para isolamento**

As leveduras foram isoladas a partir da linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* Y904, com o objetivo de se obter cultura pura.

Para se iniciar o processo de isolamento das leveduras, foi necessária sua reativação, a qual ocorreu em tubos de cultura esterilizados contendo 5 mL de meio de cultivo YEPD líquido esterilizado (alça de Henle, em número de 3), e incubados a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 h.

#### **3.3.2 Isolamento e purificação das culturas de leveduras**

Foram realizadas diluições em série a partir das culturas reativadas e estas foram conduzidas até  $10^{-6}$ , com água destilada esterilizada. O plaqueamento em meio de cultura YEPD ágar esterilizado, foi feito pela técnica de “spread plate” e incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 h.

As leveduras foram avaliadas quanto a morfologia, a fim de se verificar a taxa de possíveis contaminantes que apresentassem diferenciação ao menos de morfologia.

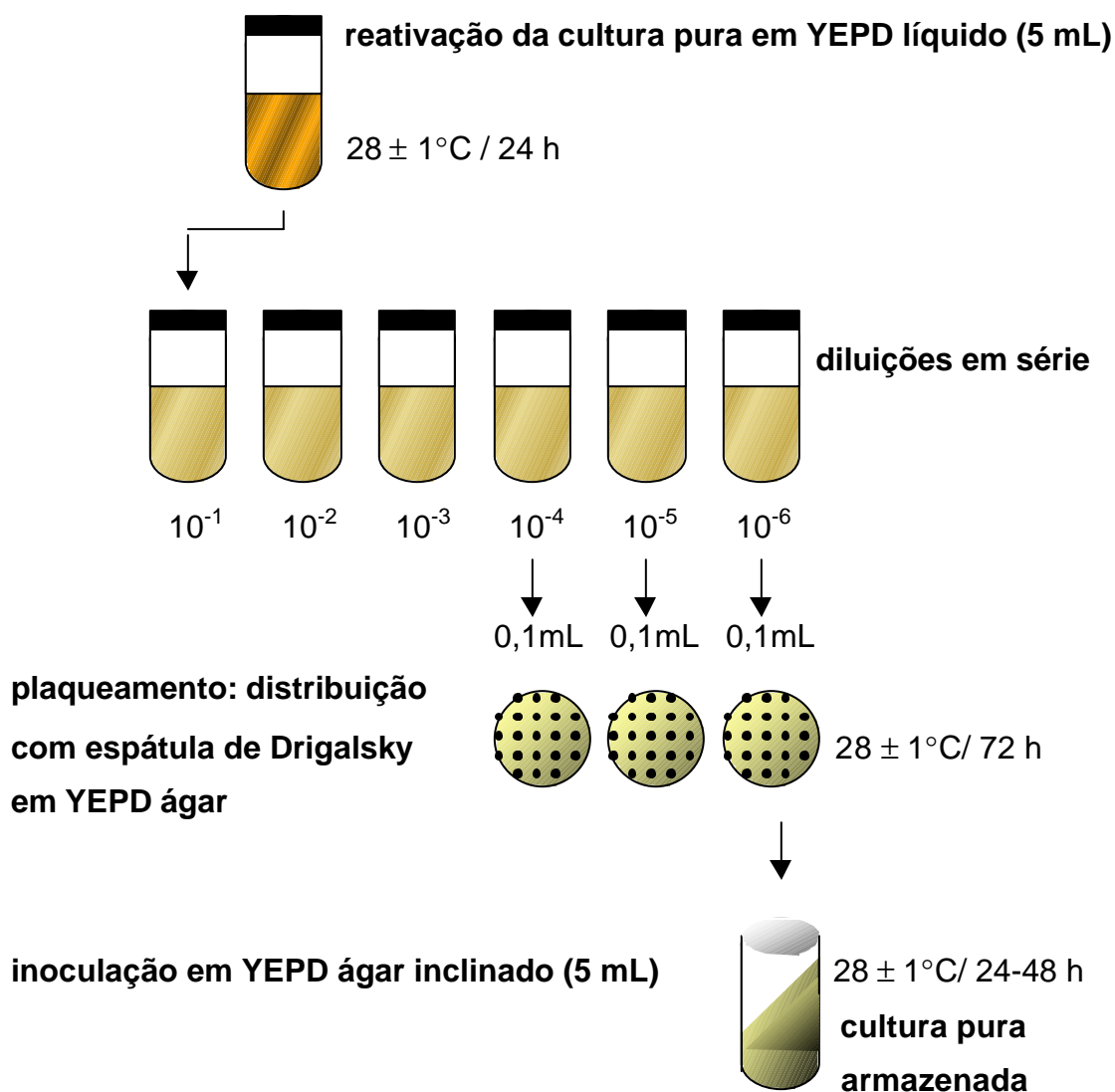


Figura 1 – Metodologia para isolamento e purificação de leveduras.

### 3.4 Fermentação e obtenção das leveduras para análise

A reativação e propagação de leveduras foi efetuada com inoculação de 25 g da levedura desidratada em 1000mL de meio YEPD líquido esterilizado, e incubado à temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. Após este período, foram retiradas amostras, para quantificação de unidades formadoras de colônias e viabilidade celular das leveduras, sendo a seguir retiradas alíquotas de 10 mL, para servir de inóculo para os frascos contendo o meio de fermentação.

Eram 54 frascos erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo cada um, 200 mL de meio de cultivo YEPS líquido esterilizado, sendo 27 frascos com adição de 3 g/L de óleo de soja comercial. Os frascos foram incubados em “shaker New Brunswick, modelo G53”, por 24 h a 90 rpm de agitação, em movimento circular, e temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para o processo fermentativo, foi estabelecido um período de 24 h, tempo este suficiente para total consumo do açúcar do meio.

A fermentação foi monitorada por pesagens periódicas dos frascos até obtenção de peso constante (Matiazi, 1995). Além disto, foram realizadas observações da sedimentação no meio fermentativo e acompanhamento do teor de glicose utilizando-se a glicofita.

Completada a fermentação, as células de leveduras, foram coletadas por centrifugação em centrífuga IEC – PR 6000 a 900 g por 5 min, sendo a seguir ressuspensas em KCl 0,154M esterilizado, contendo Kamoran (3 ppm) e recentrifugadas nas mesmas condições. O sobrenadante da centrifugação, foi armazenado para determinação do teor alcoólico.

#### **3.4.1 Monitoramento das alterações fisiológicas na suspensão celular**

As massas de levedura obtidas da fermentação em meio com e sem adição de óleo de soja e tratadas conforme descrito no item 3.4, foram agora acompanhadas por 8 dias submetidas a agitação em “shaker”, com rotação de 90 rpm e temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Dos 54 frascos foram tomadas amostras onde foram realizadas determinações de contagem de número de unidades formadoras de colônias, viabilidade celular, concentração celular em matéria seca, nitrogênio total na levedura e no meio, carboidrato total, glicogênio e trealose, a cada 24 h, por um período de 8 dias, tendo cada tratamento três repetições.

### **3.5 Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 5, com 3 repetições. O acompanhamento foi realizado até o 7º ou 8º dia, entretanto a análise estatística realizada até o 4º dia em função das alterações fisiológicas ocorridas a partir de então, com desorganização celular. Para o teor alcoólico, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com um critério.

### **3.6 Tratamentos**

Foi denominado tratamento T1, as células de leveduras que se originaram de uma fermentação prévia sem adição de óleo de soja; e T2, do mesmo modo porém com adição de óleo de soja no meio fermentativo, antes do período de jejum imposto no experimento.

### **3.7 Análises físico-químicas e microbiológicas**

#### **3.7.1 Viabilidade celular**

A determinação de viabilidade celular em células de leveduras, foi realizada através do método por coloração com azul de metileno. (Pierce, 1970).

#### **3.7.2 Teor alcoólico**

A determinação do teor alcoólico do vinho, foi realizada através da destilação da amostra em um microdestilador, e a leitura da massa específica obtida em um densímetro digital A.PAAR DMA - 45.

### **3.7.3 Concentração de leveduras**

A determinação da concentração de leveduras, foi realizada através dos métodos de determinação da concentração de leveduras por centrifugação (Koshimizu et al., 1982), com verificação através do método de determinação da concentração de leveduras por turbidimetria (Malette, 1969).

### **3.7.4 Nitrogênio total, na matéria seca**

10mL da suspensão de KCl 0,154M com leveduras, foi transferida para um tubo de centrífuga e submetido a uma temperatura de 20°C em banho por 5 min; após este tempo foi centrifugado a 275 g por 10 min, onde o sobrenadante foi separado para análise de nitrogênio e o sedimentado, foi lavado por sucessivas centrifugações e ressuspensões em água destilada e a seguir foi determinado o teor de nitrogênio na suspensão.

A determinação do nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl, conforme descrição em Silva (1990).

A expressão do teor de nitrogênio total em relação à matéria seca, foi expresso em porcentagem.

### **3.7.5 Carboidratos totais**

10mL da suspensão de leveduras em KCl 0,154M, foi transferida para um tubo de centrífuga e submetida a um banho a 20°C por 5 min; após este tempo foi centrifugado a 275 g por 10 min, onde o sedimentado, foi lavado com água destilada para posterior análise de carboidrato totais.

A determinação de carboidratos totais na suspensão de leveduras, foi realizada pelo método de antrona descrito em Bacila (1960).

### **3.7.6 Carboidratos de reserva**

#### **3.7.6.1 Teor de glicogênio**

O teor de glicogênio endógeno, foi analisado após extração com carbonato de sódio 0,25M a frio e determinado como glicose, após hidrólise (amiloglucosidase), empregando-se glicose oxidase, peroxidase e a leitura espectrofotométrica, em 525 nm (Leão et al.,1984).

#### **3.7.6.2 Teor de trealose**

O teor de trealose endógeno, foi analisado através da extração com ácido tricloroacético 0,5M (TCA) a frio, segundo Trevelyan & Harrison (1956a) e determinada pelo método de antrona com leitura espectrofotométrica a 620nm, segundo Brin (1966).

O teor de trealose em relação ao teor de carboidratos totais na levedura, foi expresso em porcentagem.

### **3.7.7 Levedura referência**

Uma alíquota contendo 8 g de leveduras desidratadas, recém amostradas do envólucro sob vácuo, foram reidratadas em 1000 mL de água destilada a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos a fim de servir como uma referência do fermento original, obtida em crescimento aeróbio com indução de acúmulo de trealose. Todas as determinações analíticas dos acompanhamentos das amostras não proliferantes foram também efetuadas com esta amostra.



## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foi utilizado como inóculo inicial, um lote de levedura desidratada, viva, de *Saccharomyces cerevisiae*, Y904, produzida e embalada a vácuo por Mauri do Brasil.

Embora as leveduras desidratadas e vivas devam ser inteiramente livres de bactérias do gênero *Salmonella* (Harrison, 1971), teste específico nesse sentido não foi efetuado, mas, apenas de verificação de contaminantes bacterianos e fúngicos em meio de cultura YEPD ágar a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 h.

O teste efetuado em técnica de “spread plate” revelou muita uniformidade no crescimento das colônias de levedura adequadamente diluídas e nenhum crescimento bacteriano ou fúngico no período acompanhado, demonstrando a qualidade do produto.

### **4.1 Fermentação**

As leveduras comerciais prensadas ou desidratadas, vivas, são obtidas através de fermentações aeróbias sequenciais até a separação final em centrífugas e filtros rotativos seguido de secagem ou prensagem antes do embalamento para armazenagem.

As leveduras são monitoradas quanto ao teor de trealose para manutenção de viabilidade celular pelo tempo pré-estabelecido de armazenamento.

Como o objetivo do presente experimento foi avaliar a capacidade de leveduras que saíram de um processo de fermentação alcoólica, portanto em

anaerobiose, manter-se vivo sob condições aeróbias e não proliferantes, submeteu-se então a levedura desidratada a uma reativação em meio YEPD a 2% por 24 h, seguida de uma fermentação em YEPS a 10 % por outras 24 h a cerca de 30°C. A concentração de açúcares adotada procurou evitar condições estressantes na fermentação e colocá-la em condições diferenciadas da fermentação de produção das leveduras comerciais.

Aproveitando a fermentação supracitada, em meio YEPS a 10 %, foi testada a adição de ácidos graxos, através de 2 tratamentos com 9 repetições, para avaliar sua influência na manutenção da viabilidade celular (Carvalho et al., 1980; Alterthum & Cruz, 1987 e Duarte et al., 1997) e monitoramento da viabilidade celular, teores de nitrogênio, carboidratos totais, trealose e glicogênio nas células coletadas após a fermentação e colocadas em estarvação em KCl 0,154M por 8 dias, sob agitação.

A fermentação, para reativação foi realizada em frasco erlenmeyer único com 1000 mL de meio YEPD a 2% por 24 h, em sala de fermentação, com temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Neste, foi determinado a viabilidade celular cujo dados estão mostrado na Tabela 11 e a contagem de UFC/mL realizada em meio YEPD ágar e técnica de “spread plate”, na Tabela 12.

Tabela 11. Viabilidade celular em leveduras para realização da fase de fermentação.

Amostras	Viabilidade celular (%)	
Inóculo inicial	94,40	92,70
	91,40	94,90
	89,70	91,80
Média	92,48	

Tabela 12. Contagem das unidades formadoras de colônias de leveduras após fase de reativação.

UFC/mL x 10 <sup>8</sup>			
3,20	-	5,90	2,50
5,50	4,74	4,00	2,66
5,00	2,98	3,50	1,42
10,20	3,94	3,60	3,38
13,60	3,71	3,00	3,27
13,60	3,13	4,80	1,25
6,20	2,68	5,40	2,65
5,60	3,05	3,30	2,47
6,70	2,91	3,10	2,46
Média	4,44 x10 <sup>8</sup>		

O inóculo inicial da fermentação, já avaliado pela viabilidade celular e pelas unidades formadoras de colônias, foi distribuído em alíquotas de 10 mL da suspensão, em 54 frascos contendo 200 mL de meio YEPS a 10% e agitados (90rpm) em shaker New Brunswick, modelo G53, sendo 27 frascos destinados ao tratamento T1 (sem óleo) e 27 frascos ao tratamento T2 (com óleo). O acompanhamento da fermentação foi efetuado por pesagens em 3 frascos de T1 e 3 frascos de T2, aleatoriamente e os resultados estão mostrados na Figura 2.

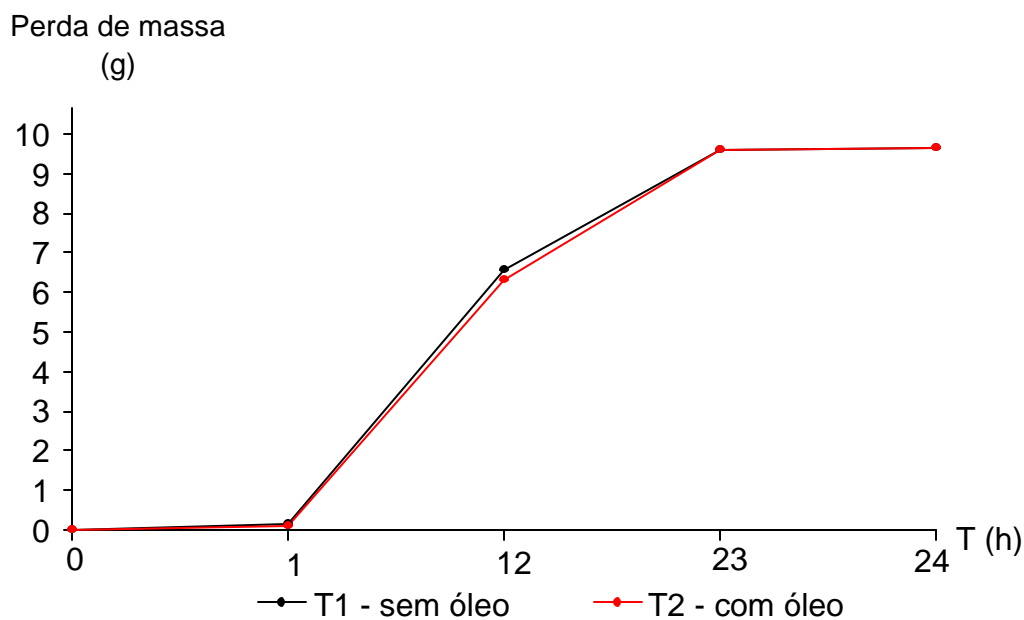


Figura 2 – Acompanhamento da fermentação pela diferença média de massa em pesagens sucessivas.

Aleatoriamente, uma em cada 3 frascos foi amostrado para determinação do teor alcoólico, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Teor alcoólico das amostras fermentadas em presença ou ausência de óleo de soja.

	Teor alcoólico (%v/v)					Média
	Repetições					
	1	2	3	4	5	
Tratamento 1	4,75	4,83	4,83	4,90	4,61	4,79 <sup>A</sup>
	4,97	4,68	4,75	4,83		
Tratamento 2	4,83	4,68	4,83	4,46	4,61	4,69 <sup>A</sup>
	4,75	4,68	4,75	4,61		

\* Quadro da análise de variância e teste de Tukey, estão apresentados no apêndice

A análise estatística mostra que não houve diferença entre os tratamentos quanto ao teor alcoólico no período ensaiado, porém como se trata de meio semi-sintético contendo extrato de levedura, é possível que não se espere qualquer diferença de rendimento como o encontrado por Alterthum & Cruz (1987) em meio de melaço e a partir do segundo reciclo ou por Duarte et al. (1997) em HTM com reciclos sucessivos.

## **4.2 Monitoramento das alterações fisiológicas na suspensão celular**

Os frascos que sofreram fermentação por 24 h no meio YEPS com e sem óleo de soja foram centrifugados, lavados e ressuspensos em KCl 0,154M contendo 3 ppm de Kamoran. Estes foram agora acompanhados quanto a viabilidade celular, contagem de colônias (UFC/mL), concentração celular, nitrogênio total no meio e no microrganismo, carboidratos totais na levedura, trealose e glicogênio na levedura durante 8 dias sendo todos os fatores analisados a cada dia.

### **4.2.1 Viabilidade celular**

A viabilidade celular de uma suspensão recém reidratada e um fermento cultivado em meio de fermentação por 24 h, apresentam-se com valores diferenciados e este fato pode ser constatado também no presente experimento, mostrado na Tabela 14 e Figura 3. Notar que, embora a reidratação tenha sido feita com água a temperatura ambiente, a viabilidade celular obtida foi da ordem de 80 %. Já a levedura suspensa em KCl 0,154M após 24 h de cultivo mostra viabilidade que se aproxima dos 100 %, ou seja, uma média de 97 %. Ainda, pelos dados da Figura 3 observa-se que ocorre uma queda na taxa de viabilidade ao longo dos dias, acentuando-se entre 24 e 48 h embora o meio, uma solução fisiológica, teoricamente não contenha metabólicos agressivos. É então possível que a viabilidade celular esteja ligada

à concentração de algum componente celular que esteja atingindo nível crítico e induza à perda da viabilidade. Suomalainen & Pfaffli (1961); Crowe et al. (1984) e Alcarde & Basso (1997), verificaram que a manutenção da viabilidade celular em levedura de panificação se mantinha elevada em função do alto teor de trealose e que este teria a função de proteger a célula contra a autólise. Logicamente, o contrário deve provocar aumento de perda de viabilidade celular e de rapidez na ocorrência de autólise, como se verifica na Figura 3, e já havia sido correlacionado com o consumo de carboidratos, em condições aeróbias, por Ball & Atkinson (1975) e ao contrário do encontrado por Duarte et al. (1997) quando relacionaram maior viabilidade celular à presença de óleo de soja e elevação de teor de glicogênio em consequência.

Tabela 14. Viabilidade celular, nitrogênio total, carboidratos totais, trealose e glicogênio em levedura reidratada em água.

Alíquota	Viabilidade Celular (%)	Nitrogênio Total (%)	Carboidratos Totais (g/L)	Trealose (mg/100mg)	Glicogênio (mg/100mg)
1	80,20	5,66	3,18	11,45	10,92
2	81,50	5,60	3,04	10,41	12,31
3	82,30	5,84	3,11	11,45	12,15
4	-	-	-	13,14	13,45
Média	81,33	5,70	3,11	11,61	12,21

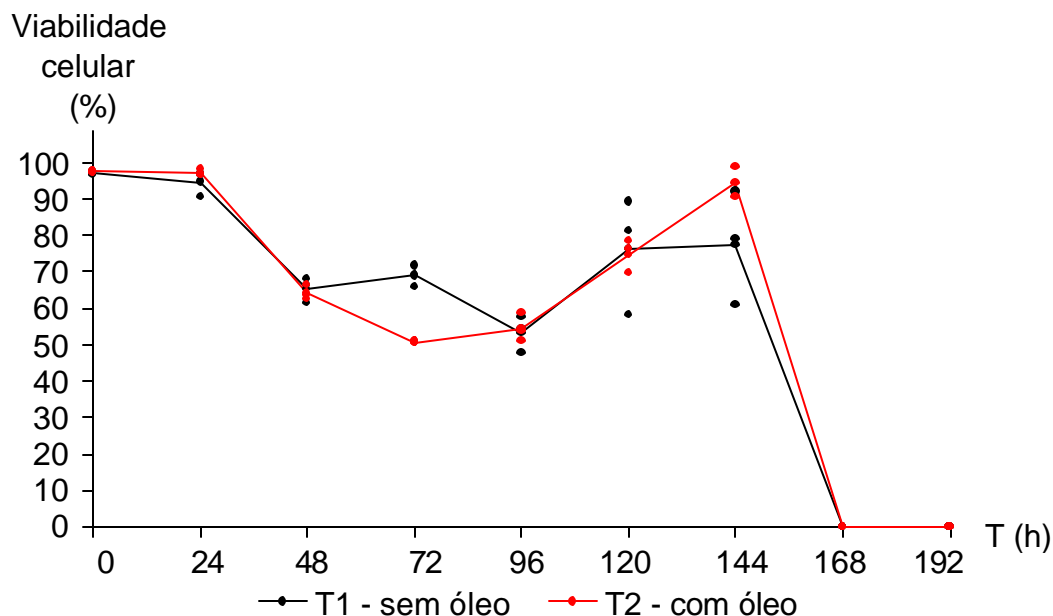


Figura 3 – Perfil da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em condições não proliferantes, sob agitação.

Acompanhando-se o perfil da viabilidade celular no experimento, verifica-se que do 4º dia (96 h) para o 5º dia (120 h) ocorreu um aumento da viabilidade celular, de cerca de 40 % em relação ao 4º dia (96 h), mostrando um fenômeno biológico diferenciado do observado até este momento. Ainda, só pelos dados de viabilidade celular, poder-se-ia inferir que células mortas poderiam estar autolisando-se e que pela velocidade de autólise estarem sobrando menos células, porém com maioria de viáveis, ou que a sobrevivência das células vivas, está aumentada pelo fornecimento de nutrientes provenientes das células lisadas (Reed & Pepler, 1973). Para confirmar esse raciocínio, as amostras dos dias 7 e 8 mostram que após o aumento da viabilidade, ocorre nas 24 h seguintes, um completo desaparecimento de células viáveis.

A análise estatística da variável viabilidade celular no presente experimento em delineamento fatorial, apresenta interação significativa, sendo que apenas no 4º tempo (3º dia) houve alguma dispersão de dados que podem

ter levado a interferir na interpretação estatística. Queríamos crer que biologicamente não tenha ocorrido tal fato que contrariaria Carvalhal, et al. 1980; Alterthum & Cruz, 1987 e Duarte et al. 1997.

Para melhor entendimento das alterações que ocorreram ao longo do período de 8 dias (192 h), não basta só o conhecimento da viabilidade celular, mas a relação entre a massa celular e a viabilidade. Observa-se pela Figura 4, que a concentração de massa celular decresce, a cada intervalo de um dia, porém que este decréscimo se acentua nos últimos 2 a 3 dias, e mais, que os resultados sofreram uma variação maior, provavelmente, com o aumento da autólise. Como a técnica de determinação da concentração da massa celular adotada foi a turbidimétrica, é possível que a partir de um certo ponto de autólise, a turvação do meio passe a interferir de tal modo que as leituras de turvação, antes interpretadas como massa celular real, passaram agora a representar massa celular fictícia, ao contrário dos fatos biológicos. Como alguns componentes celulares foram calculados em função da massa celular, os resultados de amostragens, acima de 96 h (4º dia), tendem a apresentar valores irrealis e com grande variação, provavelmente não fiel ao fenômeno biológico em estudo (Figura 4).



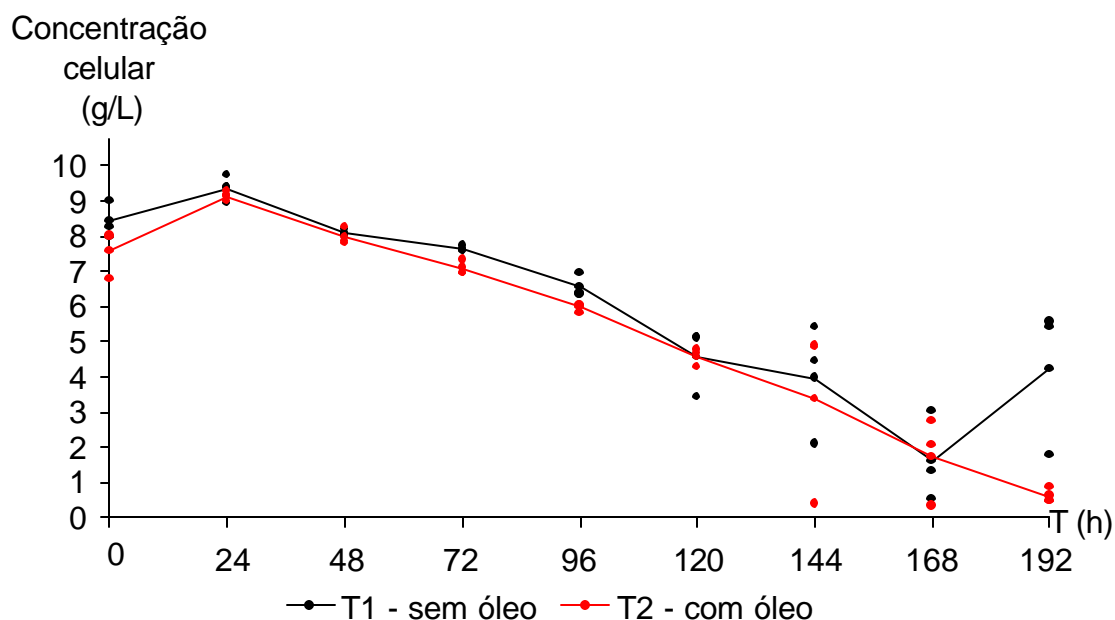


Figura 4 – Concentração celular de *Saccharomyces cerevisiae* em condições não proliferantes ao longo do período de 8 dias.

A análise estatística realizada com os dados até o 4º dia (96 h), revelam novamente que há diferença entre os tratamentos, sendo T1 superior a T2, resta interpretar se efetivamente há diferença para melhor meio, o meio controle sem óleo ou se algum outro componente possa ter influenciado. Em realidade houve maior formação de massa celular em T1 – controle sem óleo.

#### 4.2.2 Nitrogênio total

O teor de nitrogênio em leveduras é da ordem de 7,5 a 9 % segundo Harrison (1971). A levedura desidratada utilizada em nossos ensaios apresentou um teor de 5,7 % (Tabela 14) quando recém hidratada e um teor mais elevado, em torno de 6 a 7%, após ter sido submetido à fermentação (Figura 6). Talvez isso possa ser explicado em função das técnicas de produção de fermento onde a etapa final de fabricação é indução do acúmulo de

carboidratos de reserva como a trealose e o glicogênio que possam garantir um período de armazenamento mais longo. Assim, a diferença encontrada poderia ser apenas devido aos valores relativos de nitrogênio ou proteína, em função da presença de mais ou menos carboidratos na célula.

As concentrações de nitrogênio total na célula de levedura e no meio líquido de KCl 0,154M, mantidas por 8 dias, para acompanhamento das variações de comportamento de *S. cerevisiae* Y904 estão mostrada na Figura 5.

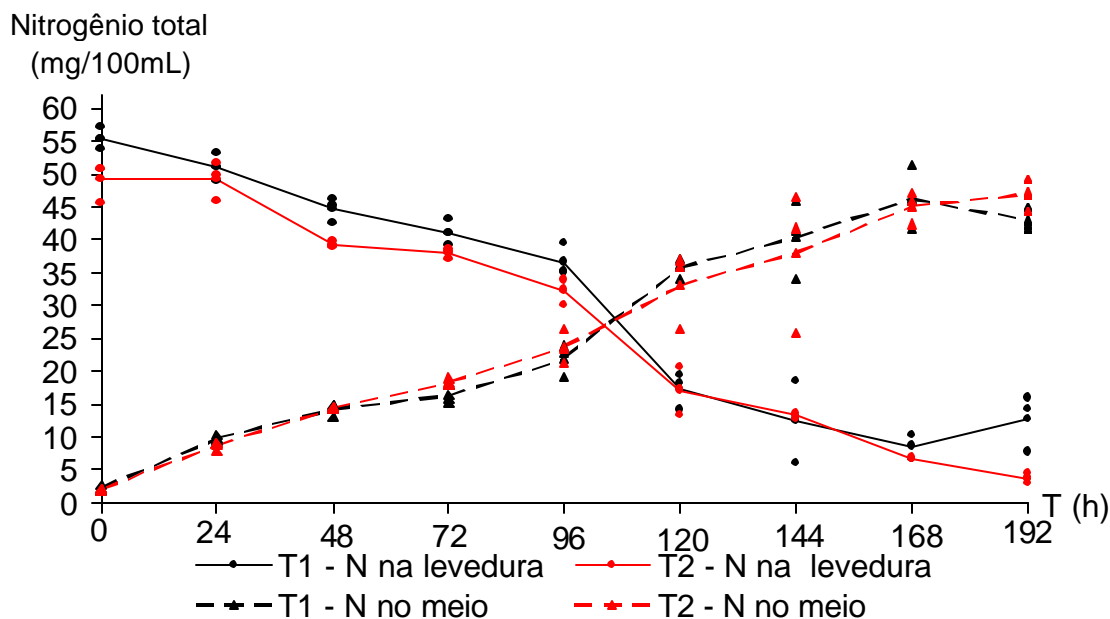


Figura 5 - Nitrogênio total na suspensão celular e no meio líquido.

O comportamento de N na célula e no meio líquido, confirma as observações já efetuadas para massa celular e para viabilidade (Tabelas 5 e 6 no apêndice).

Ao longo do tempo, há um decréscimo de N na suspensão de leveduras em função do decréscimo de células por autólise e este fato poderia estar sendo responsável pelo crescimento do teor de N no meio líquido exterior às células. Aliás, esse fenômeno já fora observado por Ferreira (1998) e Horii (1972), por ocasião do acréscimo do teor de N na suspensão utilizado como

inóculo, em função do tempo de armazenamento prévio aos ensaios de fermentação.

Observa-se ainda na Figura 6, que a tendência do teor de nitrogênio na massa seca é de pequena variação percentual até 4º dia (96 h), coerente com a pequena variação dos teores de carboidratos até esse mesmo período. Posteriormente, com massas celulares variando grandemente em função do método analítico, toda a variação de nitrogênio também perde significado.

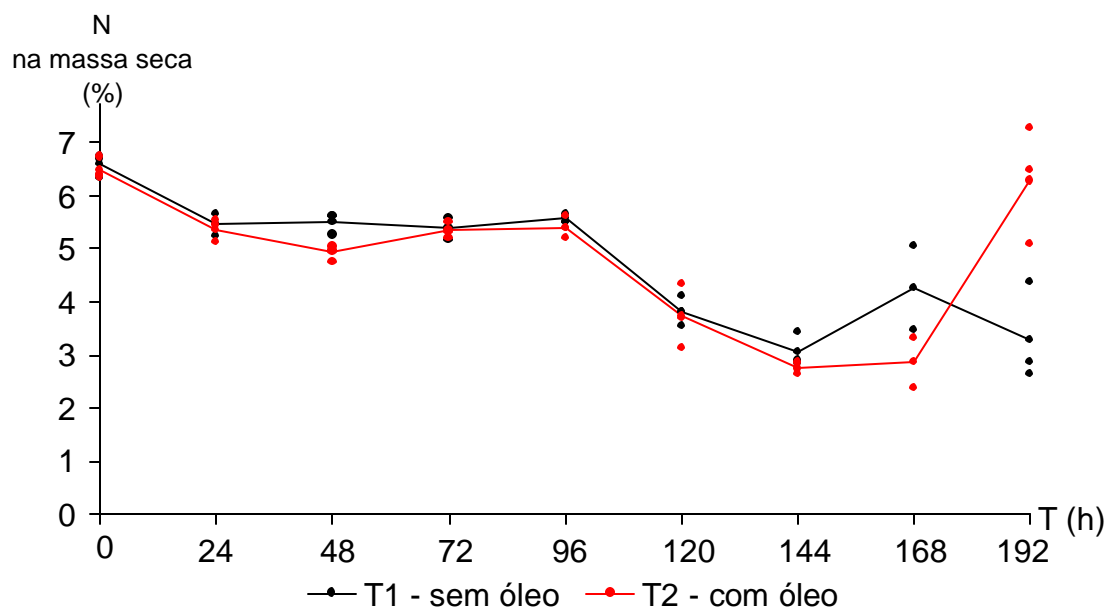


Figura 6 – Nitrogênio na massa seca de leveduras.

Por óbvio, a análise estatística dos dados segue fielmente àquela da massa celular e do carboidrato total, já que N é um componente da célula e para um mesmo teor, a massa de N acompanha a massa celular.

### 4.2.3 Carboidratos

Mais uma vez é importante notar que a análise do fermento desidratado mostrou uma característica química voltada para a manutenção da viabilidade e da qualidade por longos períodos (Tabela 14).

Os teores de carboidratos na suspensão de células estão mostrados na Figura 7.

Os teores apresentados na Figura 7 referem-se à concentração de carboidratos totais na suspensão celular, conforme o experimento e evidencia que até 96 h (4º dia) há uma relativa uniformidade e coerência; nas concentrações encontradas a partir de 120 h (5º dia), iniciam-se variações muito grandes que podem ser acúmulo ou consumo de substrato pelas células ainda vivas e uma relativa desordem fisiológica imposta pela concentração limite de algum componente.

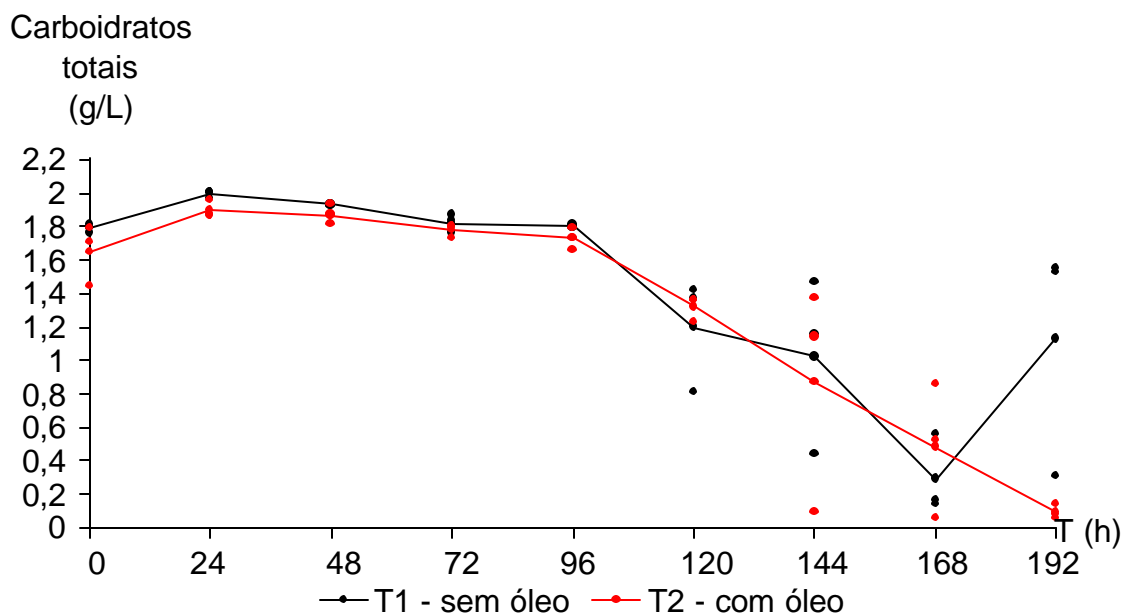


Figura 7 – Carboidratos totais obtidos na suspensão celular de leveduras, após coleta de células e lavagem.

Pela avaliação dos teores de trealose na matéria seca (Figura 8) pode-se inferir que durante a fermentação o acúmulo deste é muito baixo quando comparado à levedura desidratada (Tabela 14) obtida em crescimento aeróbio, de cerca de 30 vezes e que este valor pode ser crítico à sobrevivência deste microrganismo. Por outro lado, a determinação dos valores deste carboidrato nessas concentrações tão baixas pode ser imprecisa como parece mostrar as Figura 8 e 9. As variações são muito grandes e seria difícil aceitar acúmulo de trealose nos últimos períodos em função da disponibilidade de nutrientes produzida pela autólise de células mortas, embora Leão (1972) tenha observado que pode haver síntese de trealose, em leveduras mantidas, em condições não proliferantes, mas com glicose como fonte externa de carbono. É mais provável que nesses teores haja mesmo dificuldade de avaliação por técnica espectrofotométrica. Assim, o que poderia ser uma diferença estatística entre os tratamentos T1 e T2, certamente não pode ser levado em consideração devido aos teores muito próximos de zero, embora a análise da variância e o teste de Tukey mostrassem que os valores obtidos não representam diferenças entre os tratamentos. Foram significativos os tempos e a interação Tratamento x Tempo, todavia com um coeficiente de variação muito alto (37,16 %). É possível que a excessiva variação e dispersão dos dados analíticos da trealose tenham influenciado essa análise estatística.

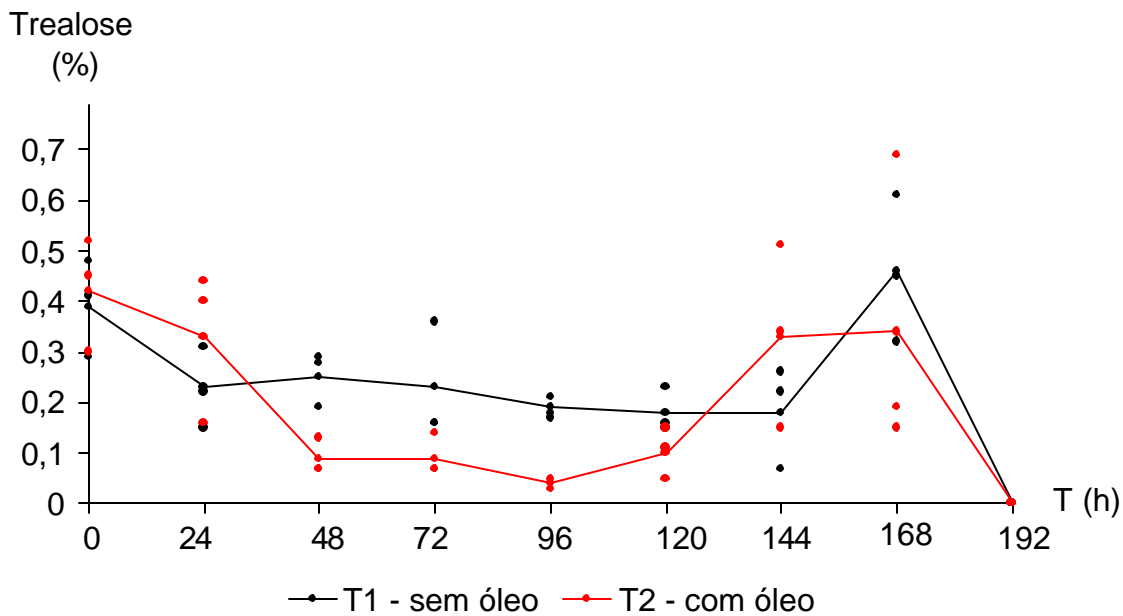


Figura 8 – Trealose em leveduras mantidas em condições não proliferantes ao longo de 192 h. Teores percentuais em relação à matéria seca.

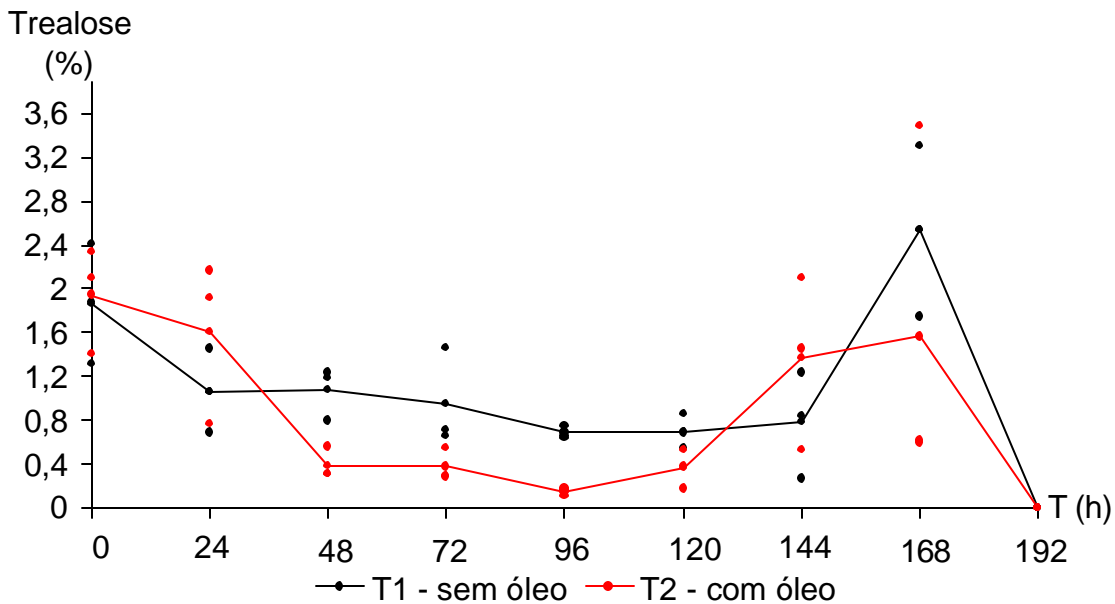


Figura 9 – Teores de trealose expressos em porcentagem dos carboidratos totais no decorrer de 192 h, em condições não proliferantes de *S. cerevisiae*, em solução fisiológica de KCl 0,154M.

Os teores de trealose encontrados por Alcarde & Basso (1997) após choque térmico, atingiram 6,33 mg/100 mg de matéria seca e Gutierrez (1990) alcançou 14,97 mg/100 mg, enquanto no presente ensaio, sem submissão a choque térmico ou variações de outras condições do meio, o acúmulo de trealose se limitou a 0,4 a 0,5 mg/100 mg de matéria seca. É possível deduzir-se que em meio rico, sem condições de indução de acúmulo de carboidratos como a trealose e o glicogênio, a fermentação e o desenvolvimento celular, são limitados pela concentração de açúcar que se extingue e salvo um estímulo externo, não haverá acúmulo de carboidratos e menor será a sobrevivência em condições estressantes se esta estiver ligada aos teores em questão.

Os teores de glicogênio encontrados neste experimento também confirmam que os carboidratos encontrados na levedura comercial, obtida aerobiamente, são da mesma ordem que a trealose, em média, 12 % da matéria seca (Tabela 14) e que em fermentação este teor cai para cerca de 4%, em média (Figura 10), um valor cerca de 10 vezes maior que o conteúdo em trealose. O teor de glicogênio ao longo do experimento sofreu pouca variação a não ser no último período avaliado que foi o 7º dia (168 h). Não se observou nenhuma diferença entre os tratamentos T1 e T2 e os teores de glicogênio poderiam estar relacionados à perda de viabilidade durante jejum aeróbico, ligado ao maior consumo de reservas nessas células, conforme Ball & Atkinson (1975), o que não se pode precisar pelos dados da presente pesquisa, a não ser os 2 últimos períodos que mostram queda no teor da reserva de glicogênio.

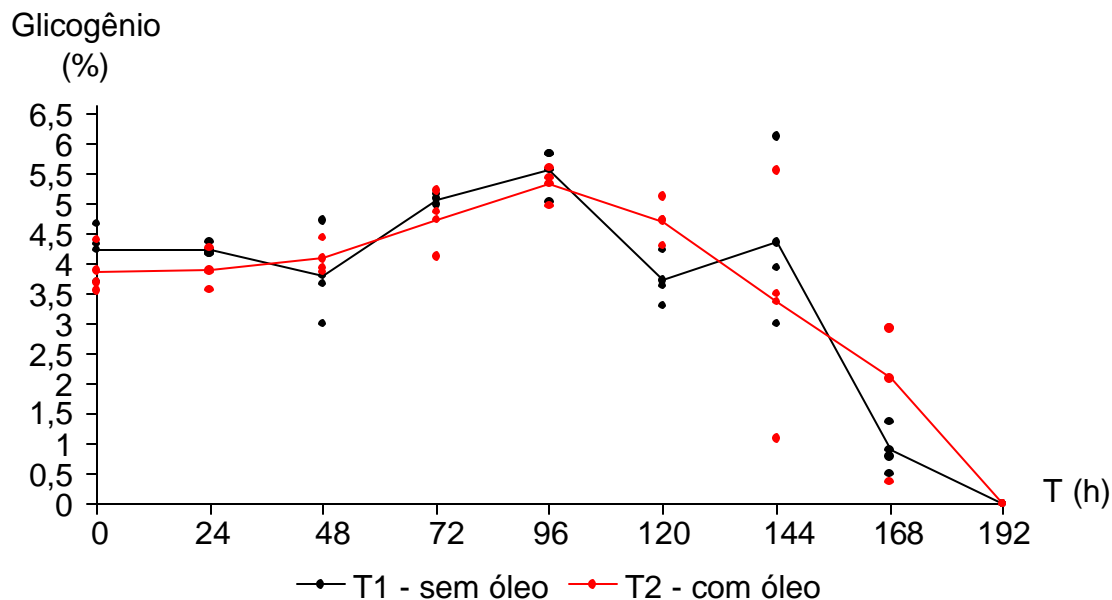


Figura 10 – Glicogênio em leveduras. Teores percentuais em relação a matéria seca de *S. cerevisiae* mantida em condições não proliferantes ao longo de 192 h.

A análise estatística dos dados relativos aos teores de glicogênio, mais uma vez mostraram-se não significativos para tratamentos e apenas para tempos de amostragem, onde novamente os baixos valores e a dispersão dos dados analíticos podem ter sido os causadores dessa influência.

Novas pesquisas são sugeridas para melhor compreensão da variação dos carboidratos num processo não proliferante. É possível que se tenha, que provocar choque térmico ou oferta de açúcares em ausência de N para provocar acúmulo de trealose (Alcarde & Basso, 1997 ; Gutierrez, 1990 ; Hottiger et al., 1987 e Leão, 1972) em fermentação e em seguida submetidas aos processos estressantes até dissimilação a níveis críticos desses carboidratos.



## 5 CONCLUSÕES

Para as condições em que foram conduzidos os experimentos desta pesquisa, pode-se concluir o que se segue:

1. As leveduras mantidas em solução fisiológica, em condições não proliferantes, mas em agitação constante, perderam a viabilidade celular, acentuadamente, após 24 h, e iniciaram progressiva autólise após 96 – 120 h;
2. Não foi detectada qualquer diferença de comportamento na fermentação ou na resistência ao período estressante em condições não proliferantes em função do tratamento com 3 g/L de óleo de soja;
3. Os teores de trealose e glicogênio após a fermentação foram de 0,4 – 0,5 mg por 100 mg de matéria seca e 4 mg por 100 mg de matéria seca respectivamente, pela ausência de estímulo ao acúmulo. Estes teores muito baixos, podem ser responsáveis pela menor resistência a períodos de jejum;
4. Nas condições ensaiadas, pode-se preservar a massa de células para reutilização até um período máximo de 4 dias.

A velocidade de autólise após a perda da viabilidade celular, pode ser um fenômeno associado aos teores de carboidratos – glicogênio e trealose – e merecem ser melhor investigados visando-se informações sobre o tempo de jejum passível de ser enfrentado para reutilização em novas fermentações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, v.54, n.3, p.189-194, set./dez. 1997.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.de M. Aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja. **Revista de Microbiologia**, v.18, n.1, p.52-57, jan./mar. 1987.
- AMORIM, H.V.; GOMES, E. Conservação da levedura durante interrupções no processo fermentativo. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 7, p.51-54, 1987.
- AMORIM, H.V.; GOMES, E. Conservação de levedura durante interrupções no processo fermentativo. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 8, p.48-59, 1988.
- BACILA, M. **Curso de fisiologia de microrganismo**. Curitiba: UFPr, Instituto de Bioquímica, 1960, 209p.
- BALL, W.J.; ATKINSON, D.E. Adenylate energy charge *in Saccharomyces cerevisiae* during starvation. **Journal of Bacteriology**, v.121, n.3, p.975-982, Mar. 1975.

BENDOVÁ, O.; RICHTER, V.; JANDEROVÁ, B.; HÄUSLER, J. Identification of industrial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.6, p.810-812, Sep.1991.

BERKE, H.L.; ROTHSTEIN, A. The metabolism of storage carbohydrates in yeast studied with glucose - 1 - C<sup>14</sup> and Dinitrophenol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.72, p.380-395, 1957.

BLOOMFIELD, D.K.; BLOCH, K. The formation of  $\Delta^9$ - Unsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v.235, n1-3, p.337-345, 1960.

BRIN, M. Tranketolase: clinical aspects. **Method in Enzymology**, v.9, p.506-514, 1966.

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, n.2, p.371-378, Aug. 1969.

CABALLERO CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces sp.*) e determinação do valor nutritivo da proteína em células integras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.102-106, maio/ago. 1997.

CABIB, E.; LELOIR, L.F. The biosynthesis of trehalose phosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v.231, p.259-275, 1958.

- CARVALHAL, M.L.C.; CASTELLANI, B.R.; ALTERTHUM, F. Efeito de antibióticos poliênicos sobre *Saccharomyces cerevisiae* contendo diferentes esteróis e ácidos graxos insaturados incorporados à membrana citoplasmática. **Revista de Microbiologia**, v.11, n.3, p.71-75, jul./set. 1980.
- CARVALHO, L.C.C. Cenário sucroalcooleiro. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.18, n.6, p.8-9, jul./ago. 2000.
- CHEN, S.L. Carbohydrate assimilation in actively growing yeast, *Saccharomyces cerevisiae* **Biochimica et Biophysica Acta**, v.32, p.470-479, 1959a.
- CHEN, S.L. Carbohydrate assimilation in actively growing yeast, *Saccharomyces cerevisiae* **Biochimica et Biophysica Acta**, v.32, p.480-484, 1959b.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of Membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. **Science**, v.223, n.4637, p.701-703, Feb. 1984.
- DESMONTS, R. Utilização do levedo na alimentação da criança. **Pediatria Prática**, v.39, n.7, p.7-18, jul. 1968.
- DUARTE, M.C.T.; SERZEDELLO, A.; PONEZI, A.N.; SERRA, G.E.; OLIVEIRA, M.C.de.F.L.de.O. Effect of soy oil on the carbohydrate reserves of *Saccharomyces uvarum* IZ 1904 in fermentative conditions. **Revista de Microbiologia**, v.28, n.1, p.17-22, jan./fev. 1997.

FERREIRA, L.V. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 1998. 125p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FERREIRA, L.V.; AMORIM, H.V.; BASSO, L.C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p.29-32, jan./abr. 1999.

FIALHO, E.T.; GOMES, P.C.; ALBINO, L.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.

FONSECA, H.; GUTIERREZ, L.E. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v.31, p.485-490, 1974.

GHIRALDINI, J.A.; ROSSELL, C.E.V. Caracterização e qualidade de levedura desidratada para a alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1997. p.27-48.

GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. Piracicaba, 1988. 206p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v.47, n.2, p.597-608, 1990.
- GUTIERREZ, L.E. Composição em ácidos graxos e viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.9, n.6, p.31-34, jul./ago. 1991.
- GUTIERREZ, L.E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ, Dept. Ciência e Tecnologia Agroindustrial, 1997. 270p.
- GUTIERREZ, L.E.; SILVA, R.C.M.da. Fatty acid composition of cane molasses and yeasts. **Scientia Agricola**. v.50, n.3, p.473-477, out./dez. 1993.
- GUTIERREZ, L.E.; ANNICCHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L. Capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v.47, n.2, p.575-595, 1990.
- HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 312p.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH. Á.; MÁTRAI, B. Yeast as a human protein source. **Acta Alimentaria**, v.17, n.4, p.374-375, Dec. 1988.
- HARRISON, J.S. Yeast production. HOCKENHULL, D.J.D. **Progress in industrial microbiology**. London, Colchester and Beccles, 1971. cap.4, p.129-178: Yeast production.

- HAYASHIDA, S.; FENG, D.D.; HONGO, M. Function of the high concentration alcohol-producing factor. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.38, n.10, p.2001-2006, 1974.
- HORII, J. Contribuição ao estudo do metabolismo da glicose em *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen. Piracicaba, 1972. 86p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.12, p.5518-5522, Dec. 1987.
- HUNTER, K.; ROSE, A.H. Yeast lipids and membranes. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts**. London: Academic Press, 1971. cap.6, 211-270.
- KELLER, F.; SCHELLENBERG, M.; WIEMKEN, A. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Archives of Microbiology**, v.131, n. 4, p.298-301, June 1982.
- KOSHIMIZU, L.H.; CRUZ, M.R.de.M.; GOMEZ, E.I.V.; NETTO, C.L.B.; GONÇALVES, A.C.R.; BORZANI, W. Avaliação da concentração de leveduras suspensas em um meio aquoso pela medida do volume ocupado pelas células. **Saccharum STAB**, v.4, n.18, p.14-16, jan. 1982.

- LAHR FILHO, D.; GHIRALDINI, J.A.; ROSSELL, C.E.V. Estudos de otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In: SGARBIERI, V.C.; DRAETTA, I.S. (Coord.) **Produção de biomassa de levedura: Utilização em alimentação humana e animal**. Campinas: ITAL, 1996, p.59-67.
- LALUCE, C. Leveduras termotolerantes. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.9, n.6, p.40-43, jul./ago. 1991.
- LEÃO, M.H.M.R. Metabolismo de trealose e glicogênio em levedura de cervejaria. Rio de Janeiro, 1972. 58p. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- LEÃO, M.H.M.R.; PANEK, A.D.; CARVALHO, V.L.A.C. Glycogen accumulation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*: catabolite repression effects. **I.R.C.S. Medical Science**, v.12, p.411-412, 1984.
- LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, v.143, n.3, 1384-1394, Sept. 1980.
- LIMA, G.J.M.M.de. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana de açúcar na alimentação de matrizes suínas em gestação e lactação. Piracicaba, 1983. 139p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MALLETTE, M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. **Methods in Microbiology**, v.1, p.521-566, 1969.



- MANNERS, D.J. The structure and biosynthesis of storage carbohydrates in yeast. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts**. London: Academic Press, 1971. cap.10, 419-439.
- MARQUES, T.A. O uso de fermento reciclado com teor reduzido em metabólitos e seu efeito na fermentação alcoólica. Campinas, 1997. 105p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- MARTÍN, M.C.; DÍAZ, L.A.; MANZANAL, M.B.; HARDISSON, C. Role of trehalose in the spores of *Streptomyces*. **F.E.M.S. Microbiology Letters**, v.35, p.49-54, 1986.
- MATIAZI, H.J. Efeito de agentes estressantes sobre o teor de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 1995. 70p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MIYADA, V.S. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana de açúcar na alimentação de suínos em crescimento e acabamento. Piracicaba, 1978. 106p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MOREIRA, J.R.de.A. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana de açúcar em rações isocalóricas para suínos em crescimento e acabamento. Piracicaba, 1984. 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- NOGUEIRA, I.F.; OLIVA NETO, P.de. Efeito dos parâmetros físicos no metabolismo de carboidratos de reserva de *Saccharomyces cerevisiae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., Fortaleza, 2000. **Alimentos para o terceiro milênio**. resumos. Fortaleza: Expressão Gráfica Digital, 2000. 1v.
- PEPPLER, H.J. Food yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts**. London: Academic Press, 1970. cap.8, p.421-463.
- PIERCE, J.S. Measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v.76, p.442-443, 1970.
- QUAIN, D.E. Studies on yeast physiology-impact on fermentation performance and product quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v.95, n.5, p.315-323. Sept./Oct. 1988.
- QUAIN, D.E.; THURSTON, P.A.; TUBB, R.S. The structural and storage carbohydrates of *Saccharomyces cerevisiae*: Change during fermentation of wort and role for glycogen catabolism in lipid biosynthesis. **Journal of The Institute of Brewing**, v.87, n.2, p.108-111, Mar./Apr. 1981.
- QUASTEL, J.H. Meetings. **Science**, v.158, p.146-161, Oct./Dec. 1967.
- REED, G.; PEPPLER, H.J. **Yeast technology**. Westport: The Avi Publishing Company, 1973. 378p.
- RESENDE, M.A.de; ALTERTHUM, F. Effect of temperature on the lipid composition of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v.28, n.4, p.345-349, oct/dic. 1986.

RIBEIRO, C.A.F. Potencialidades de diferentes linhagens de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* na tecnologia de aguardente de cana. Piracicaba, 1997. 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RIBEIRO, F.J.; LOPES, J.J.C.; FERRARI, S.E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v.105, n.1, p.26-30, 1987.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 165p.

STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum STAB**, v.4, n.17, p.43-46, nov. 1981.

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

THOMAS, D.S.; ROSE, A.H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. **Archives of Microbiology**, v.122, n. 1, p.49-55, July 1979.

TREVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiological Reviews**, v.48, n.1, p.42-59, Mar. 1984.

TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism: The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, v.62, n.2, p.177-183, 1956a.

TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism: Yeast carbohydrate fractions. Separation from nucleic acid, analysis, and behavior during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, v.63, p.23-33, 1956b.

TREVELYAN, W.E.; GAMMON, J.N.; WIGGINS, E.H.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism: Synthesis of cell carbohydrates during glucose fermentation and its inhibition by azide. **Biochemical Journal**, v.50, p.303-310, 1952.

VASCONCELOS, J.N.de. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. **Brasil Açucareiro**, v.105, n.4/6, p.41-48, 1987.

WHITE, J. **Yeast technology**. London: Chapman and Hall, 1954. 432p.

WIEMKEN, A. Thehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.58, n.3, p209-217, Oct. 1990.

WILSON, K.; McLEOD. B.J. The influence of conditions of growth on the endogenous metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: effect on protein, carbohydrate, sterol and fatty acid content and on viability. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.42, n.4, p397-410, 1976.

## APÊNDICES

Tabela 1. Caracterização do final de fermentação através de pesagem.

Tempos (h)	Diferença de massa (g)					
	T1			T2		
	1	2	3	1	2	3
0	384,81	379,25	386,84	347,58	379,23	368,00
1	384,68	379,13	386,71	347,46	379,11	367,87
12	378,25	372,69	380,26	341,22	372,83	361,83
23	375,21	369,63	377,19	338,01	369,50	358,43
24	375,19	369,61	377,16	337,98	369,48	358,41

Tabela 2. Contagem de unidades formadoras de colônias, sob condições não proliferantes.

	Tempos									
	(h)									
	0	24	48	72	96	120	144	168	192	
	(x10 <sup>8</sup> )	(x10 <sup>8</sup> )	(x10 <sup>7</sup> )	(x10 <sup>6</sup> )	(x10 <sup>4</sup> )	(x10 <sup>5</sup> )	(x10 <sup>3</sup> )	(x10)	(x10)	
T1		1,60	1,33	4,60	3,00	2,00	-	0,00	0,00	0,00
	Rep. 1	1,70	1,37	4,10	1,00	4,00	0,04	0,00	0,00	0,00
		0,50	1,17	-	1,00	1,00	1,00	2,00	0,00	0,00
	Média	1,27	1,29	4,35	1,67	2,33	0,52	2,00	0,00	0,00
		0,30	-	2,10	3,00	-	-	0,00	0,00	0,00
	Rep. 2	0,30	0,78	2,80	2,00	-	0,01	0,00	0,00	0,00
		1,40	1,46	1,30	1,00	-	-	0,00	0,00	0,00
	Média	0,67	1,12	2,07	2,00	-	0,01	0,00	0,00	0,00
		0,90	1,17	0,10	2,00	-	-	0,00	0,00	0,00
	Rep. 3	0,90	1,54	-	2,00	-	-	0,00	0,00	0,00
	Média	0,70	1,13	0,30	1,00	1,00	0,10	0,00	0,00	0,00
	Média total	0,83	1,28	0,20	1,67	1,00	0,10	0,00	0,00	0,00
T2		0,92	1,23	2,21	1,78	1,67	0,21	0,67	0,00	0,00
		0,90	-	1,00	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
	Rep. 1	0,90	0,89	1,70	1,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,70	0,94	1,80	-	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Média	0,83	0,92	1,50	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,70	0,63	1,00	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
	Rep. 2	0,70	0,55	1,60	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
		1,90	0,56	2,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Média	1,10	0,58	1,53	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,60	1,13	1,60	6,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00
	Rep. 3	0,60	1,32	1,90	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Média	0,80	0,79	2,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média total	0,67	1,08	1,83	2,67	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Média total	0,87	0,86	1,62	1,56	1,67	0,00	0,00	0,00	0,00	





Tabela 4. Concentração celular de *S. cerevisiae* em condições não proliferantes ao longo do período de 8 dias.

Tratamento	T1			Média	T2			Média
	Tempo (h)	Repetição (g/L)			Repetição (g/L)			
		1	2	3		1	2	3
0	9,02	7,96	8,25	8,41	8,02	6,79	7,97	7,59
24	8,94	9,42	9,75	9,37	8,99	9,15	9,30	9,15
48	8,01	8,09	8,22	8,11	7,88	7,79	8,28	7,98
72	7,61	7,57	7,72	7,63	6,98	6,98	7,32	7,09
96	6,98	6,36	6,36	6,57	6,04	5,82	6,05	5,97
120	5,14	3,44	5,11	4,56	4,28	4,77	4,67	4,57
144	4,45	5,41	2,09	3,98	0,39	4,83	4,89	3,37
168	1,32	3,01	0,54	1,62	2,75	0,33	2,07	1,72
192	1,77	5,57	5,41	4,25	0,48	0,49	0,88	0,62

A determinação foi efetuada por técnica turbidimétrica

Tabela 5. Nitrogênio total nas células de leveduras mantidas em suspensão.

Tempo (h)	T1			Média	T2			Média
	Repetição (mg/100 mL)				Repetição (mg/100 mL)			
	1	2	3		1	2	3	
0	57,14	53,72	55,21	55,36	50,89	45,68	50,89	49,15
24	48,96	53,27	51,04	51,09	45,98	49,85	51,64	49,16
48	45,09	42,56	46,28	44,64	39,73	38,84	39,28	39,28
72	41,07	39,14	43,15	41,12	37,05	38,54	38,24	37,94
96	39,58	35,12	35,12	36,61	33,93	30,21	32,59	32,24
120	19,49	14,14	18,15	17,26	13,39	20,68	17,26	17,11
144	12,65	18,60	6,10	12,45	-	13,69	12,80	13,25
168	6,70	10,42	-	8,56	6,55	-	6,85	6,70
192	7,74	15,92	14,29	12,65	3,12	3,57	4,46	3,72

Tabela 6. Nitrogênio total na fase líquida da suspensão.

Tempo (h)	T1			Média	T2			Média
	Repetição (mg/100 mL)				Repetição (mg/100 mL)			
	1	2	3		1	2	3	
0	2,60	2,08	1,79	2,16	2,23	1,79	2,16	2,06
24	10,34	9,82	9,30	9,82	9,15	9,08	7,96	8,73
48	14,96	14,66	13,09	14,24	14,51	14,29	14,51	14,44
72	15,18	18,01	15,70	16,30	18,08	18,97	17,86	18,30
96	19,12	23,88	22,77	21,92	21,35	23,36	26,34	23,68
120	34,00	37,05	36,31	35,79	36,90	26,49	35,86	33,08
144	41,44	34,00	45,83	40,42	41,81	25,74	46,58	38,04
168	45,98	41,59	51,26	46,28	42,41	45,98	47,02	45,14
192	45,01	41,52	42,34	42,96	44,42	47,32	49,25	47,00

Tabela 7. Nitrogênio na massa seca de leveduras.

Tratamento Tempo (h)	T1			Média	T2			Média
	Repetição (%)				Repetição (%)			
	1	2	3		1	2	3	
0	6,34	6,75	6,69	6,59	6,35	6,73	6,39	6,49
24	5,48	5,66	5,24	5,46	5,12	5,45	5,55	5,37
48	5,63	5,26	5,63	5,51	5,04	4,99	4,75	4,93
72	5,40	5,17	5,59	5,39	5,31	5,52	5,22	5,35
96	5,67	5,52	5,52	5,57	5,61	5,20	5,39	5,40
120	3,80	4,11	3,55	3,82	3,13	4,34	3,70	3,72
144	2,84	3,44	2,92	3,07	-	2,84	2,62	2,73
168	5,06	3,46	-	4,26	2,38	-	3,31	2,85
192	4,37	2,86	2,64	3,29	6,49	7,28	5,08	6,28

Tabela 8. Carboidratos totais obtidos na suspensão celular de leveduras, após coleta de células e lavagem.

Tratamento Tempo (h)	T1			Média (g/L)	T2			Média (g/L)
	Repetição				Repetição			
	1	2	3		1	2	3	
0	1,80	1,76	1,81	1,79	1,79	1,44	1,71	1,65
24	1,97	2,01	2,01	2,00	1,87	1,87	1,96	1,90
48	1,94	1,92	1,94	1,93	1,87	1,81	1,94	1,87
72	1,87	1,84	1,76	1,82	1,80	1,73	1,80	1,78
96	1,81	1,80	1,80	1,80	1,79	1,73	1,66	1,73
120	1,42	0,81	1,37	1,20	1,23	1,36	1,36	1,32
144	1,16	1,47	0,44	1,02	0,09	1,37	1,14	0,87
168	0,17	0,56	0,14	0,29	0,86	0,06	0,52	0,48
192	0,31	1,53	1,55	1,13	0,06	0,08	0,14	0,09







\*\*\*\*\*  
 \* SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA \*  
 \* Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado \*  
 \* Centro de Informatica na Agricultura - ESALQ - USP - SP \*  
 \* ANALISE DA VARIABEL ALCOOL - ARQUIVO: ESTATI1 \*  
 \*\*\*\*\*

CODIGO DO PROJETO: 001

RESPONSAVEL: ANDRE E S BELLUCO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: INTEIRAMENTE CASUALISADO

OBSERVACOES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR	NOME
A	TRATA

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATA	1	0.0501661	0.0501661	3.8389	0.06496
RESIDUO	16	0.2090837	0.0130677		
TOTAL	17	0.2592498			

MEDIA GERAL = 4.741667

COEFICIENTE DE VARIACAO = 2.411 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	9	4.794445	4.794445	a	A
2	2	TRATA 2	9	4.688889	4.688889	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
 D.M.S. 5% = 0.11431 - D.M.S. 1% = 0.15737  
 DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

\*\*\*\*\*  
 \* SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA \*  
 \* Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado \*  
 \* Centro de Informatica na Agricultura - ESALQ - USP - SP \*  
 \* ANALISE DA VARIAVEL VIABILIDADE CELULAR - ARQUIVO:ESTATIS\*  
 \*\*\*\*\*

CODIGO DO PROJETO: 001

RESPONSAVEL: ANDRE E S BELLUCCO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: FATORIAL

OBSERVACOES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR	NOME
A	TRATA
B	EPOCA

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATA	1	68.6986480	68.6986480	8.6528	0.00796
EPOCA	4	10299.7438967	2574.9359742	324.3225	0.00001
TRA*EPO	4	440.4746434	110.1186609	13.8698	0.00006
RESIDUO	20	158.7886180	7.9394309		
TOTAL	29	10967.7058061			

MEDIA GERAL = 74.333336

COEFICIENTE DE VARIACAO = 3.791 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	15	75.846665	75.846665	a	A
2	2	TRATA 2	15	72.819996	72.819996	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
 D.M.S. 5% = 2.14620 - D.M.S. 1% = 2.92466

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 1 DO FATOR EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	TRATA 2	3	97.533325	97.533325	a	A
2	1	TRATA 1	3	97.099996	97.099996	a	A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 2 DO FATOR EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	TRATA 2	3	97.199992	97.199992	a	A
2	1	TRATA 1	3	94.633331	94.633331	a	A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 3 DO FATOR EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	3	65.366669	65.366669	a	A
2	2	TRATA 2	3	64.233332	64.233332	a	A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 4 DO FATOR EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	3	68.899999	68.899999	a	A
2	2	TRATA 2	3	50.733332	50.733332	b	B



TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
DENTRO DE EPOCA 5 DO FATOR EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	TRATA 2	3	54.399999	54.399999	a	A
2	1	TRATA 1	3	53.233332	53.233332	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 4.79906 - D.M.S. 1% = 6.53973

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	EPOCA 1	6	97.316661	97.316661	a	A
2	2	EPOCA 2	6	95.916662	95.916662	a	A
3	3	EPOCA 3	6	64.800001	64.800001	b	B
4	4	EPOCA 4	6	59.816666	59.816666	c	BC
5	5	EPOCA 5	6	53.816666	53.816666	d	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 4.86586 - D.M.S. 1% = 6.08520

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA  
DENTRO DE TRATA 1 DO FATOR TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	EPOCA 1	3	97.099996	97.099996	a	A
2	2	EPOCA 2	3	94.633331	94.633331	a	A
3	4	EPOCA 4	3	68.899999	68.899999	b	B
4	3	EPOCA 3	3	65.366669	65.366669	b	B
5	5	EPOCA 5	3	53.233332	53.233332	c	C

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA  
DENTRO DE TRATA 2 DO FATOR TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	EPOCA 1	3	97.533325	97.533325	a	A
2	2	EPOCA 2	3	97.199992	97.199992	a	A
3	3	EPOCA 3	3	64.233332	64.233332	b	B
4	5	EPOCA 5	3	54.399999	54.399999	c	C
5	4	EPOCA 4	3	50.733332	50.733332	c	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 6.88136 - D.M.S. 1% = 8.60577

\*\*\*\*\*  
 \* SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA \*  
 \* Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado \*  
 \* Centro de Informatica na Agricultura - ESALQ - USP - SP \*  
 \*ANALISE DA VARIABEL CONCENTRAÇÃO CELULAR - ARQUIVO:ESTATIS\*  
 \*\*\*\*\*

CODIGO DO PROJETO: 001

RESPONSAVEL: ANDRE E S BELLUCO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: FATORIAL

OBSERVACOES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A TRATA  
 B EPOCA

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATA	1	1.5869924	1.5869924	12.7619	0.00220
EPOCA	4	28.5798419	7.1449605	57.4567	0.00001
TRA*EPO	4	0.4824736	0.1206184	0.9700	0.55293
RESIDUO	20	2.4870763	0.1243538		
TOTAL	29	33.1363842			

MEDIA GERAL = 7.787334

COEFICIENTE DE VARIACAO = 4.528 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	15	8.017333	8.017333	a	A
2	2	TRATA 2	15	7.557333	7.557333	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
 D.M.S. 5% = 0.26860 - D.M.S. 1% = 0.36602

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 1 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	8.410000	8.410000
2	TRATA 2	3	7.593334	7.593334

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 2 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	9.370000	9.370000
2	TRATA 2	3	9.146666	9.146666

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 3 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	8.106667	8.106667
2	TRATA 2	3	7.983334	7.983334

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 4 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	7.633333	7.633333
2	TRATA 2	3	7.093334	7.093334

MEDIAS DO FATOR TRATA  
DENTRO DE EPOCA 5 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	6.566667	6.566667
2	TRATA 2	3	5.970000	5.970000

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	EPOCA 2	6	9.258333	9.258333	a	A
2	3	EPOCA 3	6	8.045000	8.045000	b	B
3	1	EPOCA 1	6	8.001667	8.001667	b	B
4	4	EPOCA 4	6	7.363333	7.363333	c	B
5	5	EPOCA 5	6	6.268333	6.268333	d	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 0.60897 - D.M.S. 1% = 0.76157

MEDIAS DO FATOR EPOCA  
DENTRO DE TRATA 1 DO FATOR TRATA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	EPOCA 1	3	8.410000	8.410000
2	EPOCA 2	3	9.370000	9.370000
3	EPOCA 3	3	8.106667	8.106667
4	EPOCA 4	3	7.633333	7.633333
5	EPOCA 5	3	6.566667	6.566667

MEDIAS DO FATOR EPOCA  
DENTRO DE TRATA 2 DO FATOR TRATA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	EPOCA 1	3	7.593334	7.593334
2	EPOCA 2	3	9.146666	9.146666
3	EPOCA 3	3	7.983334	7.983334
4	EPOCA 4	3	7.093334	7.093334
5	EPOCA 5	3	5.970000	5.970000

\*\*\*\*\*  
 \* SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA \*  
 \* Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado \*  
 \* Centro de Informatica na Agricultura - ESALQ - USP - SP \*  
 \*ANALISE DA VARIABEL NITROGENIO (LEVEDURA)- ARQUIVO:ESTATIS\*  
 \*\*\*\*\*

CODIGO DO PROJETO: 001

RESPONSAVEL: ANDRE E S BELLUCO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: FATORIAL

OBSERVACOES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A TRATA  
 B EPOCA

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATA	1	132.7600421	132.7600421	30.4250	0.00009
EPOCA	4	1325.1322031	331.2830508	75.9211	0.00001
TRA*EPO	4	17.3578984	4.3394746	0.9945	0.56540
RESIDUO	20	87.2703342	4.3635167		
TOTAL	29	1562.5204778			

MEDIA GERAL = 43.659668

COEFICIENTE DE VARIACAO = 4.785 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	15	45.763332	45.763332	a	A
2	2	TRATA 2	15	41.555999	41.555999	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
 D.M.S. 5% = 1.59109 - D.M.S. 1% = 2.16820

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 1 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	55.356669	55.356669
2	TRATA 2	3	49.153330	49.153330

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 2 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	51.089996	51.089996
2	TRATA 2	3	49.156667	49.156667

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 3 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	44.643331	44.643331
2	TRATA 2	3	39.283333	39.283333

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 4 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	41.120000	41.120000
2	TRATA 2	3	37.943334	37.943334

MEDIAS DO FATOR TRATA  
DENTRO DE EPOCA 5 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	36.606664	36.606664
2	TRATA 2	3	32.243332	32.243332

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	EPOCA 1	6	52.255000	52.255000	a	A
2	2	EPOCA 2	6	50.123332	50.123332	a	A
3	3	EPOCA 3	6	41.963332	41.963332	b	B
4	4	EPOCA 4	6	39.531667	39.531667	b	B
5	5	EPOCA 5	6	34.424998	34.424998	c	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 3.60731 - D.M.S. 1% = 4.51127

MEDIAS DO FATOR EPOCA  
DENTRO DE TRATA 1 DO FATOR TRATA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	EPOCA 1	3	55.356669	55.356669
2	EPOCA 2	3	51.089996	51.089996
3	EPOCA 3	3	44.643331	44.643331
4	EPOCA 4	3	41.120000	41.120000
5	EPOCA 5	3	36.606664	36.606664

MEDIAS DO FATOR EPOCA  
DENTRO DE TRATA 2 DO FATOR TRATA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	EPOCA 1	3	49.153330	49.153330
2	EPOCA 2	3	49.156667	49.156667
3	EPOCA 3	3	39.283333	39.283333
4	EPOCA 4	3	37.943334	37.943334
5	EPOCA 5	3	32.243332	32.243332

\*\*\*\*\*  
 \* SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA \*  
 \* Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado \*  
 \* Centro de Informatica na Agricultura - ESALQ - USP - SP \*  
 \* ANALISE DA VARIAVEL CARBOIDRATO TOTAL - ARQUIVO: ESTATIS \*  
 \*\*\*\*\*

CODIGO DO PROJETO: 001

RESPONSAVEL: ANDRE E S BELLUCO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: FATORIAL

OBSERVACOES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR	NOME
A	TRATA
B	EPOCA

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATA	1	0.0537621	0.0537621	10.5277	0.00425
EPOCA	4	0.2215786	0.0553947	10.8474	0.00018
TRA*EPO	4	0.0085546	0.0021387	0.4188	0.79471
RESIDUO	20	0.1021347	0.0051067		
TOTAL	29	0.3860300			

MEDIA GERAL = 1.827000

COEFICIENTE DE VARIACAO = 3.911 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	15	1.869333	1.869333	a	A
2	2	TRATA 2	15	1.784667	1.784667	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADA  
 D.M.S. 5% = 0.05443 - D.M.S. 1% = 0.07417

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 1 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	1.790000	1.790000
2	TRATA 2	3	1.646667	1.646667

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 2 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	1.996667	1.996667
2	TRATA 2	3	1.900000	1.900000

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 3 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	1.933333	1.933333
2	TRATA 2	3	1.873333	1.873333

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 4 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	1.823333	1.823333
2	TRATA 2	3	1.776667	1.776667

MEDIAS DO FATOR TRATA  
DENTRO DE EPOCA 5 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	1.803333	1.803333
2	TRATA 2	3	1.726667	1.726667

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	EPOCA 2	6	1.948333	1.948333	a	A
2	3	EPOCA 3	6	1.903333	1.903333	ab	AB
3	4	EPOCA 4	6	1.800000	1.800000	bc	ABC
4	5	EPOCA 5	6	1.765000	1.765000	c	BC
5	1	EPOCA 1	6	1.718333	1.718333	c	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 0.12341 - D.M.S. 1% = 0.15433

MEDIAS DO FATOR EPOCA  
DENTRO DE TRATA 1 DO FATOR TRATA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	EPOCA 1	3	1.790000	1.790000
2	EPOCA 2	3	1.996667	1.996667
3	EPOCA 3	3	1.933333	1.933333
4	EPOCA 4	3	1.823333	1.823333
5	EPOCA 5	3	1.803333	1.803333

MEDIAS DO FATOR EPOCA  
DENTRO DE TRATA 2 DO FATOR TRATA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	EPOCA 1	3	1.646667	1.646667
2	EPOCA 2	3	1.900000	1.900000
3	EPOCA 3	3	1.873333	1.873333
4	EPOCA 4	3	1.776667	1.776667
5	EPOCA 5	3	1.726667	1.726667

\*\*\*\*\*  
 \* SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA \*  
 \* Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado \*  
 \* Centro de Informatica na Agricultura - ESALQ - USP - SP \*  
 \* ANALISE DA VARIÁVEL TREALOSE - ARQUIVO: ESTATIS \*  
 \*\*\*\*\*

CODIGO DO PROJETO: 001

RESPONSÁVEL: ANDRE E S BELLUCCO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: FATORIAL

OBSERVAÇÕES NÃO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR	NOME
A	TRATA
B	EPOCA

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATA	1	0.0282133	0.0282133	3.9756	0.05723
EPOCA	4	0.3369666	0.0842417	11.8706	0.00012
TRA*EPO	4	0.0891534	0.0222883	3.1407	0.03667
RESIDUO	20	0.1419334	0.0070967		
TOTAL	29	0.5962666			

MEDIA GERAL = 0.226667

COEFICIENTE DE VARIACAO = 37.165 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	15	0.257333	0.257333	a	A
2	2	TRATA 2	15	0.196000	0.196000	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
 D.M.S. 5% = 0.06417 - D.M.S. 1% = 0.08744

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 1 DO FATOR EPOCA

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	TRATA 2	3	0.423333	0.423333	a	A
2	1	TRATA 1	3	0.393333	0.393333	a	A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 2 DO FATOR EPOCA

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	2	TRATA 2	3	0.333333	0.333333	a	A
2	1	TRATA 1	3	0.226667	0.226667	a	A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 3 DO FATOR EPOCA

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	3	0.253333	0.253333	a	A
2	2	TRATA 2	3	0.090000	0.090000	b	A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 4 DO FATOR EPOCA

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	3	0.226667	0.226667	a	A
2	2	TRATA 2	3	0.093333	0.093333	a	A



TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA  
DENTRO DE EPOCA 5 DO FATOR EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	3	0.186667	0.186667	a	A
2	2	TRATA 2	3	0.040000	0.040000	b	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 0.14348 - D.M.S. 1% = 0.19552

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	EPOCA 1	6	0.408333	0.408333	a	A
2	2	EPOCA 2	6	0.280000	0.280000	ab	AB
3	3	EPOCA 3	6	0.171667	0.171667	bc	B
4	4	EPOCA 4	6	0.160000	0.160000	bc	B
5	5	EPOCA 5	6	0.113333	0.113333	c	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 0.14548 - D.M.S. 1% = 0.18193

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA  
DENTRO DE TRATA 1 DO FATOR TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	EPOCA 1	3	0.393333	0.393333	a	A
2	3	EPOCA 3	3	0.253333	0.253333	ab	A
3	2	EPOCA 2	3	0.226667	0.226667	ab	A
4	4	EPOCA 4	3	0.226667	0.226667	ab	A
5	5	EPOCA 5	3	0.186667	0.186667	b	A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA  
DENTRO DE TRATA 2 DO FATOR TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	EPOCA 1	3	0.423333	0.423333	a	A
2	2	EPOCA 2	3	0.333333	0.333333	a	AB
3	4	EPOCA 4	3	0.093333	0.093333	b	BC
4	3	EPOCA 3	3	0.090000	0.090000	b	BC
5	5	EPOCA 5	3	0.040000	0.040000	b	C

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 0.20573 - D.M.S. 1% = 0.25729

\*\*\*\*\*  
 \* SANEST - SISTEMA DE ANALISE ESTATISTICA \*  
 \* Autores: Elio Paulo Zonta - Amauri Almeida Machado \*  
 \* Centro de Informatica na Agricultura - ESALQ - USP - SP \*  
 \* ANALISE DA VARIABEL GLICOGENIO - ARQUIVO: ESTATIS \*  
 \*\*\*\*\*

CODIGO DO PROJETO: 001

RESPONSAVEL: ANDRE E S BELLUCO

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: FATORIAL

OBSERVACOES NAO TRANSFORMADAS

NOME DOS FATORES

FATOR NOME

A TRATA  
 B EPOCA

QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATA	1	0.2980074	0.2980074	1.4248	0.24529
EPOCA	4	10.6867285	2.6716821	12.7736	0.00009
TRA*EPO	4	0.4508757	0.1127189	0.5389	0.71144
RESIDUO	20	4.1831257	0.2091563		
TOTAL	29	15.6187373			

MEDIA GERAL = 4.484334

COEFICIENTE DE VARIACAO = 10.199 %

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE TRATA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	TRATA 1	15	4.584000	4.584000	a	A
2	2	TRATA 2	15	4.384667	4.384667	a	A

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
 D.M.S. 5% = 0.34835 - D.M.S. 1% = 0.47470

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 1 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	4.233333	4.233333
2	TRATA 2	3	3.876667	3.876667

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 2 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	4.240000	4.240000
2	TRATA 2	3	3.896667	3.896667

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 3 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	3.793333	3.793333
2	TRATA 2	3	4.076667	4.076667

MEDIAS DO FATOR TRATA  
 DENTRO DE EPOCA 4 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	5.080000	5.080000
2	TRATA 2	3	4.736667	4.736667

MEDIAS DO FATOR TRATA  
DENTRO DE EPOCA 5 DO FATOR EPOCA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	TRATA 1	3	5.573334	5.573334
2	TRATA 2	3	5.336667	5.336667

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE EPOCA

NUM.ORDEM	NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	5	EPOCA 5	6	5.455000	5.455000	a	A
2	4	EPOCA 4	6	4.908333	4.908333	a	AB
3	2	EPOCA 2	6	4.068333	4.068333	b	B
4	1	EPOCA 1	6	4.055000	4.055000	b	B
5	3	EPOCA 3	6	3.935000	3.935000	b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO  
D.M.S. 5% = 0.78977 - D.M.S. 1% = 0.98768

MEDIAS DO FATOR EPOCA  
DENTRO DE TRATA 1 DO FATOR TRATA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	EPOCA 1	3	4.233333	4.233333
2	EPOCA 2	3	4.240000	4.240000
3	EPOCA 3	3	3.793333	3.793333
4	EPOCA 4	3	5.080000	5.080000
5	EPOCA 5	3	5.573334	5.573334

MEDIAS DO FATOR EPOCA  
DENTRO DE TRATA 2 DO FATOR TRATA

NUM.TRAT.	NOME	NUM.REPET.	MEDIAS	MEDIAS ORIGINAIS
1	EPOCA 1	3	3.876667	3.876667
2	EPOCA 2	3	3.896667	3.896667
3	EPOCA 3	3	4.076667	4.076667
4	EPOCA 4	3	4.736667	4.736667
5	EPOCA 5	3	5.336667	5.336667
			5.336667	5.336667

## Errata

André Eduardo de Souza Belluco. Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes.

p.	ítem	linha	onde se lê	leia-se
5	2.1	décima e décima primeira	... os teores da composição centesimal da biomassa ...	... os teores dos componentes da biomassa ...
5	2.1	décima segunda	... apresenta ...	... apresentam ...
32	3.7.4	décima oitava	A expressão do teor ...	O teor ...
48	4.2.3	terceira	... alcançou 14,97 mg/100 mg, enquanto ...	... alcançou 14,97 mg de glicose/100 mg de matéria seca, enquanto ...