



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

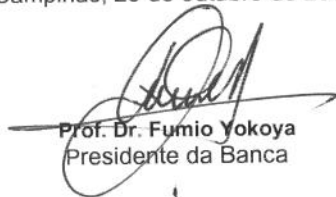
MOBILIZAÇÃO DO GLICOGÊNIO E TREALOSE ENDÓGENOS DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS

Autora: Silene Cristina de Lima Paulillo
(Bióloga)

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Silene Cristina de Lima Paulillo**, aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de outubro de 2001.

Campinas, 25 de outubro de 2001


Prof. Dr. Fumio Yokoya
Presidente da Banca

Orientador: Prof. Dr. Fumio Yokoya
(UNICAMP-FEA-Campinas-SP)

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Basso
(ESALQ-USP-Piracicaba-SP)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS
Estado de São Paulo – Brasil
2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



DE _____
 AMADA: _____
 Ex. _____
 D BC/ _____
☐ D ☐
 PD _____

DE BC
 AMADA: UNICAMP
 P284m
 D BC/ 47219
 16-387102
 D ☒
 R\$ 11,00
 15-01-2002
 PD _____

CM00162403-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

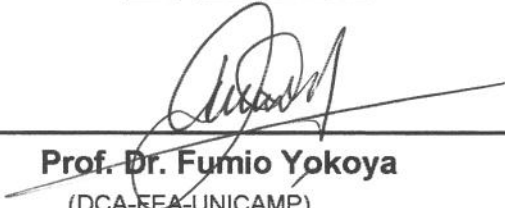
P284m Paulillo, Silene Cristina de Lima
 Mobilização do glicogênio e trealose endógenos de leveduras
 industriais / Silene Cristina de Lima Paulillo. – Campinas, SP:
 [s.n.], 2001.

Orientador: Fumio Yokoya
 Co-orientador: Luiz Carlos Basso
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Glicogênio. 3. Trealose.
 4. Levedos. I. Yokoya, Fumio. II. Basso, Luiz Carlos.
 III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
 de Alimentos. III. Título.

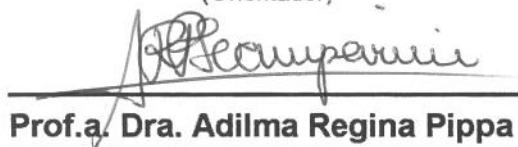
BANCA EXAMINADORA

APROVADA EM 25/10/2001



Prof. Dr. Fumio Yokoya

(DCA-FEA-UNICAMP)
(Orientador)



Prof.a. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini

(DCA-FEA-UNICAMP)
(Membro)

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

(DTA-FEA-UNICAMP)
(Membro)



Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

(DCB-UNESP-ASSIS)
(Membro)

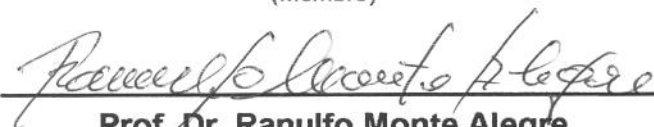
Prof. Dr. Henrique Vianna Amorim

(DCB-ESALQ-USP-PIRACICABA)
(Membro)



Prof.a. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

(IB-UNESP-RIO CLARO)
(Membro)



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

(DEA-FEA-UNICAMP)
(Membro)

Dedico ao meu marido Sérgio Paulillo Júnior, por sua confiança, presença e amor.

Ofereço aos meus pais, Israel e Clarice, e aos meus irmãos, Ima, Tere, Clara, Cleide, Luiz e Fran, que construíram a nossa família, onde sempre encontro apoio e confiança.

"Não basta ter belos sonhos para realizá-los. Mas ninguém realiza grandes obras se não for capaz de sonhar grande. Podemos mudar o nosso destino, se nos dedicarmos à luta pela realização de nossos ideais. É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho; de examinar com atenção a vida real; de confrontar nossa observação com o nosso sonho; de realizar escrupulosamente nossa fantasia. Sonhos, acredite neles!"
(Lenin)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida.

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela orientação, confiança e exemplo de dedicação ao estudo científico.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso pela co-orientação, amizade e pela oportunidade de realização deste trabalho no laboratório do Depto de Bioquímica da ESALQ/USP - Piracicaba.

Aos técnicos de laboratório Admir de Almeida Campos e Luiz Lucatti pela amizade e colaboração neste trabalho.

Aos estagiários Mariana e Christian, pela ajuda neste trabalho.

À Bióloga Denise Amaral Duarte Aranha pelo auxílio nas análises deste trabalho.

À Prof.a. Dra. Maria Imaculada de Lima Montebelo, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Sérgio Paulillo Júnior, pelo apoio, compreensão e paciência em todos esses anos.

À minha querida família, meus pais, irmãos, cunhados (as), sobrinhos (as), pelos momentos de alegria e diversão, que foram fundamentais para continuar a caminhada.

À Beth e Sérgio que sempre acreditaram que isto seria possível. Obrigada pelas orações e velinhas.

Aos amigos Denise Aranha, Denise Alves, Graça, Mariana, Cometa, Admir, Christian, Rudimar, Samuel, Rodrigo, Patrik, Basso, Juliana, Camila e Mário, por tornarem o laboratório de Bioquímica da ESALQ em um ambiente de trabalho muito agradável.

À grande amiga Patrícia pelo seu apoio e verdadeira amizade, sempre presente em todos os momentos, mesmo à distância.

Às amigas Ana, Denise, Patrícia, Rosana e Manuela pela companhia e amizade durante esses anos de estudo e amadurecimento.

A todos os colegas de curso da Unicamp, pela colaboração e apoio.

À Universidade de Campinas, ao Departamento de Ciência de Alimentos, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao Departamento de Bioquímica da ESALQ/USP pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho.

À FERMENTEC pela concessão das linhagens e apoio.

À Fundação “André Tosello” pelo apoio neste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões.

Ao CNPq por um ano de bolsa.

À FAPESP pelos três anos de bolsa de estudo e apoio financeiro concedido.

A todos que de alguma forma me ajudaram a realizar mais este sonho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Níveis de glicogênio e trealose encontrados nas leveduras	04
2.2. Funções do glicogênio e da trealose	06
2.3. Bioquímica da formação e degradação do glicogênio	09
2.4. Situações que favorecem o acúmulo do glicogênio	15
2.5. Bioquímica da formação e degradação da trealose	16
2.6. Situações que favorecem o acúmulo da trealose.....	20
2.7. Fatores que inibem o acúmulo do glicogênio e da trealose.....	26
2.8. Métodos de detecção de glicogênio e trealose.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Microrganismos.....	30
3.2. Multiplicação do fermento.....	30
3.3. Preparo das células.....	31
3.4. Fermentação endógena	31
3.5. Obtenção de Dados	32

3.6. Análise de Dados.....	33
3.7. Métodos Analíticos.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Cinética da Degradação do Glicogênio e da Trealose.....	37
4.2. Variação de outros parâmetros durante a incubação a 40° C.....	41
4.3. Degradação do glicogênio e da trealose a diferentes temperaturas	47
4.4. Aplicação de choque térmico para degradação de glicogênio e trealose.....	52
4.5. Aplicação de sulfito (NaHSO ₃) para degradação de glicogênio e trealose..	53
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	
ANEXO 1 (Meios de cultura).....	76
ANEXO 2 (Tabelas).....	77
ANEXO 3 (Análise Estatística)	83

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Valores da constante específica de degradação (k) da trealose e glicogênio nas leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>S. cerevisiae</i> SA-1, submetidas a 40°C.....	39
Tabela 2. Valores dos parâmetros obtidos pelas equações das curvas apresentadas nas Figuras 5, 6, 7, e 8 (calculadas usando as respectivas equações do anexo 3).....	44
Tabela 3. Valores da constante específica de degradação (k) (h^{-1}) dos carboidratos endógenos trealose (TRE) e glicogênio (GLI) das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 e SA-1, quando submetidas a diferentes temperaturas.....	47
Tabela 4. Valores de energia de ativação ($\text{kcal. } ^\circ\text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) para degradar trealose e glicogênio no intervalo de temperatura de 40° a 42°C.....	50
Tabela 5. Valores da constante específica de degradação (k) (h^{-1}) dos carboidratos trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> PE-2, quando submetida a choque térmico.....	53
Tabela 6. Valores da constante específica de degradação (k) (h^{-1}) dos carboidratos trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> PE-2, quando submetida a tratamento com diferentes concentrações de NaHSO_3 sob 40°C.....	54
Tabela 7. Valores dos parâmetros obtidos pelas equações das curvas apresentadas nas Figuras 14 e 15 (calculadas usando as respectivas equações do anexo 3).....	58
Tabela 8. Valores dos parâmetros obtidos pelas equações das curvas apresentadas nas Figuras 16 e 17 (calculadas usando as respectivas equações do anexo 3).....	58
Tabela 9. Valores dos parâmetros obtidos pelas equações das curvas apresentadas nas Figuras 18 e 19 (calculadas usando as respectivas equações do anexo 3).....	59
Tabela 10. Relação entre redução da viabilidade ($\Delta \text{V}\%$) e perda do material celular quanto à perda de massa celular (ΔMC).....	62

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Valores percentuais de trealose e glicogênio (g/100g de massa seca) da levedura PE-2, submetida a 40° C.....	37
Figura 2. Valores percentuais de trealose e glicogênio (g/100g de massa seca) da levedura SA-1, submetida a 40° C.....	38
Figura 3. Valores do logaritmo percentual de trealose e glicogênio (g/100g de massa seca) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , PE-2, submetida a 40° C.....	40
Figura 4. Valores do logaritmo percentual de trealose e glicogênio (g/100g de massa seca) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , SA-1, submetida a 40° C.....	41
Figura 5. Valores percentuais de massa seca (M.S.) (g/100g de massa úmida), proteína (PRO) (g/100g m.seca), fermento úmido (FERM) (g/100 mL vinho) e viabilidade (VIAB) (n° /n°) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, sob fermentação endógena a 40° C.....	42
Figura 6. Valores percentuais de massa seca (M.S.) (g/100g de massa úmida), proteína (PRO) (g/100g m.seca), fermento úmido (FERM) (g/100 mL vinho) e viabilidade (VIAB) (n° /n°) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SA-1, sob fermentação endógena a 40° C.....	42
Figura 7. Valores percentuais de etanol (Et-OH) (g/100 mL vinho), proteína (PRO-VIN) (g/100 mL vinho) e glicerol (g/100 mL vinho) no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE-GL I)] na massa seca da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, sob fermentação endógena a 40° C.....	43
Figura 8. Valores percentuais de etanol (Et-OH) (g/100 mL vinho), proteína (PRO-VIN) (g/100 mL vinho) e glicerol (g/100 mL vinho) no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE-GL I)] na massa seca da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SA-1, sob fermentação endógena a 40° C.....	43
Figura 9. Valores do logaritmo percentual (g/100g de massa seca) de trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, quando submetida à fermentação endógena a 42° C.....	48
Figura 10. Valores do logaritmo percentual (g/100g de massa seca) de trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SA-1, quando submetida à fermentação endógena a 42° C.....	49

Figura 11. Valores do logaritmo percentual (g/100g de massa seca) de trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, quando submetida à fermentação endógena a 44° C.....	49
Figura 12. Valores do logaritmo percentual (g/100g de massa seca) de trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SA-1, quando submetida à fermentação endógena a 44° C.....	50
Figura 13. Valores das constantes específicas de degradação (k) (h ⁻¹) dos carboidratos, trealose e glicogênio, das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 e <i>S. cerevisiae</i> SA-1 quando submetidas à fermentação endógena nas temperaturas de 38°, 40°, 42° e 44°C. Valores aplicados à equação de Arrhenius.....	51
Figura 14. . Valores percentuais de etanol (Et-OH) (g/100 mL vinho), proteína (PRO-VIN) (g/100 mL vinho) e glicerol (g/100 mL vinho) no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE-GLI)] na massa seca da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, sem a aplicação de sulfito.....	55
Figura 15. Valores percentuais de massa seca (M.S.) (g/100g de massa úmida), proteína (PRO) (g/100g m.seca), viabilidade (VIAB) (n° /n°) fermento úmido (FERM) (g/100 mL vinho) e da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, sem a aplicação de sulfito.....	55
Figura 16. . Valores percentuais de etanol (Et-OH) (g/100 mL vinho), proteína (PRO-VIN) (g/100 mL vinho) e glicerol (g/100 mL vinho) no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE-GLI)] na massa seca da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, com a adição de sulfito (200 ppm).....	56
Figura 17. Valores percentuais de massa seca (M.S.) (g/100g de massa úmida), proteína (PRO) (g/100g m.seca), teor de fermento úmido (FERM) (g/100 mL vinho) e viabilidade celular (VIAB) (n°/n°) e da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, sob fermentação endógena a 40°C, com a adição de sulfito 200 ppm).....	56
Figura 18. Valores percentuais de etanol (Et-OH) (g/100 mL vinho), proteína (PRO-VIN) (g/100 mL vinho) e glicerol (g/100 mL vinho) no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE-GLI)] na massa seca da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, com a adição de sulfito (400 ppm).....	57
Figura 19. Valores percentuais de massa seca (M.S.) (g/100g de massa úmida), proteína (PRO) (g/100g m.seca), viabilidade (VIAB) (n° /n°) e teor de fermento úmido (FERM) (g/100 mL vinho) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, com a adição de sulfito (400 ppm).....	57

MOBILIZAÇÃO DO GLICOGÊNIO E TREALOSE ENDÓGENOS DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS

Autor: *Silene Cristina de Lima Paulillo*

Orientador: *Dr. Fumio Yokoya*

Co-orientador: *Dr. Luiz Carlos Basso*

RESUMO

A fermentação dos carboidratos de reserva da levedura, glicogênio e trealose, é um procedimento para aumentar o nível de proteína das células de levedura e simultaneamente aumentar a produção de etanol. Este trabalho mostra um estudo da cinética da degradação do glicogênio e trealose e da variação de outros parâmetros durante a incubação a 40°C, com duas linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, Pedra-2 (PE-2) e Santa Adélia-1 (SA-1) e também da degradação destes carboidratos a diferentes temperaturas (38°, 40°, 42° e 44°C). Outros ensaios foram a aplicação de choque térmico, 40°C por 4 ou 6 h seguido de incubação a 33°C, e outro a aplicação de diferentes doses de sulfito (NaHSO_3), durante uma fermentação endógena. Estes foram realizados apenas com a levedura PE-2. A fermentação endógena foi sempre conduzida em suspensão de leveduras de 20 % (p/v) em massa úmida no vinho com cerca de 3 a 4,5 % (v/v) de etanol, em banho termostaticado. A cinética da degradação dos carboidratos de reserva, a 40°C, seguiu uma equação de primeira ordem, sendo sua velocidade uma função exclusiva da concentração de carboidratos presentes na célula. A constante específica de degradação (k) variou de 0,0387 a 0,0746 h⁻¹. Com relação aos outros parâmetros analisados, também a 40°C, observou-se que houve diminuição da viabilidade, massa seca e úmida do fermento, e aumentos da proteína no fermento, etanol, glicerol e proteína no vinho. A degradação do glicogênio e trealose a diferentes temperaturas (38°, 40°, 42° e 44°C) evidenciou que a 38°C o tempo é maior para a degradação em relação às outras temperaturas. Verificou-se que na temperatura de 42°C ou superiores ocorre paralisação, depois de certo tempo, da degradação do glicogênio. Assim, do ponto de vista prático, a temperatura ótima de tratamento deve ser ao redor de 40°C. A aplicação da equação de Arrhenius mostrou que a energia de ativação no intervalo

de 40 e 42°C para a levedura PE-2 foi de 165,75 e 107,84 kcal/K^o/mol, para trealose e glicogênio respectivamente e para a levedura SA-1 foi de 190,45 e 149,72 kcal/K^o/mol respectivamente para trealose e glicogênio. Esse valor elevado pode ser atribuído ao múltiplo mecanismo envolvido no processo. Durante a aplicação do choque térmico a 40°C, seguido pela incubação a 33°C, obteve-se redução na velocidade de degradação próxima à metade do processo isotérmico a 40°C. A adição de sulfito não afetou significativamente a velocidade de consumo dos carboidratos de reserva.

MOBILIZATION OF ENDOGENOUS GLYCOGEN AND TREHALOSE OF INDUSTRIAL YEASTS

Author: *Silene Cristina de Lima Paulillo*

Adviser: *Dr. Fumio Yokoya*

Co-adviser: *Dr Luiz Carlos Basso*

SUMMARY

The fermentation of yeast carbohydrates reserve, glycogen and trehalose, is a procedure to increase protein level of yeast cells and improve production of ethanol. This work shows a study on degradation kinetic of glycogen and trehalose carried out at 40°C, with two industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*, Pedra-2 (PE-2) and Santa Adélia-1 (SA-1) and at different temperatures (38°, 40°, 42° e 44°C). Simultaneous variation in other parameters was also investigated. Application of thermal shock, 40°C for 4 or 6 h followed of incubation 33°C, and treatment with sulfite (NaHSO_3), incubation at 40°C were also investigated with strain PE-2. The endogenous fermentation was always carried out with suspension of yeasts of 20 % (w/v) on wet basis, suspended in wine with about 3 at 4,5 % (v/v) of ethanol. The degradation of reserve carbohydrates, at 40°C, followed a first-order kinetic, showing that its rate is mainly dependent on the concentration of carbohydrates in the cell. The specific degradation rate (k) varied from 0,0387 to 0,0746 h^{-1} . With relation to the other parameters analyzed, at 40°C, it was observed that the viability, and dry and wet biomass of yeast, were reduced and the cell protein, ethanol, glycerol and protein in wine increased. The degradation of the glycogen and trehalose at different temperatures (38°, 40°, 42° e 44°C) showed that at 38°C the degradation rate was the slowest and at 42°C or higher the degradation of glycogen stopped few hours of incubation. Thus, on the practical point of view, the best temperature of incubation must be around 40°C. The application of Arrhenius equation showed that the energy of activation of interval at 40° and 42°C, for PE-2 strain, was 165.75 and 107.84 $\text{kcal/K}^\circ/\text{mol}$ to trehalose and glycogen respectively and for SA-1 strain was 190.45 and 149.72 $\text{kcal/K}^\circ/\text{mol}$, respectively to trehalose and glycogen. The application of thermal shock at 40° C followed by incubation at 33° C showed 50 % reduction on degradation rate if compared to isothermal process at 40°C. The addition of sulfite did not affect significantly the degradation rate of reserve carbohydrates.

1. INTRODUÇÃO

Nas mais diversas regiões do mundo muitos produtos e subprodutos agro-industriais tornam-se, periodicamente, disponíveis. Alguns podem ser materiais poluentes e outras fontes potenciais de nutrientes, recebendo a denominação de alimentos não convencionais (Miyada, 1987).

Dentre os alimentos não convencionais estão os microrganismos, tais como as leveduras, fungos, as bactérias e algas. Esses microrganismos são fontes importantes de proteínas, vitaminas e minerais, sendo as leveduras as que possuem características mais favoráveis para uso na alimentação humana e animal. O homem utiliza-se das leveduras desde a antiguidade, fabricando pães e bebidas alcoólicas a partir de frutas e cereais. As leveduras também são utilizadas em indústrias farmacêuticas, como extrato de levedura em laboratórios de microbiologia, nos processos de fabricação de pães, em fermentações alcoólicas, em rações animais e também como alimentos não convencionais entre outros (Madigan *et al.*, 1997). Observa-se portanto que a levedura tem sido considerada o organismo eucariótico mais estudado devido à importância econômica dos processos biotecnológicos que a envolve.

As leveduras descartadas do processo fermentativo podem ser utilizadas como ingredientes na fabricação de ração animal devido ao seu teor protéico. No Brasil, cerca de 20000 toneladas de leveduras, por dia, são descartadas do processo fermentativo e secas para a venda como proteínas.

Considerando-se que a levedura seca possui carboidratos como glicogênio e trealose, proteínas, ácidos nucleicos, minerais e outras substâncias, há um interesse que estas leveduras possuam maior porcentagem de compostos nitrogenados, proteínas e ácidos nucleicos, após a secagem, o que melhoraria a qualidade da levedura a ser utilizada como fonte protéica. A fermentação endógena, que metaboliza pela via glicolítica o glicogênio e a trealose, é uma

alternativa para aumentar o teor protéico da levedura além de fornecer como produto final o etanol e CO₂. Esse processo ocorre em condições de estresse da levedura, como a elevação da temperatura do meio.

Vários estudos sobre os carboidratos de reserva das leveduras, glicogênio e trealose, mostram as quantidades que aparecem destes carboidratos. Em *Saccharomyces cerevisiae* tanto a trealose como o glicogênio pode ocorrer em até mais de 23% do peso da matéria seca das células ou menos de 1%, dependendo das condições de crescimento e do estágio do ciclo de vida, sugerindo que estes carboidratos tenham papel importante durante o ciclo de vida da levedura (Lillie & Pringle, 1980).

O glicogênio é o polissacarídeo de reserva dos animais e das leveduras. É constituído por glicoses em ligações α -1,4 e α -1,6. É uma cadeia altamente ramificada, contendo de 8 a 12 resíduos de glicose a cada ramificação (Voet & Voet, 1995). No fígado dos animais pode ser encontrado em até 10% do peso e de 1 a 2% nos músculos.

A trealose foi pela primeira vez, extraída de células de leveduras por Koch & Koch (1925). Trata-se de um dissacarídeo não redutor (α - D - glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 1) - α - D - glicopiranosídeo), presente em fungos, nos quais ele pode ocupar um lugar semelhante à sacarose, também dissacarídeo não redutor de plantas superiores.

Quanto à função desses carboidratos, glicogênio e trealose, a mais comum encontrada é a de serem carboidratos de reserva, porém outras funções são acrescentadas.

Assume-se que a trealose funciona como um carboidrato de reserva energética em adição ao glicogênio (Keller *et al.*, 1982). Para Dijck *et al.* (1995), o

polissacarídeo glicogênio teria a função de reserva e a trealose uma função de proteção contra condições de estresse fisiológico.

Lillie & Pringle (1980) observaram em células de leveduras quando cultivadas em meios desprovidos especificamente de nitrogênio, enxofre ou fósforo, que o glicogênio e a trealose acumularam-se em todos os tratamentos, mas em diferentes extensões, obtendo-se os maiores valores de glicogênio e trealose acumulados no tratamento com o meio sem nitrogênio, sugerindo-se assim que o acúmulo dos carboidratos de reserva foi uma resposta geral à limitação de vários tipos de nutrientes.

Apesar de Suomalainen & Pfaffli (1961) terem observado a função da trealose como agente protetor das leveduras de panificação, contra a autólise, somente a poucos anos é que se tem mais estudos deste papel da trealose. Ela protege a membrana da célula de levedura durante os processos de desidratação-hidratação e congelamento-descongelamento. Crowe *et al.* (1984) sugerem um modelo para a interação da trealose à membrana celular, no qual a trealose substituiria a água ligada às cabeças polares dos fosfolipídios da membrana celular, quando em condições favoráveis e seria perdida no processo de estresse, Panek *et al.* (1993) defendem também o mesmo modelo.

Com o objetivo de buscar um incremento no teor de proteínas das leveduras, subproduto da fermentação alcoólica, que já são vendidas como suplemento da ração animal devido ao teor de proteína, realizou-se um estudo para conhecer a capacidade de degradação dos carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, Pedra-2 e Santa Adélia-1, que permanecem no processo industrial, portanto com grandes chances de serem utilizadas como proteína seca, no descarte.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A vantagem na utilização das leveduras na alimentação humana e animal está nos teores de nutrientes que estas possuem. Segundo Rose & Harrison (1971) a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode possuir teores de proteína bruta que ultrapassam 50%, e níveis consideráveis de vitaminas, tais como tiamina (150 µg/g), riboflavina (70 µg/g), niacina (500 µg/g), piridoxina (30 µg/g) e gorduras em torno de 6%. Quanto aos carboidratos tem-se as β-glucanas da parede celular, trealose, glicogênio e mananas, cujos teores variam com as espécies e as condições de cultivo.

Dar-se à ênfase aos carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, de *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que este trabalho tem como principal objetivo o estudo da degradação destes.

2.1. Níveis de glicogênio e trealose encontrados nas leveduras

Os níveis de glicogênio e trealose encontrados nas células de leveduras são variáveis. Lillie & Pringle (1980) encontraram valores de 1,5 a 22% de glicogênio em relação ao peso de matéria seca de *S. cerevisiae*, cultivadas em diferentes meios de crescimento, desprovidos de nitrogênio e fósforo. Sem fonte de nitrogênio as leveduras diminuem a velocidade de crescimento.

Estudando o efeito de várias concentrações de nitrito (NaNO_2) sobre a fermentação alcoólica da levedura de panificação, *S. cerevisiae*, Gutierrez & De Martin Orelli (1991) determinaram, além da produção de etanol, glicerol e álcoois superiores, o acúmulo de glicogênio e trealose pela levedura. Segundo os autores houve aumento no acúmulo desses carboidratos com o aumento da concentração de nitrito do meio e também queda da viabilidade. O teor de glicogênio encontrado

na levedura no meio sem nitrito foi de 67,7 µg/mg de matéria seca e com 80 ppm de nitrito foi de 114,2 µg/mg, o teor de trealose no meio sem nitrito foi de 24,70 µg/mg e com 80 ppm foi de 46,7 µg/mg. Segundo os autores o nitrito (80 ppm) aumentou o tempo de fermentação em 14 horas a mais, e sugeriram que o nitrito deveria ser primeiro oxidado a nitrato, que é uma das formas de nitrogênio utilizadas pela levedura, e somente depois de toda conversão a produção de etanol iniciar-se-ia.

Schulze *et al.* (1996) analisaram a dinâmica da absorção de amônia $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ em *S. cerevisiae* sob condições anaeróbias e de limitação em nitrogênio, numa fermentação contínua a 30°C, e entre os metabólitos intracelulares analisados estavam o glicogênio e a trealose. O teor de glicogênio e trealose durante a fase de equilíbrio era, respectivamente, de 7,7% (p/p) e 2,55% (p/p) e após 2,2 h diminuíram para 2 e 0,2% (p/p). Esta variação foi explicada pelo aumento na concentração extracelular de amônia, a qual ativaria um sinal da via de transdução, que levaria a uma abertura da via Embden Meyerhof Parnas (EMP) e a uma rápida mobilização do glicogênio e da trealose, e observaram aumento no conteúdo de CO₂. A amônia ativa a fosfofrutoquinase, portanto ativa o fluxo glicolítico.

Os teores dos carboidratos, glicogênio e trealose, podem atingir valores superiores a 23% e inferiores a 1% do peso da matéria seca de células de leveduras, dependendo das condições de crescimento e do estágio do ciclo de vida (Keller *et al.*, 1982).

O glicogênio acumula-se principalmente na fase final de crescimento da levedura, quando ocorre o esgotamento de nitrogênio e glicose esteja ainda disponível. Em leveduras de panificação o conteúdo de glicogênio chega a 12%, com base no peso seco (Phaff *et al.*, 1978). Em leveduras cultivadas em meio com glicose, os níveis de trealose são geralmente baixos durante o desenvolvimento exponencial das células, obtendo-se valores de poucos miligramas por grama de

células. Após a redução do teor de carboidratos, há a diminuição da velocidade de crescimento e acúmulo de trealose, o qual chega ao nível de 80 mg de trealose por grama de células. Ao mesmo tempo há um acúmulo de glicogênio (Newman *et al.* 1993). Hottiger *et al.* (1987b) observaram rápido acúmulo de trealose em uma cultura de levedura, quando esta foi submetida às temperaturas mais elevadas de cultivo. A concentração média de trealose no citossol de leveduras que sofreram um choque térmico foi de aproximadamente 0,25M (Hottiger *et al.* 1994).

Basso & Amorim (1988) realizaram um estudo da mobilização e armazenamento do carboidrato de reserva durante uma fermentação alcoólica com *S. cerevisiae* e observaram que foi intensamente degradada durante os primeiros 30 minutos de fermentação, coincidindo com a produção de glicerol e ácidos orgânicos, sendo repostada durante a incubação posterior. No tempo inicial, a quantidade de glicogênio era de 11,8 g/100g de matéria seca (m.s.) e no final, após 8 horas, era de 15,9 g/100g de m.s. e a trealose também aumentou de 6,22 g/100g de m.s. para 9,08 g/100g de m.s..

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas industrialmente para a produção de etanol por via fermentativa apresentaram teores de 5 a 10 % de trealose (Gutierrez, 1997).

2.2. Função do glicogênio e da trealose

O glicogênio é um polissacarídeo de reserva encontrado nos animais e leveduras. É constituído por unidades de glicose em ligações α -1,4 e α -1,6, formando uma cadeia altamente ramificada (Voet & Voet, 1995). A trealose é o principal dissacarídeo encontrado nos fungos e trata-se de um dissacarídeo não redutor composto por α -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 1) - α -D-glucopiranosídeo.

O glicogênio e a trealose são considerados geralmente carboidratos de reserva, mas são atribuídas outras funções como, por exemplo, proteção celular. Keller *et al.* (1982) comentam que o glicogênio e a trealose podem ser acumulados pelas células em quantidades semelhantes, mas as vias de acúmulo e mobilização desses dois carboidratos de reserva são diferentes. Portanto é de se supor que estes tenham papéis fisiológicos diferentes.

Na esporulação de leveduras, o glicogênio e a trealose são sintetizados na mesma extensão tanto em células esporulantes como não esporulantes. Contudo, somente as células esporulantes possuem a síntese de glicogênio acompanhada por um período de diminuição que coincide com o aparecimento de esporos maduros (Kane & Roth, 1974). Também Panek & Bernardes (1983) concordam que o glicogênio e a trealose possuem papéis fisiológicos diferentes em *S. cerevisiae*, sendo o glicogênio um pré-requisito para a esporulação, enquanto que a trealose seria requerida para a germinação e brotamento.

Panek (1985) propôs outras funções para trealose, além da reserva energética, como um regulador do fluxo glicolítico durante a utilização da maltose, como fator decisivo durante a germinação e como protetor da membrana celular durante a dessecação da levedura.

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, em geral, mostraram 35% de viabilidade após 25 dias de inanição. Contudo, mutantes, deficientes na atividade da trealose-6-fosfato sintetase, permaneceram viáveis por apenas 14 dias após atingirem o número máximo de células numa fermentação (Panek, resultados não publicados). Ling *et al.* (1995) analisaram o efeito da temperatura de fermentação sobre a relação entre a viabilidade celular e o conteúdo de trealose e de glicogênio de *Saccharomyces cerevisiae* (KF-7), numa levedura floculante e termotolerante em fermentação de batelada repetida, por 40h a 35°C. Observaram que o conteúdo de trealose e o número de células viáveis aumentaram durante o período de fermentação de até 15h, declinando após este período. O glicogênio

não mostrou grande variação, concluindo assim que a viabilidade celular está mais estreitamente relacionada com o teor de trealose do que com o de glicogênio, neste tipo de fermentação. Os mesmos autores ao utilizarem diferentes temperaturas, 30, 33 e 35° C, em fermentação de batelada e batelada com reciclo de células, observaram que o teor de trealose aumentou com a elevação da temperatura, sugerindo assim que a trealose atuou como termoprotetor nesta levedura floculante.

Pela manipulação da temperatura, a concentração da trealose e de glicogênio, pode ser alterada significativamente. Aumentando de 30 a 45°C o glicogênio foi exaurido e a trealose sintetizada (Grba *et al.*, 1975). Este fato sugere que há diferenças no comportamento dos sistemas responsáveis pelo metabolismo do glicogênio e da trealose e, em consequência, a possibilidade de que eles possam ter papéis diferentes no metabolismo celular (Panek, 1985).

Coutinho *et al.* (1988) mostraram funções adicionais para o papel da trealose. Os autores compararam o comportamento de linhagem de *Saccharomyces* com baixa atividade de trealose-6-fosfato sintetase (Tre-6-P sintetase) com um mutante com alta atividade desta enzima. Quando as células foram submetidas ao dessecamento, a 37°C por 6 horas, não observaram aumento da trealose endógena durante a desidratação. A viabilidade do mutante com alta atividade da Tre-6-P sintetase não diminuiu mas houve diminuição da viabilidade na linhagem controle. Além disso, no experimento onde as células foram congeladas a -120°C, a adição de 10% de trealose em tampão teve um efeito protetor significativo, evidenciando-se assim a função crioprotetora da trealose. A linhagem mutante com alta atividade da Tre-6-P sintetase mostrou possuir uma capacidade intrínseca para sobreviver, não dependendo da adição da trealose exógena. Alcarde (1996) também associou a trealose com o congelamento e liofilização de leveduras confirmando que a trealose é importante para a manutenção da viabilidade dessas leveduras. Gélinas *et al.* (1989) fizeram um estudo de criorresistência com uma linhagem comercial de panificação de *S.*

cerevisiae e observaram que as culturas que cresceram sob condições de batelada alimentada, por 14 horas, tiveram crescimento mais balanceado e foram mais criorresistentes do que as de batelada não alimentada, por 40 horas. Os níveis de trealose também foram maiores nas leveduras que se mostraram mais criorresistentes. Contudo, a criotolerância e os teores de trealose foram diminuídos nas leveduras cultivadas sob condições de batelada alimentada parcialmente aeróbia, quando comparadas em batelada alimentada sob forte aeração.

Slaughter & Nomura (1992) realizaram um estudo com células de *S. cerevisiae* NCYC 1108, para verificar se a viabilidade celular correlacionava com a quantidade de carboidrato armazenado intracelularmente. Os autores observaram grandes variações, e que para qualquer afirmação é essencial que se conheça o estágio exato do crescimento da levedura, pois baixos valores de glicogênio não significam necessariamente baixa viabilidade.

A função termoprotetora da trealose em levedura é obtida pela sua ação estabilizadora de proteínas (De Virgilio *et al.*, 1994; Ling *et al.*, 1995) além de servir como fonte de carbono e energia em condições de prolongada inanição (Hottiger *et al.*, 1994).

Wiemken (1990), após uma vasta revisão sobre trealose, propôs que o principal papel desta é proteger os componentes do citossol contra condições adversas, tais como dessecação, congelamento e aquecimento e não como carboidrato de reserva, que seria o principal papel do glicogênio.

2.3. Bioquímica da formação e degradação do glicogênio

O glicogênio é um polissacarídeo constituído por unidades de glicose em ligações α -1,4 e com pontos de ramificação no C6, ligação α -1,6.

A biossíntese do glicogênio ocorre em todos os tecidos dos animais e é mais ativa no fígado e músculos. As leveduras também são capazes de armazenar reservas na forma de glicogênio. Semelhante a casos de outros biopolímeros de alta massa molecular, a síntese do glicogênio envolve as fases de iniciação, alongação e ramificação. A iniciação é realizada pela proteína glicogenina. Esta proteína possui uma atividade autoglicolizante e produz uma cadeia curta de $\alpha(1,4)$ - glicosil a partir do UDP-glicose (François & Parrou, 2001). As glicogeninas possuem resíduos de tirosina (Tyr) anexados covalentemente, e esses resíduos são necessários para sustentar o acúmulo de glicogênio e abrigar um terminal $-\text{COOH}$ que interage com a glicogênio sintetase (Mu *et al.*, 1996).

A glicogênio sintetase (Gsy1p/Gsy2p) [glicogênio α -4-glucosil transferase (EC 2.4.1.11)] é a enzima chave para a síntese do glicogênio, ela faz o alongamento da cadeia de glicogênio, e controla a glicogênese. Os genes correlacionados a esta enzima, em *S. cerevisiae*, são GSY1 e GSY2 (Hardy & Roach, 1993). Esta enzima encontra-se em duas formas: fosforilada ou forma D, codificada pelo gene GSY1, e é dependente da glicose-6-P (G-6-P), sendo ativa somente na presença desta, e a outra forma é a defosforilada ou forma I, que é codificada pelo gene GSY2, e independente da G-6-P, e é mais ativa, sendo responsável por 90% da síntese do glicogênio (François & Parrou, 2001). A forma defosforilada (I), ativa, sofre interconversão para a forma fosforilada (D), inativa, pela ação da proteína quinase (PKA) que é ativada pela ação do AMP cíclico. Ao mesmo tempo, o AMP cíclico ativa a fosforilase para a quebra do glicogênio (Gutierrez, 1997). A glicogênio sintetase catalisa a formação das ligações glicosídicas $\alpha(1,4)$ da UDP-glicose para o final da cadeia linear do glicogênio. A forma D requer a presença de um ativador alostérico, G-6-P, para obter atividade completa. Os sítios fosforilados da glicogênio sintetase foram identificados, *in vivo*, como sendo três aminoácidos, Ser-650, Ser-654 e Thr-667 (François & Parrou, 2001).

Após a iniciação pela glicogenina e alongação pela glicogênio sintetase, as cadeias lineares $\alpha(1,4)$ -glicosil são ramificadas pela ação da enzima ramificadora (EC 2.4.1.18) amilo-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-transglicosidase, a qual transfere um bloco de 6-8 resíduos do final de uma cadeia linear para uma cadeia adjacente, formando ligações $\alpha(1,6)$ numa unidade glicosil interna (Brown & Brown, 1966). Esta enzima é codificada por GLC3/GHA1 (Huang *et al.*, 1996). Esses mesmos autores verificaram a inibição da glicogênio sintetase por “olomoucine”, uma proteína quinase, inibidora específica das enzimas da família quinase ciclina-dependente, que contém um polipeptídeo reconhecido por anticorpos anti-Pho85p, o que levou-os a propor que a Pho85p fosforila a glicogênio sintetase “*in vivo*”. Huang *et al.* (1998) identificaram as proteínas ciclinas, Pcl18p e Pcl10p, como subunidades anexas da Pho85p que fosforila a glicogênio sintetase nos aminoácidos Ser-654 e Thr-667.

As duas formas da glicogênio sintetase, designadas D e I, tinham sido descritas por Rothman-Denes e Cabib em 1970. A forma D, que é relativamente dependente de altas concentrações de G-6-P para sua atividade, é encontrada em células na fase exponencial, enquanto a forma I predomina em células isoladas da cultura na fase estacionária. Algumas diferenças nas linhagens, condições da cultura, e testes metodológicos são responsáveis por estas discrepâncias encontradas por diferentes autores.

Na biossíntese do glicogênio tem-se a participação de algumas enzimas fundamentais, ver Figura 1.

De uma maneira geral temos a fosforilação da glicose pela glucoquinase originando assim a G-6-P que é convertida a glicose-1-fosfato (G-1-P) pela ação de uma fosfoglicomutase. A uridina difosfato glicose pirofosforilase (UDPG-pirofosforilase) catalisa a reação da uridina trifosfato (UTP) com a G-1-P para formar a uridina difosfato glicose (UDPG). Nesta reação o radical oxigênio fosforil da G-1-P ataca o átomo de fósforo α da UTP formando a UDPG e liberando PPI

(íon pirofosfato). O ΔG° desta mudança fosfoanidra é aproximadamente zero, porém, o PPI formado é hidrolisado em uma reação altamente exergônica, pela pirofosfatase inorgânica. Então temos para a reação total de formação da UDPG uma reação altamente exergônica:

	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	Enzima
G1P + UTP $\rightleftharpoons$ UDPG + PPI	≈ 0	UDPG - pirofosforilase
H ₂ O + PPI $\rightarrow$ 2Pi	- 33,5	Pirofosfatase inorgânica
Total G1P + UTP $\rightarrow$ UDPG + 2Pi	- 33,5	

Continuando a biossíntese do glicogênio tem-se a UDPG formada que com a ação da glicogênio sintetase transfere a unidade glicosil dela para o grupo C4-OH de um dos finais não redutor do glicogênio para formar uma ligação $\alpha(1\rightarrow4)$ glicosídica.

O ΔG° para a reação da glicogênio sintetase é -13,4kJ.mol⁻¹. A glicogênio sintetase não pode simplesmente unir duas moléculas de glicose; ela pode somente estender uma cadeia de glicana já existente ligadas em $\alpha(1\rightarrow4)$, formando assim o glicogênio linear (α -amilose). A ação conjunta da amilo-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-transglicosilase (enzima ramificadora) transfere o segmento da cadeia terminal, consistindo de aproximadamente 7 resíduos de glicosil para o grupo C6-OH do resíduo de glicose, na mesma ou em outra cadeia de glicogênio, resultando assim no glicogênio ramificado com ligações α -1,6 (Voet & Voet, 1995).

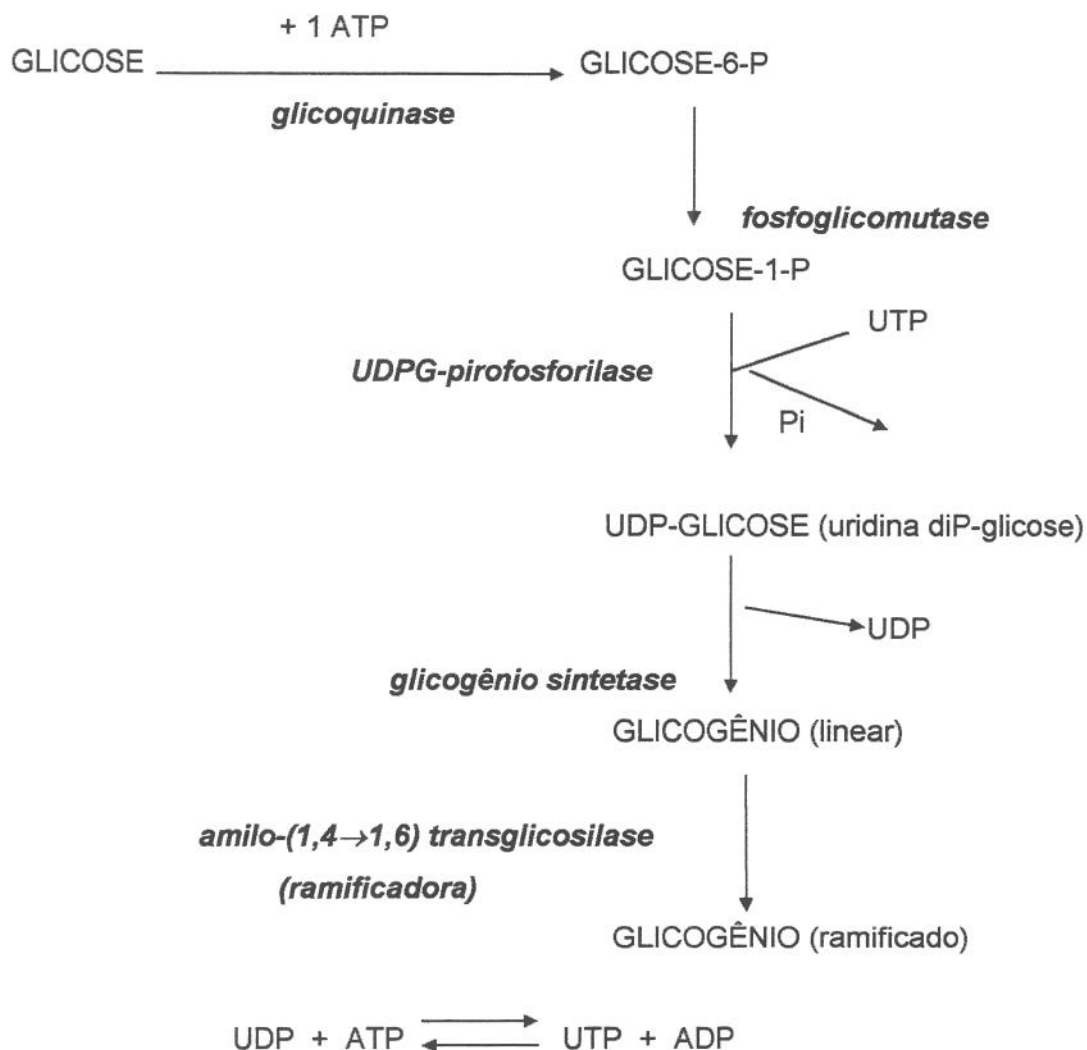


FIGURA 1: Esquema da biossíntese de glicogênio

Fonte: GUTIERREZ, 1997, pag. 238

Segundo François *et al.* (1991) tanto a via gliconeogênica como a glicogenólise pode suprir unidade glicosil para a síntese de trealose durante a fase estacionária de cultivo, após exaustão da glicose do meio. Estes autores sugerem que as unidades de glicose derivadas da degradação do glicogênio não podem ser usadas para a síntese da trealose porque elas servem como fonte de energia para a adaptação respiratória das leveduras.

Na maioria das células eucarióticas, incluindo as leveduras, a degradação do glicogênio pode ocorrer por duas vias, uma sendo a amilólise, catalisada pelas α -glicosidases que produzem unidades de glicose, ou pelas reações das enzimas glicogênio fosforilase (EC 2.4.1.1) e a desramificadora, onde produzem glicose-1-fosfato e glicose (François & Parrou, 2001). A via mais freqüente de degradação do glicogênio, em leveduras, é a realizada pelas enzimas fosforilase e desramificadora, sendo que a via da amilólise, realizada pela atividade da enzima α -amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) é induzida quando ocorre a maturação dos esporos e nenhuma atividade desta enzima é encontrada nas células vegetativas.

Na degradação do glicogênio ocorre o processo inverso à síntese, onde o glicogênio é convertido à G-6-P. A quebra do glicogênio envolve a ação de três enzimas:

1) Glicogênio fosforilase (EC 2.4.1.1) ou α -1,4-glicana: ortofosfato glicosil transferase, catalisa a fosforilação do glicogênio para produzir glicose-1-fosfato (G-1-P) o qual é então isomerizado para G-6-P. Esta enzima libera somente a unidade de glicose que está nas cinco últimas unidades do ponto de ramificação, encurtando a molécula de glicogênio. Esta enzima é codificada pelo gene GPH1 (Hwang *et al.*, 1989). Existem duas formas desta enzima, uma ativa e outra inativa. Esta enzima é ativada alostericamente pelo AMP e inibida pelo ATP e G-6-P. Também a cafeína é considerada um inibidor devido a sua semelhança à adenosina.

Tem-se:



2) Enzima desramificadora do glicogênio (1,4)-glicanotransferase e (1,6)-glicosidase, que remove as ramificações do glicogênio, transferindo uma unidade maltosil ou maltotriosil para uma cadeia $\alpha(1,4)$ adjacente, permitindo a conclusão da reação da glicogênio fosforilase. Esta também hidrolisa as unidades glicosil ligadas em $\alpha(1-6)$ para produzir glicose. Consequentemente 90% dos resíduos de glicose do glicogênio são convertidos para G1P. Os 10% remanescentes, aqueles dos pontos de ramificação, são convertidos à glicose. Esta enzima é codificada pelo gene YPR184w, renomeado GDB1 (Hwang *et al.*, 1989).

3) Fosfoglicomutase, que converte G1P à G6P, que pode então entrar na via glicolítica ou ser hidrolisada a glicose.

2.4. Situações que favorecem o acúmulo do glicogênio

Existem algumas situações que favorecem o acúmulo de glicogênio. Patel & Ingledew (1975), apesar de não terem encontrado uma relação linear entre a quantidade de glicogênio na célula de *S. carlsbergensis* e floculação, observaram um aumento no glicogênio solúvel em ácido sempre acompanhado por um aumento correspondente à floculação. Com relação a diferentes valores de pH, Gomes (1988) encontrou maior proporção de glicogênio em *S. cerevisiae* tratadas a pH 2,5 do que às tratadas a pH 3,0, observando-se assim que a elevação do pH da suspensão é acompanhada pela redução de glicogênio das células. Salmon *et al.* (1989) notaram aumento progressivo no nível de glicogênio, em células de *S. cerevisiae* (tipo selvagem) quando cultivadas em meio com 1% de glicose. Após 24h, o nível era três vezes maior que o controle (sem glicose), concluindo que a glicose inibe a degradação do glicogênio.

2.5. Bioquímica da formação e degradação da trealose

O primeiro passo na biossíntese da trealose é a formação da trealose-6-fosfato a partir da UDP-glicose e glicose-6-fosfato pela ação da enzima trealose-6-fosfato sintetase (EC 2.4.1.15). Essa reação já era conhecida desde 1953 (Leloir & Cabib, 1953). A partir desta o grupo fosfato é removido por uma fosfatase específica, trealose-6-P-fosfatase (EC 3.2.1.28), formando a trealose. A degradação da trealose é feita por duas trealases distintas, uma ácida, confinada nos vacúolos, e outra neutra, localizada no citossol, que é ativada pela fosforilação do AMPcíclico (Thevelein, 1984). Na maioria dos casos, a mobilização da trealose está associada à ativação da trealase neutra. Mutantes deficientes na subunidade da proteína quinase dependente do AMPcíclico mostraram baixos níveis de trealose e alta atividade de trealase (Uno *et al.*, 1983). Thevelein (1984) concorda que a mobilização da trealose em leveduras é regulada pela fosforilação dependente do AMP-cíclico da trealase neutra.

Os genes envolvidos com as enzimas que catalisam a síntese e degradação da trealose têm sido estudados por vários autores. Vuorio *et al.* (1993) clonaram dois genes da trealose sintetase de *S. cerevisiae*. Um dos genes, *TSS1* (trealose sintetase de cadeia curta) apresentou-se idêntico ao *CIF1*, citado anteriormente por Gonzáles *et al.* (1992). Este gene codificou a subunidade de 56-kDa do complexo protéico da trealose sintetase. A ruptura desse gene, *TSS1*, eliminou a atividade das enzimas trealose-6-fosfato sintetase (Tre6Psintetase) e trealose-6-fosfatase (Tre6Pase). Outro gene clonado foi o *TSL1* (trealose sintetase de cadeia longa) que codificou a subunidade de 123-kDa da trealose sintetase.

As atividades de ambas enzimas Tre6Psintetase e trealase aumentam com o aumento da temperatura (40°C), sendo que o efeito é maior sobre a enzima que sintetiza a trealose, levando-se a um acúmulo da trealose (Hottiger *et al.*, 1994).

A atividade máxima da sintetase está em pH 6,6 e na presença de 25mM Mg^{2+} . Os íons Mg^{2+} participam da reação catalisada pela Tre6P sintetase em duas vias com efeitos opostos. Em baixas concentrações (abaixo de 12mM), o Mg^{2+} liga-se à G-6-P produzindo o complexo G-6-P.Mg que provavelmente é um substrato melhor para a enzima que o éster livre (G6P). Quando a concentração do Mg^{2+} aumenta e a concentração da glicose-6-fosfato é mantida, os íons interagem com a enzima produzindo ele mesmo um efeito inibitório (Oestreicher & Panek, 1982).

Hottiger *et al.* (1987b) trabalhando com *S. cerevisiae*, linhagem C276, sob diferentes temperaturas de cultivo, observaram que a 27°C, as células de leveduras multiplicavam-se espontaneamente na presença de glicose e continham somente traços de trealose. Quando foram submetidas a um choque térmico, acumulavam grande quantidade de trealose. A temperatura inicial para o acúmulo da trealose foi de 33 a 35°C e observou-se o pico de trealose entre as temperaturas de 37 e 45°C. A 50°C o acúmulo de trealose cessou e as células morreram.

Coutinho *et al.* (1988) utilizaram um espectrofotômetro a 340 nm acoplado a um sistema enzimático, como em Panek *et al.* (1980), para a determinação da Tre-6-P sintetase, e uma unidade de Tre-6-P sintetase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1,0 μmol de NAD^+ /min a 35°C em pH 6,8.

A sacarose e a trealose são sintetizadas na mesma via. Iniciando-se a partir da UDP-glicose e frutose-6-fosfato ou G-6-P, os dissacarídeos-6-fosfato fosforilados são formados no primeiro passo, com a ação das enzimas sacarose fosfato sintetase (EC 2.4.1.14) e trealose fosfato sintetase (EC 2.4.1.15). No segundo passo os dissacarídeos-6-fosfato são desfosforilados pelas fosfatases específicas, sacarose fosfato fosfohidrolase (EC 3.1.3.24) e trealose fosfato fosfohidrolase (EC 3.2.1.28) (Wiemken, 1990). Na Figura 2 encontra-se o esquema de biossíntese da trealose.

```

graph TD
    G1[GLICOSE] -- "ATP, hexoquinase" --> G6P1[GLICOSE-6-P]
    G6P1 -- "fosfoglucomutase" --> G1P[GLICOSE-1P]
    G1P -- "Mg+2, UTP, PPI" --> UDP_G[UDP-GLICOSE]
    UDP_G -- "pirofosforilase" --> UATP[UDP + ATP]
    UATP --> UADP[UTP + ADP]
    UADP --> UTP_PPI[UTP + PPI]
    UTP_PPI -- "Mg+2, Tre-6-P-sintetase" --> TRE6P[TREALOSE-6-P]
    TRE6P -- "Mg+2, trealose-6-P-fosfohidrolase (EC 3.2.1.28)" --> TREALOSE[TREALOSE]
    TRE6P -- "Pi" --> TREALOSE
  
```

18

Já é de conhecimento que na fase exponencial de crescimento de leveduras há um rápido acúmulo de trealose, em resposta ao estresse térmico. Alguns autores acreditam que esse acúmulo seria resultado de mudanças induzidas pela temperatura na atividade das enzimas que metabolizam a trealose (Hottiger *et al.*, 1987a; De Virgilio *et al.* 1991). Outros dizem ser uma consequência de aumento na concentração de substratos para a enzima Tre-6-P sintetase tais como UDP-Glicose e G-6-P. Neves & François (1992) discordam destes autores e propõem um outro mecanismo para o acúmulo, o qual está baseado em modificações das propriedades cinéticas da trealase e da Tre-6-P sintetase dependentes da temperatura. Estes autores chegaram a tal conclusão após terem observado que embora a Tre-6-P sintetase e trealase aumentaram suas atividades durante um choque térmico, cujo aumento era precedido por um período de latência de cerca de 10 min e inibido pela cicloheximida. Ao contrário, a síntese de trealose começou imediatamente após o choque térmico e não respondeu a esse inibidor de síntese protéica.

Wyatt (1967) descreveu um efeito, aparentemente, alostérico, da G-6-P e da trealose sobre a atividade da Tre-6-Psintetase em extrato bruto de insetos. Estas propriedades foram parcialmente perdidas durante a purificação.

Para Panek & Mattoon (1977) as mudanças na repressão do acúmulo de trealose em leveduras, não são consequências secundárias das mudanças na fosforilação oxidativa, o que foi confirmado pelos estudos com as leveduras *p*-mutante e linhagem BII. Estes resultados, considerados juntos, estabelecem que dois componentes do metabolismo energético da levedura, acúmulo de trealose e a biogêneses da mitocôndria, estão sujeitos ao controle independente de um sistema responsável pela concentração de glicose no meio. Essa demonstração abre a possibilidade de que a trealose pode proporcionar parte da energia necessária para a biogênese mitocondrial e/ou outras reações endergônicas durante a diauxia da fermentação por metabolismo oxidativo (Panek & Mattoon,

1977). As atividades das enzimas Tre-6-P sintetase e Tre-6-Pase em leveduras foram menores na fase exponencial de crescimento (François *et al.*, 1991).

Para sintetizar 1 mol de trealose da glicose são necessários 3 moles de ATP. Contudo nenhum ATP é produzido na hidrólise da trealose pela trealase. Portanto, um ciclo inútil poderia surgir durante a síntese e degradação da trealose (François *et al.*, 1991).

2.6. Situações que favorecem o acúmulo da trealose

Segundo Panek (1962) a trealose é sintetizada quando cessa a síntese de aminoácidos, uma vez que ocorre competição entre a trealose e aminoácidos por glicose-6-fosfato. Panek (1971) cita que as condições anaeróbias reduzem a quantidade de trealose acumulada pelas leveduras porque a energia produzida não permite o armazenamento da trealose. Porém Gutierrez (1990) conseguiu um acúmulo de trealose pela levedura em anaerobiose durante fermentação alcoólica, de 14,9% (expresso em g de glicose/100 g m.s.).

Para alguns autores, o acúmulo de trealose ocorre durante a fase estacionária do desenvolvimento das leveduras. Situações de limitação de nutrientes é a causa comum do acúmulo de trealose nas leveduras e outros fungos (Thevelein, 1984).

Durante o crescimento logarítmico de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio com glicose, o conteúdo intracelular de trealose é muito baixo. Sob condições de depleção de glicose do meio, as células de leveduras entram numa breve fase de crescimento retardado referido como diauxia (Panek & Mattoon, 1977), neste período há uma pausa na divisão celular, é um período de adaptação onde muitas enzimas precisam ser ativadas ou sintetizadas e o acúmulo de trealose ocorre antes, pois o etanol passará a ser oxidado. Estes autores observaram a síntese de trealose durante o crescimento aeróbio de leveduras com

limitação de N. Quando as células foram colocadas em meio de cultivo fresco, contendo glicose como fonte de carbono, a reserva de trealose permaneceu baixa durante o crescimento logarítmico.

Quando Hino *et al* (1990) realizaram um estudo acompanhando o nível de trealose e a taxa de sobrevivência de leveduras tolerantes ao congelamento “versus” leveduras sensíveis ao congelamento, observaram que nenhuma linhagem acumulou trealose na fase exponencial de crescimento. Na fase estacionária as linhagens FRI 413 e FRI 869 acumularam quantidades de trealose superiores às acumuladas pelas outras linhagens e a FRI 825, foi a que menos acumulou. As leveduras, na fase estacionária foram mais tolerantes ao congelamento que as da fase exponencial. A trealose foi o componente intracelular mais afetado pelas mudanças das condições ambientais. Quando as células foram descongeladas e reinoculadas em meio líquido fresco para fermentação em batelada, observou-se que a trealose não se acumulou antes da fase de crescimento e acumulou-se depois, alcançando um máximo na fase estacionária, e diminuindo com o aumento no número das células viáveis. Já em um outro estudo com fermentação de batelada repetida, o conteúdo de trealose e o número de células viáveis foram estreitamente relacionados durante a fase de crescimento (Ling *et al*, 1995).

Alcarde (1996) observou acúmulo de trealose endógena em leveduras (TA, IZ-1904, SA) devido a um tratamento térmico, onde passou a temperatura do meio de 26 para 45°C por duas horas. A trealose endógena da levedura TA passou, em média, de 0,85 para 6,33%, a da IZ-1904 de 0,64 para 5,15% e da SA de 0,81 para 6,24%.

Outros autores também obtiveram resultados semelhantes. Grba *et al.* (1975), Attfield (1987), Hottiger *et al.* (1987a, b, 1992), e Ribeiro *et al.* (1994) citam que, quando as células de leveduras são expostas a um tratamento térmico, há um acúmulo de trealose endógena nas células. Durante o crescimento exponencial em glicose a 28°C, as células de leveduras continham somente traços

de glicose e trealose. Primeiro porque a glicose é fosforilada imediatamente quando entra na célula, e segundo porque a trealase é encontrada predominantemente na sua forma fosforilada ativada e, a atividade do complexo Tre-6-P sintetase/Tre-6-P fosfatase é somente 20% da fase estacionária. Quando a temperatura das culturas foi levada a 40°C, a glicose e a trealose acumularam-se imediatamente com taxas de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de massa celular, enquanto a concentração de hexose-6-fosfato diminuiu ao redor de três vezes dentro de 10 min após a mudança. Após o choque térmico, voltando a temperatura de 27°C, o teor de glicose e trealose diminuíram para seus níveis iniciais (Neves & François, 1992).

Winkler *et al.* (1991) observaram que quando as leveduras (*S. cerevisiae* M1) eram cultivadas a 30°C e a temperatura foi alterada para 45°C por 20 min ou para 39°C por 40 min, a concentração de trealose aumentou 25 vezes. Os autores sugeriram que não foi a mudança da atividade enzimática, mas sim o aumento drástico das concentrações dos substratos para as enzimas Tre-6-P sintetase (UDP-glicose e G-6-P), ocorrendo durante o estresse de temperatura, que eram os responsáveis pelo aumento na concentração de trealose.

Condições de anaerobiose no cultivo de leveduras favorecem o acúmulo de trealose (Chester, 1963). As mudanças nos níveis de trealose estão associadas com uma melhor tolerância à dessecação e calor (Newman *et al.*, 1993).

Szopa *et al.* (1992) estudaram as propriedades de uma linhagem triplóide, H-3, de levedura de cerveja, ou seja, sua osmotolerância, fermentação da melibiose e a capacidade para aumentar o acúmulo de trealose. Então analisaram o efeito da limitação de nitrogênio e fosfato sobre o acúmulo de trealose, e chegaram à conclusão de que a linhagem triplóide acumulou mais trealose que sua linhagem parental F-5-diplóide, e que as condições que são consideradas ótimas para o crescimento de *S. cerevisiae* não estimulam o acúmulo de trealose,

mas sim quando o cultivo é limitado pela disponibilidade de nitrogênio e fonte de fosfato.

A única enzima responsável pela degradação da trealose, em leveduras do gênero *Saccharomyces*, segundo Panek *et al.* (1987), é a trealase (α,α -glucosideo-1-D-glicohidrolase, EC 3.3.3.28).

Células de *Saccharomyces cerevisiae* contêm duas trealases intracelulares e solúveis, localizadas diferentemente dentro da célula, uma no citossol e outra no vacúolo. A trealase neutra citossólica (NT), tem sido purificada e caracterizada por vários laboratórios e mostra ser ativada pela proteína AMPc-dependente de processos de fosforilação. O gene correspondente a esta enzima é o *NTH1* (Biswas & Ghosh, 1998). A atividade da trealase citossólica é alta em células sob crescimento exponencial em meio com açúcares fermentáveis e diminui rapidamente assim que a célula entra na fase estacionária, coincidindo com o início da biossíntese da trealose. A outra trealase, vacuolar (AT) é codificada pelo gene *ATH1* (Biswas & Ghosh, 1998). A trealase vacuolar foi somente detectada em células sob condições aeróbias (San-Miguel & Argüelles, 1994).

Chester (1963) estudou a fermentação de carboidratos que se acumulam nas leveduras de cerveja, durante o cultivo anaeróbio. O autor observou que houve um rápido desaparecimento do carboidrato de reserva, após o cultivo anaeróbio e supôs que um processo autolítico iniciou-se pela injúria das células durante o procedimento de lavagem, o qual foi logo descartado, uma vez que, a maioria das células depois de tratadas com azul de metileno permaneceu viável (97%). Sugeriu-se então que a decomposição do carboidrato poderia ter sido iniciada pelo contato com o oxigênio durante o procedimento do cultivo, o que foi aceito após agitar-se a cultura em seu próprio meio, com e sem aeração. A cultura sob aeração teve maior diminuição do carboidrato, então o autor concluiu que o oxigênio, durante o cultivo, iniciou a decomposição fermentativa dos carboidratos

de reserva, só que o mecanismo pelo qual o oxigênio estimulou o desaparecimento do carboidrato era desconhecido.

Foi observado que com o passar do tempo, grandes quantidades de trealose, presentes em leveduras comerciais de cervejaria, permanecem constantes se as células estão em inanição devido à incubação em água. E estas leveduras são conhecidas por conterem altas atividades de trealase, podendo fermentar a trealose adicionada ao meio. Quando ocorreu a ruptura das células induzidas por congelamento, dessecação ou envenenamento, ambas as trealoses endógena e exógena foram hidrolisadas muito rapidamente. A partir desta observação considerou-se a existência de um compartimento intracelular da trealase e outro de substrato na levedura (Myrbäck & Örtenblad, 1937; Avigad *et al.*, 1965 In Keller *et al.*, 1982). François *et al.* (1991) quando usaram xilose, ao invés de glicose, como fonte de energia, observaram que as leveduras consumiram trealose endógena numa taxa 2 a 3 vezes menor do que em presença de glicose. Esta baixa taxa de mobilização da trealose foi relacionada a uma baixa ativação da trealase.

Keller *et al.* (1982) trabalharam com protoplastos de *S. cerevisiae* e induziram a síntese de trealose simulando condições que as células encontram durante a fase lag de crescimento diauxico, para os protoplastos. Sob estas condições o conteúdo de trealose do protoplasto aumentou notavelmente durante os 30 primeiros minutos de incubação, alcançando ao redor de 60 mg por grama de proteína e esta quantidade diminuiu quando a atividade da trealase aumentou. A quantidade de proteína na suspensão de protoplasto permaneceu praticamente constante.

Para estes autores a localização da trealase em parede celular suporta o conceito da localização nos vacúolos porque ambos, o conteúdo dos vacúolos e o da parede celular, pertencem ao compartimento exoplasmático da célula e estão por isso relacionados. Também é desconhecido que trealose e trealase possam

coexistirem nos vacúolos. A trealose estaria localizada no citossol, o que sugere uma outra possível função da trealose em adição a de reserva energética, e os autores propõem que a trealose também tem papel na osmorregulação e como agente protetor para manter a estrutura das macromoléculas do citoplasma sob condições de estresse.

A enzima trealase tem sido encontrada em diferentes organismos, incluindo os que não estocam trealose, mas ingerem-na em suas dietas (Birch, 1963 In Panek, 1985).

Panek & Souza (1964) conseguiram uma purificação parcial da trealase de leveduras de cerveja e demonstraram sua especificidade com relação a trealose com um $K_m = 4 \times 10^{-4}$ M e um pH ótimo de 5,7.

Kelly & Catley (1976) purificaram a trealase 733 vezes, também de levedura de cervejaria, com 38% de recuperação. O pH ótimo foi de 5,5 e o $K_m = 5 \times 10^{-4}$ M, usando uma mistura contendo ATP- Mg^{2+} e AMP-cíclico. Dellamora-Ortiz *et al.* (1986) também purificaram a trealase não ativa de *S. cerevisiae*. A atividade enzimática mostrou especificidade absoluta com a trealose e um K_m aparente de $4,8 \times 10^{-3}$ M.

O pico da atividade da trealase coincidiu com um aumento da concentração do AMP-cíclico (Van der Plaats & Van Solinger, 1974). Yoshikawa *et al.* (1994) obtiveram atividade máxima da trealase, em leveduras, à temperatura de 45°C e a atividade foi perdida a 70°C.

Hottiger *et al.* (1987a) observaram que durante o acúmulo de trealose em *S. cerevisiae*, devido ao choque térmico, também houve alta taxa de degradação da trealose. Sabendo-se que a biossíntese de uma molécula de trealose a partir da glicose consome 3 moléculas de ATP, enquanto que nenhum ATP é produzido na hidrólise da trealose pela trealase, os autores concluíram que uma energia inútil é

consumida no ciclo entre trealose e glicose. Na hidrólise da trealose pela trealase (EC 3.2.1.18) forma-se dois monômeros de glicose (Wiemken, 1990).

Em condições de cultivo batelada alimentada sob intensa aeração, e à temperatura de 20°C, Gélinas *et al.* (1989) observaram que houve perda no conteúdo de trealose bem como uma queda na criotolerância das células de leveduras.

2.7. Fatores que inibem o acúmulo do glicogênio e da trealose

Quain *et al.* (1981) observaram diminuição no glicogênio solúvel em meio ácido de cerca de 40% para cerca de 6% em *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 240) durante as duas primeiras horas de fermentação e durante este período a absorção de oxigênio e açúcares do mosto não foram utilizados pela levedura, este catabolismo do glicogênio, segundo os autores, seria um reflexo do requerimento celular por carbono e energia, suficientes para estimular a elevação da carga energética da enzima adenilase e subsequente síntese de esteróis e ácidos graxos insaturados.

O AMP cíclico inibe a síntese de glicogênio e estimula a glicogenólise, uma vez que ativa a fosforilase para a quebra do glicogênio (Gutierrez, 1997).

Muitas substâncias são relatadas como inibidoras da síntese de glicogênio e da trealose, a seguir seguem alguns exemplos:

- Fluoreto: inibiu a formação de trealose nas leveduras (Trevelyan, 1958); fluoreto de sódio não inibiu em condições anaeróbias (Panek, 1962);
- Arseniato: inibiu a síntese de trealose e glicogênio (Trevelyan, 1958);
- Azida de sódio: inibiu a síntese de carboidratos em células de leveduras (Trevelyan & Harrison, 1952);

- 2,4-dinitrofenol: diminuiu o acúmulo de trealose e queda na viabilidade celular de *Saccharomyces* (Gutierrez, 1989). A trealose, segundo o autor, poderia ter sido diminuída devido à ativação da ATP-ase, que reduz os níveis de ATP e UTP necessários para a biossíntese da trealose;

- Ácido acético: diminuiu o teor de trealose sem declínio na viabilidade celular (Gutierrez *et al.*, 1991). O autor supõe que esta diminuição poderia ser devido à restrição à entrada de açúcar na célula de levedura, diminuindo assim o nível de G-6-P para a síntese de trealose;

- Ácido octanóico: inibiu a fermentação alcoólica em *S. cerevisiae* e o acúmulo de trealose, contudo não afetou a degradação endógena da trealose (Gutierrez, 1993). Esta inibição talvez tenha sido, segundo o autor, devido à ligação do ácido octanóico à hexoquinase ou outra proteína da membrana plasmática, uma vez que não são necessários para a fermentação endógena. A degradação da trealose poderia ser devido a uma ativação da trealase.

- Cicloheximida: este antibiótico provocou diminuição na concentração de trealose intracelular de *S. cerevisiae*, durante fermentação conduzida a 30°C (Slaughter & Nomura, 1992). A cicloheximida interfere com a síntese de proteína citoplasmática ao nível do polirribossomo.

- Biotina, vitamina essencial para *S. cerevisiae*, ao aumentar sua concentração no meio numa fermentação contínua, diminuíram os conteúdos de trealose e glicogênio. Com o aumento da concentração da biotina a atividade das enzimas piruvato carboxilase e isocitrato liase, que são dependentes de biotina, também aumentou (Pejin & Razmovski, 1996).

2.8. Métodos de detecção de glicogênio e trealose

Schulze *et al.* (1995) sugeriram um método para a determinação de ambos glicogênio e trealose na mesma amostra de leveduras. Utilizando-se um desintegrador mecânico de células, no qual ocorre a ruptura das células liberando assim os carboidratos endógenos, os quais são separados por centrifugação.

Sendo um método simples e rápido para fazer análises de trealose e glicogênio intracelular total, a hidrólise tanto do glicogênio como da trealose é realizada pelas enzimas amiloglucosidase e trealase, respectivamente. Posteriormente quantifica-se esses carboidratos pela quantidade de glicose formada. O método, segundo os autores, é específico, quantitativo e fácil e requer pouco volume de amostra. Esses autores dizem que o método de antrona, para trealose, não é específico, já que nem a extração, com ácido tricloroacético, nem a reação com reagente antrona é específica.

Quain (1981) descreveu 4 métodos para a determinação de glicogênio em leveduras: - o método de Trevelyan & Harrison (1956a), considerado não específico, envolve a extração do glicogênio em ácido e alcali, seguida pela avaliação da quantidade de hexose em cada fração usando o reagente de antrona; o método de Becker parece ser específico e consome menor tempo, envolve a hidrólise do glicogênio mediada pela amiloglucosidase em células digeridas com carbonato de sódio, seguida pela determinação enzimática da glicose liberada; os outros dois métodos derivam do método de Trevelyan & Harrison (1956a) e de Becker (1978).

Quain & Tubb (1983) também descreveram um método rápido e simples para a determinação do glicogênio em leveduras, onde uma solução aquosa de iodeto/iodeto de potássio cora as células de leveduras e a intensidade do corante é proporcional a quantidade de glicogênio presente nas leveduras, o nível de glicogênio pode ser medido quantitativamente através da absorbância, ou, aproximadamente, pelo exame visual da suspensão de iodo na levedura.

Um dos métodos mais tradicionais para a quantificação da trealose é o de Trevelyan & Harrison (1956a), onde a extração desse açúcar é realizada através de ácido tricloro acético (TCA) a frio e a hidrólise pelo método de antrona com ácido sulfúrico. Outros autores utilizaram este método, Gross & Watson (1996), Ferreira *et al.* (1997a), Krallish *et al.* (1997) e Stambuk *et al.* (1998) e vários outros (Chester, 1963; Lillie & Pringle, 1980; Hottiger *et al.*, 1987a e b, 1994; Coutinho *et*

al., 1988; Gállinas *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1990; Slaughter & Nomura, 1992; Argüeles, 1994) utilizaram e utilizam deste método, pelo menos para a extração da trealose. O glicogênio também foi detectado por este método por Chester (1963), Herbert *et al.* (1971); Patel & Ingledew (1973; 1975). Outros métodos têm sido utilizados, tanto para detecção de trealose como do glicogênio.

Para a hidrólise de glicogênio utilizam-se mais do método enzimático com a amiloglicosidade, Gunja-Smith *et al.* (1977); Becker (1978); Lillie & Pringle (1980); Rocha-Leão *et al.* (1984); Gutierrez & De Martin Orelli (1991); Silljé *et al.* (1997).

Outras metodologias também são descritas. A determinação da trealose via enzimática tem sido utilizada por Van Dijck *et al.*, 1995; Ferreira *et al.* (1997b); Parrou & François, 1997; Silljé *et al.*, 1997; Lee & Golberg, 1998.

Ferreira *et al.* (1997a) compararam três métodos diferentes para determinação de trealose em extratos de leveduras. Os autores utilizaram os métodos de reação de antrona, clivagem com a enzima trealase e o outro baseado em cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Cada método apresentou boa correlação entre os outros (HPLC x antrona = 0,97; HPLC x trealase = 0,98; antrona x trealase = 0,97; $p < 0,05$), porém quando o teste-t foi aplicado não foram encontradas diferenças significativas somente entre HPLC e trealase, sugerindo serem os melhores métodos.

Num outro trabalho, Chuanbin *et al.* (1998) realizaram a extração da trealose de *Saccharomyces cerevisiae* após serem tratadas com microondas, e a extração foi realizada com solução aquosa de etanol e quantificação por HPLC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Duas linhagens de leveduras comumente usadas para iniciar a fermentação alcoólica nas usinas de açúcar e álcool foram empregadas para o estudo. Foram elas *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2, isolada da Usina da Pedra e *S. cerevisiae*, SA-1, isolada da Usina Santa Adélia. Essas foram obtidas da Coleção de Cultura da Fermentec S/C Ltda (Piracicaba), em ampolas liofilizadas.

Durante os estudos as culturas foram mantidas em meio YEPD (ver anexo I) sob refrigeração a 4°C, após crescimento no mesmo meio por 24 horas a 32°C.

3.2. Multiplicação do fermento

Nos vários ensaios realizados fez-se o mesmo procedimento de multiplicação do fermento.

Inicialmente as leveduras foram inoculadas em 100 mL de meio YEPD com pH 6,5 - 7,0. Após o crescimento em meio YEPD, a 32°C, as leveduras foram transferidas para frascos Erlenmeyers contendo 1,5 L de meio de multiplicação: contendo mistura de sais (ver anexo I) juntamente com melaço proveniente da Usina Santo Alexandre e Santa Adélia, esterilizados (120°C/1atm) por 20 min. e ajustados a uma concentração de açúcares redutores totais (ART) de 6% (p/v). A incubação foi feita a 32°C, até o final da fermentação. Em seguida transferiu-se todo o meio com as leveduras para bombonas de fermentação com capacidade volumétrica de 25 L. Nesta fase, a multiplicação foi conduzida a temperatura ambiente, acrescentando-se 1,5 L do mesmo mosto (6% de ART) esterilizado para cada inóculo. Uma vez constatado o crescimento, agregava-se o dobro do volume

de mosto seguido de incubação por período necessário para o crescimento e assim sucessivamente até atingir-se o volume de 20 L. Esse volume era suficiente para realizar os testes de fermentação endógena.

3.3. Preparo das células

Antes da realização da fermentação endógena fez-se a fermentação prévia que tem como objetivo fazer com que a levedura aumente a concentração de seus carboidratos de reserva, glicogênio e trealose.

O meio utilizado para a fermentação prévia é chamado de mosto misto, que é composto por 70% de caldo de cana-de-açúcar fresca ajustado a 15% ART mais 30% de melaço também a 15% de ART. A fermentação prévia foi realizada com uma suspensão de fermento de 10% (p/v) e em incubadora a 32°C por aproximadamente 6 horas, tempo médio para o final da fermentação. Em seguida a suspensão foi centrifugada, e o teor alcoólico do vinho e a viabilidade celular determinados. Este fermento e vinho foram utilizados para estudo da fermentação endógena.

3.4. Fermentação endógena

Os ensaios de fermentação endógena foram conduzidos em suspensões de leveduras de cerca de 20% (p/v) em massa úmida no vinho com cerca de 3,0 a 4,5% (v/v) de álcool. A temperatura desejada era conseguida através de banho termostático Blue M Eletric Company modelo MW-1120A-1 e Fanem Ltda modelo 102/6.

Os seguintes tratamentos foram conduzidos para o estudo da fermentação endógena:

- Temperatura constante de 40°C e amostragens em intervalos de tempo até o máximo de 48 horas.

- Temperaturas constantes de incubação, fixadas em 38; 40; 42 e 44°C e amostragens em tempos preestabelecidos.

- Tratamento com choque térmico conduzido a 40°C por período de 4 e 6 horas seguido da inoculação a 33°C. As amostragens foram conduzidas também em intervalos preestabelecidos.

- Teste do sulfito no tratamento térmico. Foram feitos testes agregando sulfito de sódio (NaHSO₃) à concentração de 200; 256 e 400 ppm para esse estudo. A incubação foi conduzida a 40°C.

3.5. Obtenção de Dados

Para a produção dos dados nos diferentes tratamentos e em cada tempo, as amostragens foram realizadas de acordo com o planejamento mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento para a obtenção de dados das amostragens realizadas nos diferentes tempos.

VARIÁVEIS	VOLUME (mL)	REPETIÇÃO	VOLUME TOTAL (mL)
Etanol	25	2	50
Teor de Fermento			
Teor de Matéria Seca			
Nitrogênio no vinho e fermento Glicerol	10	2	20
Glicogênio	4	2	8
Trealose			
Viabilidade celular	1	2	2
Total	40		80

3.6. Análise de Dados

A variabilidade dos dados foi realizada através da análise de variância, pelo teste F. Os dados foram ajustados aos modelos de equações de acordo com os melhores valores de coeficientes obtidos. As análises foram processadas utilizando-se o programa “JMP – SAS” (*System Analysis Statistic*).

3.7. Métodos Analíticos

As amostras obtidas durante a fermentação endógena foram utilizadas para obter os seguintes parâmetros: pH, percentual de células vivas, teor de etanol, teor de levedura, matéria seca, glicerol, nitrogênio (proteína), glicogênio, trealose.

- pH da suspensão determinado através de um pHmetro digital modelo 601 da Orion Research;

- Viabilidade celular (% de células vivas), foi realizada através da coloração diferencial com uma solução do corante eritrosina e contagem de células (vivas e mortas) por microscópio ótico com objetiva de imersão (100x), através de câmara de Neubauer (Oliveira *et al.*, 1996).

O resultado foi expresso em percentual de células vivas calculadas da seguinte forma:

$$\% CV = \frac{CV}{CT} \times 100$$

onde: CV = N^o de células vivas

CT = N^o total de células contadas.

- Teor de etanol no vinho. Uma amostra de 25 mL foi destilada em um microdestilador Kjeldahl, recolhendo-se o destilado de 50 mL. O grau alcoólico do destilado foi determinado em um densímetro digital Anton-Paar DMA-48 (Zago *et al.*, 1996). O resultado foi expresso em g de etanol por 100 mL do vinho, calculado da seguinte forma:

$$\% \text{ de etanol} = 2 \times n \times d$$

onde n = valor da leitura obtida no densímetro

d = densidade do etanol (0,7889 g/100mL)

- Teor de levedura. Foi determinado centrifugando-se 10 mL da amostra em centrífuga Excelsa Baby da Fanem a 700 G ou 3000 rpm por 5 minutos. O precipitado (depois da retirada do sobrenadante) foi pesado em balança de precisão Modelo PC - série y 1413. O resultado foi expresso em g de massa úmida em 100 mL de suspensão.

- Teor de matéria seca. Foi realizado através de secagem da massa decantada no item Teor de levedura em estufa a 105-110°C até obtenção de peso constante. O resultado foi expresso em percentual de massa seca em massa de levedura úmida:

$$\%m.s. = \frac{m.s.}{m.u.} \times 100$$

- Teor de glicerol no vinho. Da amostra de 10 mL que foi centrifugada no item Teor de levedura obteve-se o vinho delevurado (sobrenadante), o qual foi diluído 500x em balão volumétrico. Retirou-se 20 mL dessa solução e transferiu-se para outro balão volumétrico de 100 mL e também se acrescentou 1 mL de glicosamina (1000 ppm) que é o padrão interno. Injetou-se 1 mL dessa solução no Cromatógrafo Líquido de Alta Pressão (DIONEX), o qual é acoplado a um microcomputador com o software que tem o programa para as análises das leituras das amostras e impressões. Os resultados foram expressos em g de

glicerol/100 mL de vinho. Os cálculos são baseados em relação à área obtida da curva - padrão de glicerol e glicosamina com 20 ppm que também foram injetados no cromatógrafo.

- Teor de nitrogênio total. Tanto para o vinho como para a levedura, foi analisado através do método de Kjeldahl, onde as amostras foram digeridas num blocodigestor à temperatura de 350° C por 4 horas. Posteriormente à digestão fez-se a destilação da amostra com hidróxido de sódio (45%), que foi recebida numa solução de ácido bórico com mistura indicadora composta por vermelho de metila e verde de bromocresol, seguindo-se então para a titulação da amostra com ácido sulfúrico padronizado (Zago *et al.*, 1996). O teor de proteína foi calculado multiplicando o teor de nitrogênio por 6,25. Os resultados foram expressos em g/100 mL para amostra de vinho e g/100 g de matéria seca para amostra da levedura.

- Teor de glicogênio. Utilizou-se 4mL da suspensão de fermento que foram centrifugados e lavados com água, e ajustados a uma suspensão celular de 12% (p/v). Desta suspensão utilizou-se 0,5mL para a extração do glicogênio, o que corresponde a 15 mg da matéria seca ou 60 mg da matéria úmida. Para a análise do glicogênio utilizou-se o método de Becker (1978) adaptado por Rocha Leão *et al.* (1984). Inicialmente efetuou-se a digestão alcalina com carbonato de sódio (Na_2CO_3 - 0,25M) a 100°C (90 min), seguida de hidrólise a 37°C e pH 4,8 com a enzima amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) de *Rhizopus sp* (Sigma N° A-7255). A quantificação da glicose liberada do glicogênio foi feita com glicose oxidase, peroxidase, ortodianisidina e ácido clorídrico, a 30° C por 40 min e pH 6,0, e efetuando-se a leitura em um espectrofotômetro a 525 nm (Spectronic 88 Bausch & Lomb). O resultado foi expresso em g de glicogênio em 100g de matéria seca de levedura.

- Teor de trealose. Utilizou-se 4mL da suspensão de fermento que foram centrifugados e lavados com água, e ajustados a uma suspensão celular de 12%

(p/v). Para analisar o teor de trealose, fez-se a extração com ácido tricloroacético (TCA 0,5M) a frio (Trevelyan & Harrison, 1956a, 1956b) e a determinação da trealose pelo método de antrona (Brin, 1966). A leitura foi realizada em colorímetro Klett a 620 nm. O resultado foi expresso em g de trealose em 100g de matéria seca de levedura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cinética da Degradação do Glicogênio e da Trealose

As Figuras 1 e 2 mostram o resultado da degradação dos carboidratos, trealose e glicogênio quando as células de levedura, *Sacharomyces cerevisiae* PE-2 e *S. cerevisiae* SA-1, foram submetidas a tratamento a 40°C . Como pode ser visto a velocidade da degradação é maior na fase inicial, tornando-se menor com o tempo.

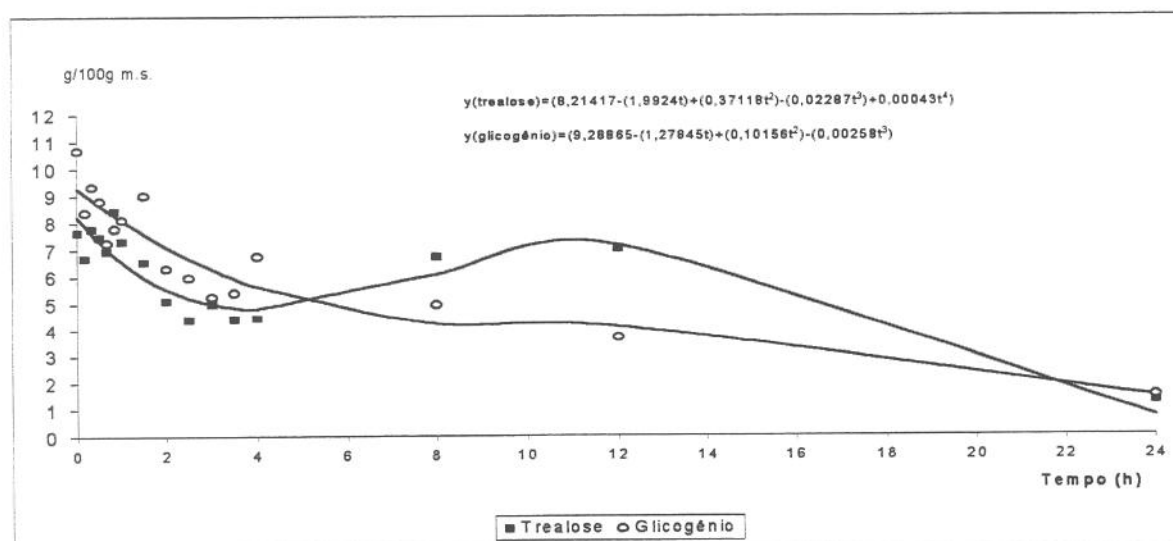


Figura 1. Valores percentuais de trealose e glicogênio (g/100g de massa seca) da levedura PE-2 submetida a 40° C.

Esse fenômeno de degradação dos carboidratos de reserva foi detectado, também, na situação usual de fermentação alcoólica nas usinas. Durante a fermentação alcoólica em batelada, glicogênio e trealose são intensamente metabolizados, os teores destes sofrem diminuição abrupta na primeira hora de fermentação sendo recompostos no transcorrer do processo fermentativo (Basso & Amorim, 1988). Também, foram observadas que atividades das enzimas

trealose sintetase e trealase aumentavam com a elevação da temperatura (Hottiger *et al.*, 1993).

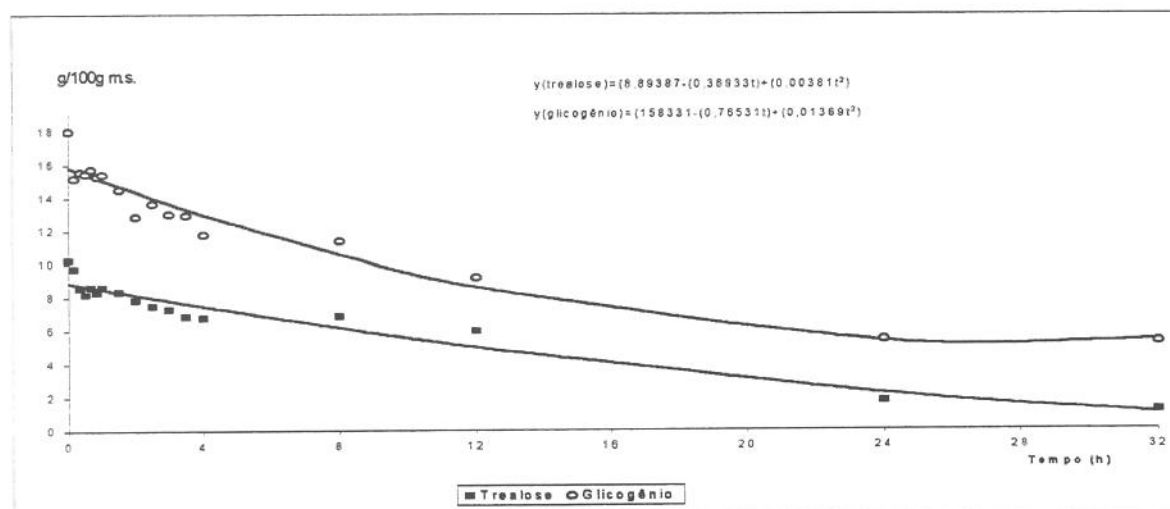


Figura 2. Valores percentuais de trealose e glicogênio (g/100g de massa seca) da levedura SA-1, submetida a 40° C.

Se o logaritmo da concentração de carboidratos for locado em função do tempo, tem-se uma linha muito próxima a reta (ver Figuras 3 e 4). Isso mostra que a cinética da degradação segue a equação de primeira ordem, indicando que a sua velocidade é uma função exclusiva da concentração de carboidratos presentes na célula.

Assim sendo, a degradação de carboidratos na célula por tratamento térmico pode ser expressa pela seguinte equação:

$$\frac{dx}{dt} = -kx \quad (1)$$

onde: x = concentração de carboidrato na célula (glicogênio ou trealose)

k = constante específica de degradação

t = tempo

Rearranjo da equação (1), tem-se

$$\frac{dx}{x} = -kdt \quad (2)$$

Integrando, essa equação (2) no intervalo de tempo entre t_0 e t_1 e a concentração de carboidrato entre x_0 e x_1 , pode-se obter o valor da constante específica de degradação (k).

$$k = \frac{\ln(x_0 / x_1)}{t_0 - t_1} \quad \text{ou} \quad k = 2,303 \frac{\log(x_0 / x_1)}{t_0 - t_1} \quad (3)$$

Os valores de k a 40° C obtidos para as leveduras em questão estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores da constante específica de degradação (k) da trealose e glicogênio nas leveduras *S. cerevisiae* PE-2 e *S. cerevisiae* SA-1, a 40° C.

Levedura	k (h ⁻¹)	
	Trealose	Glicogênio
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	0,0649 (35,5)*	0,0746 (30,9)
<i>S. cerevisiae</i> SA-1	0,0649 (35,5)	0,0387 (59,5)

* Valores entre parênteses indicam o tempo, em horas, necessário para se obter 90% de degradação

Esses valores variaram entre 0,0387 a 0,0746 h⁻¹, o que significa que são necessários de 30 a 60 horas de incubação para se conseguir 90% de degradação. A redução do teor de trealose e glicogênio na fábrica de levedura seca (proteína unicelular) é altamente desejável por incrementar relativamente o teor de proteína no produto final. Além disso, parte dos carboidratos é transformada em etanol, aumentando o rendimento fermentativo do sistema.

Amorim & Basso (1991) realizaram um processo que busca incrementar o teor protéico da levedura removida no final da fermentação. Tal processo resultou em uma patente, de propriedade da Universidade de São Paulo. O processo é atualmente empregado em diversas unidades industriais de açúcar e álcool e destilarias que efetuam a remoção rotineira de parte da levedura (sangria) do processo fermentativo. Este processo baseia-se na fermentação das reservas de carboidratos através da fermentação endógena da levedura mediante um tratamento térmico estressante. A degradação anaeróbia desses carboidratos resulta em produção adicional de etanol, que é recuperado e ao mesmo tempo permite aumento relativo no teor de proteína da levedura, valorizando tal subproduto.

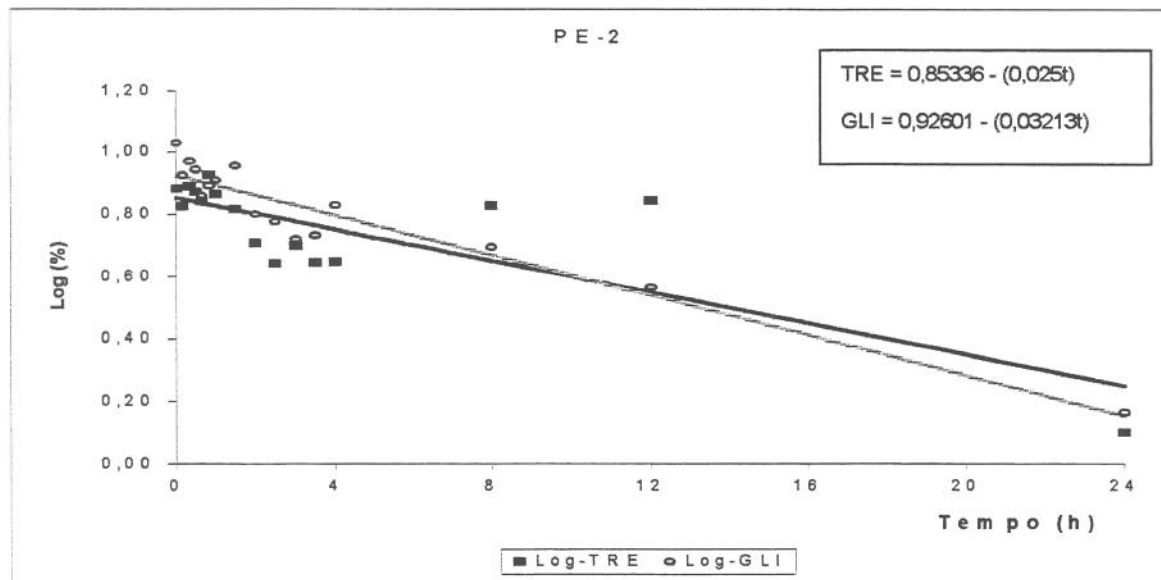


Figura 3. Valores do logaritmo percentual de trealose e glicogênio (g/100g de massa seca) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 submetida a 40° C.

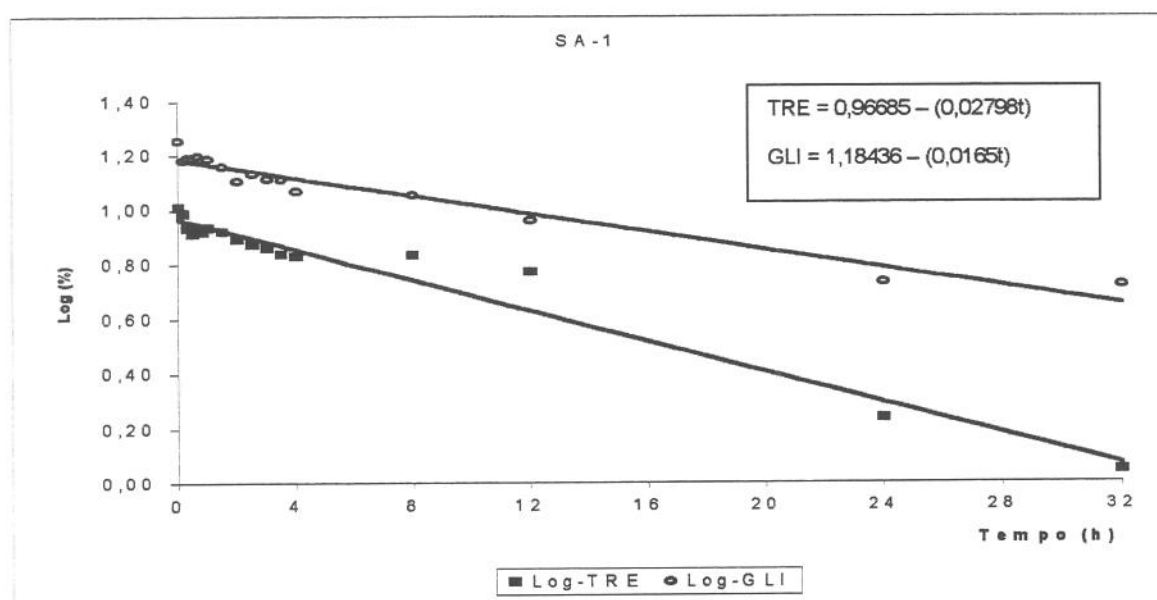


Figura 4. Valores do logaritmo percentual de trealose e glicogênio (g/100g de massa seca) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, SA-1, submetida a 40° C.

4.2. Variação de outros parâmetros durante a incubação a 40°C

A variação de diversos parâmetros da suspensão de levedura durante a incubação a 40° C pode ser representada pela equação de 2° grau, exceto para o teor de fermento e de carboidratos, (Figuras 5 a 8). A análise estatística desses dados está apresentada no anexo III.

Nesse período houve diminuição nos seguintes parâmetros: (1) viabilidade; (2) massa seca de fermento; (3) massa úmida de fermento; e (4) carboidratos da célula (glicogênio e trealose). Por outro lado houve incremento dos seguintes parâmetros: (1) proteína no fermento; (2) etanol no vinho; (3) glicerol no vinho e (4) proteína no vinho.

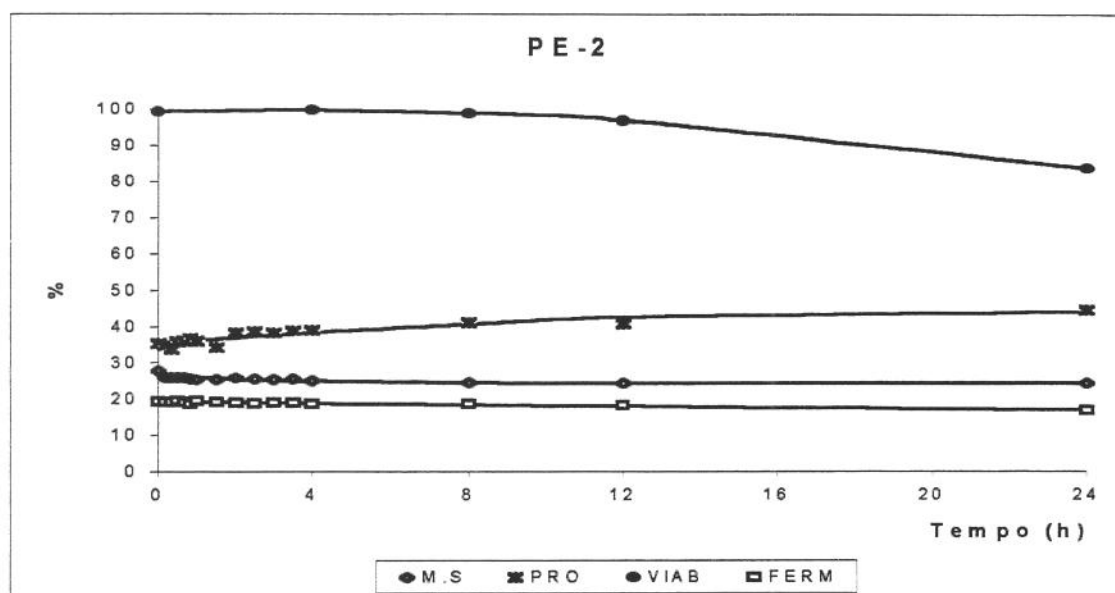


Figura 5. Valores percentuais de massa seca (M.S), proteína (PRO), fermento úmido (FERM) e viabilidade celular (VIAB) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sob fermentação endógena a 40°C.

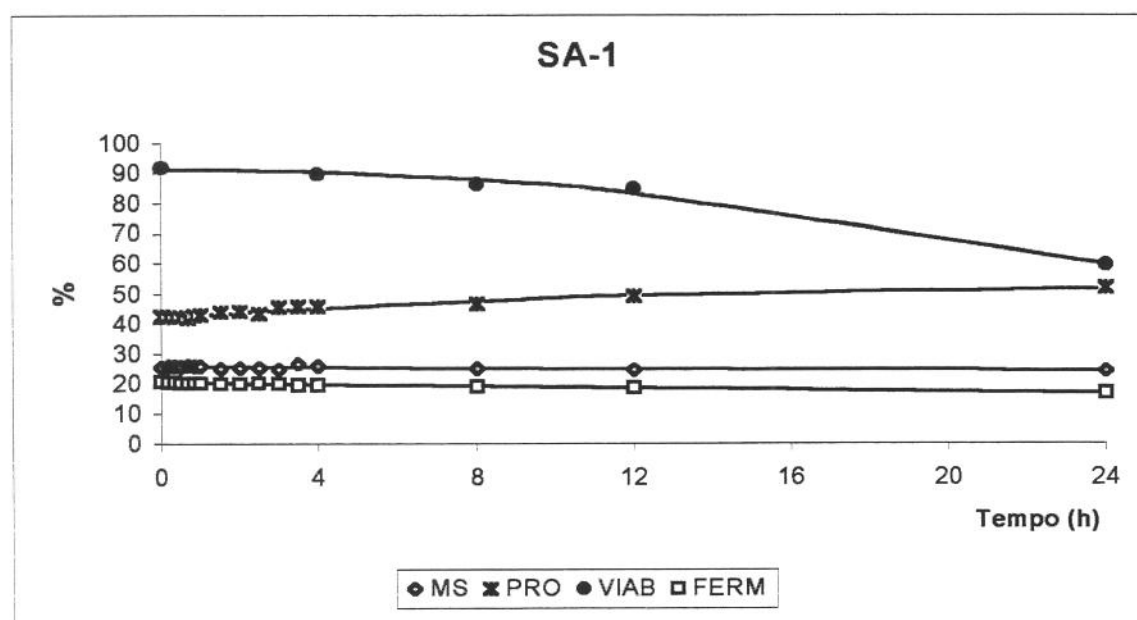


Figura 6. Valores percentuais de massa seca (M.S), proteína (PRO), viabilidade celular (VIAB), fermento úmido (FERM) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SA-1, sob fermentação endógena a 40°C.

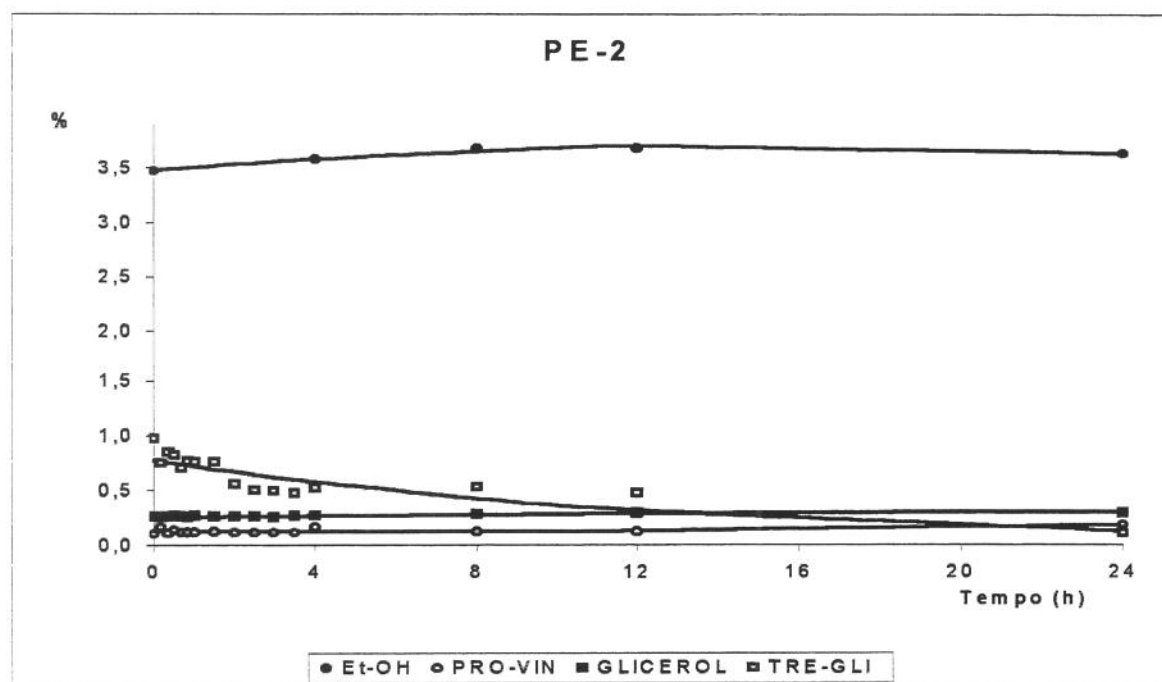


Figura 7. Valores percentuais de etanol (Et-OH) (g/100mL vinho), proteína (PRO-VIN) e glicerol no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE – GLI)] na massa seca da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sob fermentação endógena a 40° C.

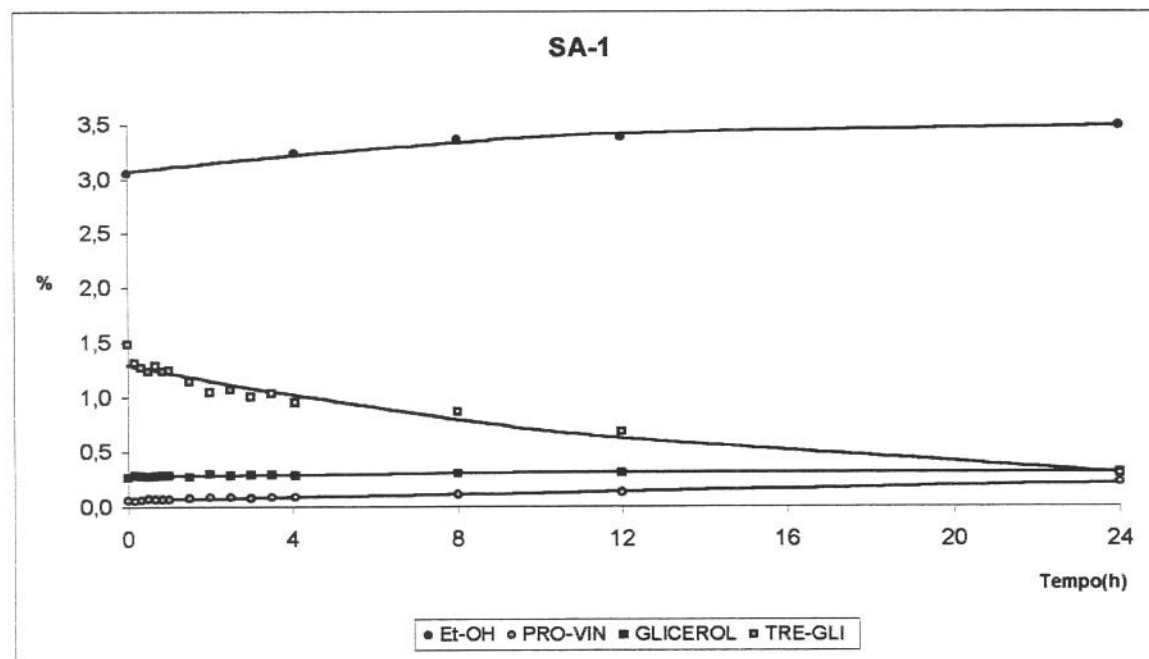


Figura 8. Valores percentuais de etanol (Et-OH) (g/100mL vinho), proteína (PRO-VIN) e glicerol no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE – GLI)] na massa seca da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SA-1, sob fermentação endógena a 40° C.

Considerando a variação desses parâmetros durante as primeiras 24 horas de incubação a 40° C, temos os valores apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores dos parâmetros obtidos pelas equações das curvas apresentadas nas Figuras 5, 6, 7 e 8 (calculadas usando as respectivas equações do anexo III).

<i>S. cerevisiae</i> PE-2				
Parâmetros	Unidade	0 h	24 h	Variação no período
Proteína no fermento	g/100 g m.seca	35,27	44,20	+ 8,93
Viabilidade	% (n° / n°)	99,3	83,9	-15,4
Massa úmida no fermento	g/100 mL vinho	19,19	16,84	-2,35
Massa seca	g/100g m.úmida	26,38	24,44	-1,94
Trealose + Glicogênio	g/100 g m. seca	15,63	0,00	-15,63
Trealose + Glicogênio	g/100 mL vinho	0,770	0,130	+0,640
Etanol	g/100 mL vinho	3,47	3,64	+ 0,17
Proteína no vinho	g/100 mL vinho	0,13	0,19	+ 0,06
Glicerol	g/100 mL vinho	0,259	0,302	+ 0,043
<i>S. cerevisiae</i> SA-1				
Proteína no fermento	g/100 g m.seca	42,29	51,82	+ 9,53
Viabilidade	% (n° / n°)	91,33	59,82	- 31,51
Massa úmida no fermento	g/100 mL vinho	20,40	16,97	- 3,43
Massa seca	g/100g m.úmida	25,80	24,24	- 1,56
Trealose + Glicogênio	g/100 g m. seca	24,76	7,45	-17,31
Trealose + Glicogênio	g/100 mL vinho	1,300	0,001	+ 1,299
Etanol	g/100 mL vinho	3,07	3,49	+ 0,42
Proteína no vinho	g/100 mL vinho	0,063	0,213	+ 0,149
Glicerol	g/100 mL vinho	0,277	0,309	+ 0,032

Como pode ser visto na Tabela 2, o incremento da proteína no fermento foi de cerca de 9,0 g/100g de proteína seca. A perda da proteína para o vinho foi de 0,06 e 0,149 g/100 mL para as leveduras PE-2 e SA-1 respectivamente, mostrando

que é bastante baixa. A percentual de proteína perdida (ΔPE) em relação àquela nas células de fermento pode ser calculada da seguinte forma:

$$\Delta PE = \Delta PV / \left(\frac{\%PF}{100} \times \frac{m.s. \times m.u.}{100} \right)$$

ΔPE = percentual de proteína perdida (g/100g proteína da célula) entre t_{24} e t_0h .

ΔPV = aumento no teor de proteína no vinho (g/100 mL de vinho) t_{24} e t_0h .

%PF = teor de proteína no fermento (g/100g m.s.) no t_0h .

m.s. = teor de biomassa seca (g/100g de m.u.) no t_0h .

m.u. = teor de biomassa úmida (g/100 mL de vinho) no t_0h .

Para a levedura PE-2, temos:

$$\Delta PE = 0,06 / \left(\frac{35,27}{100} \times \frac{26,38 \times 19,19}{100} \right)$$

$$\Delta PE = 3,35 \text{ (g/100g de proteína da célula)}$$

O mesmo cálculo feito para a SA-1, temos:

$$\Delta PE = 6,69 \text{ (g/100g de proteína da célula)}$$

Os resultados mostram que a perda de proteína durante o tratamento térmico a 40° C por 24 horas é por volta de 5% da proteína contida no fermento, o que é aceitável em vista do incremento obtido do seu teor no fermento.

A diminuição do teor de carboidratos durante o tratamento térmico é significativa. No caso da levedura PE-2, isso corresponde a $(15,63/15,63) \times 100 =$

100,0% do total de carboidratos na levedura e no caso da levedura SA-1, que o valor é $(17,31/24,76) \times 100 = 69,91\%$. Isso significa que a maior parte da perda de massa celular durante o tratamento é devido à hidrólise do carboidrato de reserva. O restante da perda seria pela redução do teor de proteína, glicerol, sais, ácidos e outros componentes celulares.

O carboidrato hidrolisado da reserva pode ser transformado em álcool etílico e gás carbônico pelas enzimas das células de levedura (Chester, 1959, 1963; Brady *et al*, 1961; Basso *et al*, 1993). Desde que a hidrólise do glicogênio resulta em 1,1 ART (açúcares redutores totais) e da trealose em 1,05 ART, podemos assumir para o presente caso o valor médio de 1,075 ART para cada grama de carboidrato hidrolisado.

Assim, a quantidade de ART acrescentado no sistema por mL de vinho é dada pela equação:

$$\Delta \text{ ART} = 1,075 \times (\Delta \text{ CH})$$

onde: $\Delta \text{ ART}$ = acréscimo de ART no sistema (g/100mL)

$\Delta \text{ CH}$ = carboidrato hidrolisado no sistema (g/100mL)

Para a levedura PE-2 fica:

$$\Delta \text{ ART} = 1,075 \times (0,640)$$

$$\Delta \text{ ART} = 0,688 \text{ g/100mL}$$

Para a levedura SA-1 fica:

$$\Delta \text{ ART} = 1,3964 \text{ g/100mL}$$

Desde que 1 g de ART nos fornece 0,51g de etanol, seria possível então, obter teoricamente os seguintes incrementos de etanol no sistema (assumindo 100% de rendimento):

Para a levedura PE-2: 0,3508 g/100mL e

SA-1: 0,7122 g/100mL.

Os valores de etanol determinados experimentalmente foram 0,17 e 0,42% (g/100 mL) de etanol respectivamente, para as leveduras PE-2 e SA-1. Portanto o rendimento na conversão foi de 48,46 e 58,97%, respectivamente. Essa baixa conversão pode ser atribuída à formação de outros compostos intermediários da fermentação como, glicerol e ácidos orgânicos, uma vez que as condições fermentativas não foram as ideais, além da perda de etanol por evaporação.

4.3. Degradação do glicogênio e trealose a diferentes temperaturas

A Tabela 3 mostra a constante específica de degradação da trealose e do glicogênio, nas células de levedura submetidas a 38°, 40°, 42° e 44°C.

Tabela 3. Valores da constante específica de degradação (k) (h^{-1}) dos carboidratos endógenos trealose (TRE) e glicogênio (GLI) das linhagens de *S. cerevisiae* PE-2 e SA-1, quando submetidas a diferentes temperaturas.

$1/T \times 10^3$	Temperatura		PE-2				SA-1			
			TRE		GLI		TRE		GLI	
	° C	° K	k	$\text{Ln}(k \cdot 10^3)$	k	$\text{Ln}(k \cdot 10^3)$	k	$\text{Ln}(k \cdot 10^3)$	k	$\text{Ln}(k \cdot 10^3)$
3,2138	38	311,16	0,0243	3,19	0,0412	3,72	0,0396	3,68	0,0360	3,58
3,1932	40	313,16	0,0291	3,37	0,0459	3,83	0,0239	3,17	0,0334	3,51
3,1730	42	315,16	0,1580	5,06	0,1380	4,93	0,1670	5,12	0,1540	5,04
3,1530	44	317,16	0,2030	5,31	0,2650	5,58	0,2300	5,44	0,1500	5,01

Nas temperaturas de 42° e 44°C, somente a fase inicial da curva foi considerada na obtenção da constante específica da degradação do glicogênio, uma vez que havia desvio considerável após 8 (PE-2 e SA-1); 4 (PE-2) e 12 horas (SA-1) de tratamento (ver Figuras 9, 10, 11 e 12). Essa redução na velocidade de degradação do glicogênio, após algumas horas de incubação mostra que o sistema, talvez enzima, é relativamente termolábil, o que não é o caso do sistema de degradação da trealose. Neste último a curva de degradação manteve-se exponencial em todas as temperaturas testadas.

Uma importância prática desses resultados é a de que a temperatura de incubação não deve ser igual ou superior a 42°C, se se deseja reduzir ao máximo o teor de carboidratos da célula, pois a degradação de glicogênio cessará após certo período de tratamento. Por outro lado à temperatura de 38°C o valor da constante específica de degradação (k) é baixa, indicando a necessidade de maior tempo para se conseguir degradação desejada. Assim, do ponto de vista prático, a temperatura ótima de tratamento deve ser ao redor de 40°C.

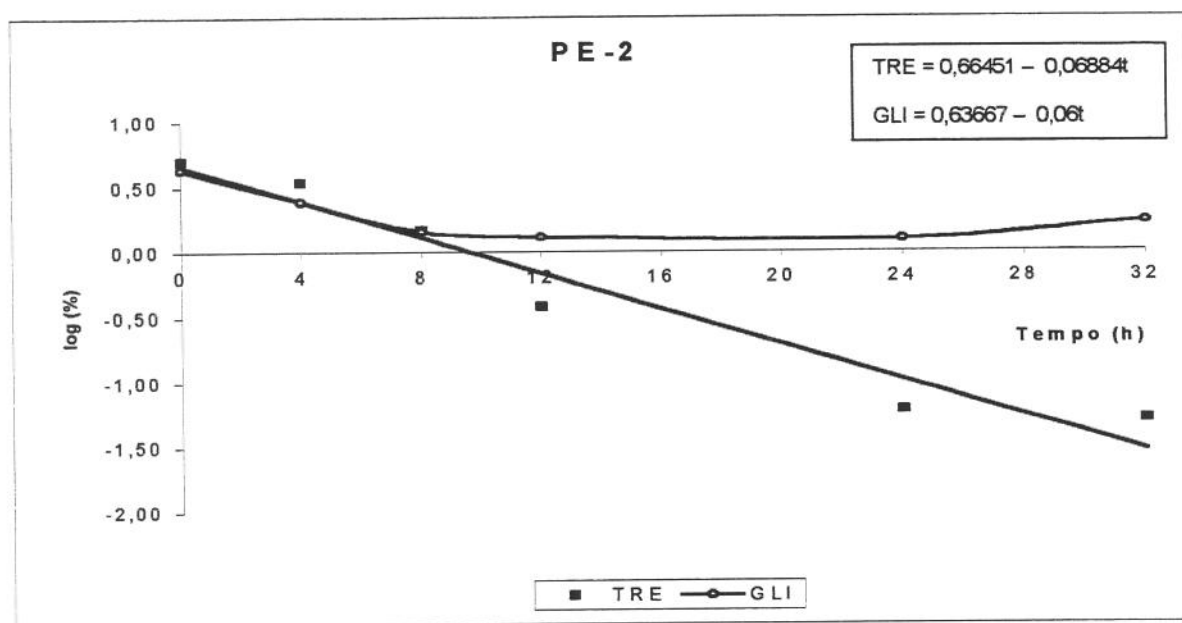


Figura 9. Valores do logaritmo percentual (g/100g de m.s.) de trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 quando submetida à fermentação endógena a 42°C.

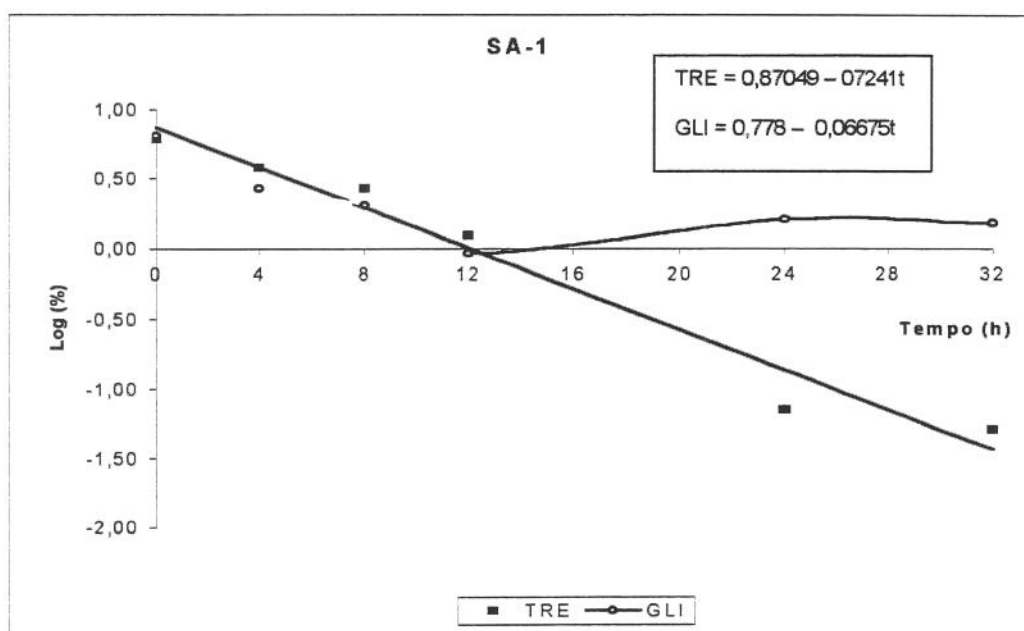


Figura 10. Valores do logaritmo percentual (g/100g de m.s.) de trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SA-1 quando submetida à fermentação endógena a 42°C.

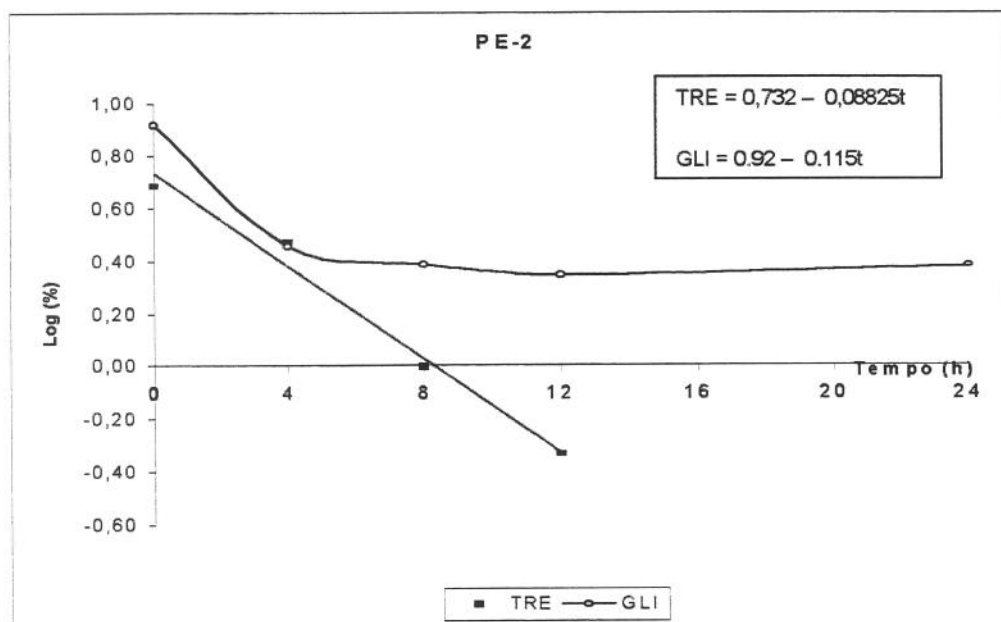


Figura 11. Valores do logaritmo percentual (g/100g de m.s.) de trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 quando submetida à fermentação endógena a 44°C.

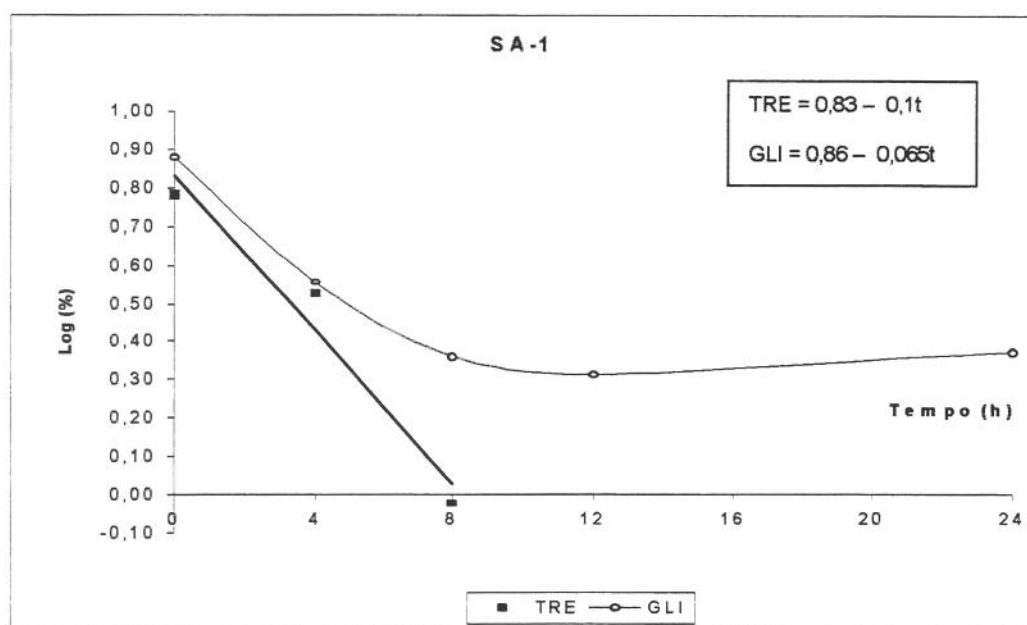


Figura 12. Valores do logaritmo percentual (g/100g de m.s.) de trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SA-1 quando submetida à fermentação endógena a 44°C.

O gráfico de Arrhenius (Moore, 1964) aplicado a esses resultados mostra que a reação não é linear nesse intervalo de temperatura (Figura 13). O incremento maior na velocidade de reação ocorreu entre 40° e 42° C, sendo menor tanto acima como abaixo deste intervalo. No intervalo de maior incremento (40° e 42°C), temos os seguintes valores para energia de ativação (ΔE):

Tabela 4. Valores de energia de ativação ($\text{kcal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) para degradar trealose e glicogênio no intervalo de temperatura de 40° a 42°C.

LEVEDURA	TREALOSE	GLICOGÊNIO
<i>S. cerevisiae</i> – PE-2	165,90	107,94
<i>S. cerevisiae</i> – SA-1	190,64	149,87

A equação de Arrhenius é:

$$k = A \times e^{-\frac{\Delta E}{RT}} \quad (4)$$

k = constante específica de degradação

A = fator de frequência

ΔE = energia de ativação

R = constante dos gases ($1,98717 \text{ cal} \cdot ^\circ\text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T = temperatura absoluta ($^\circ\text{K}$).

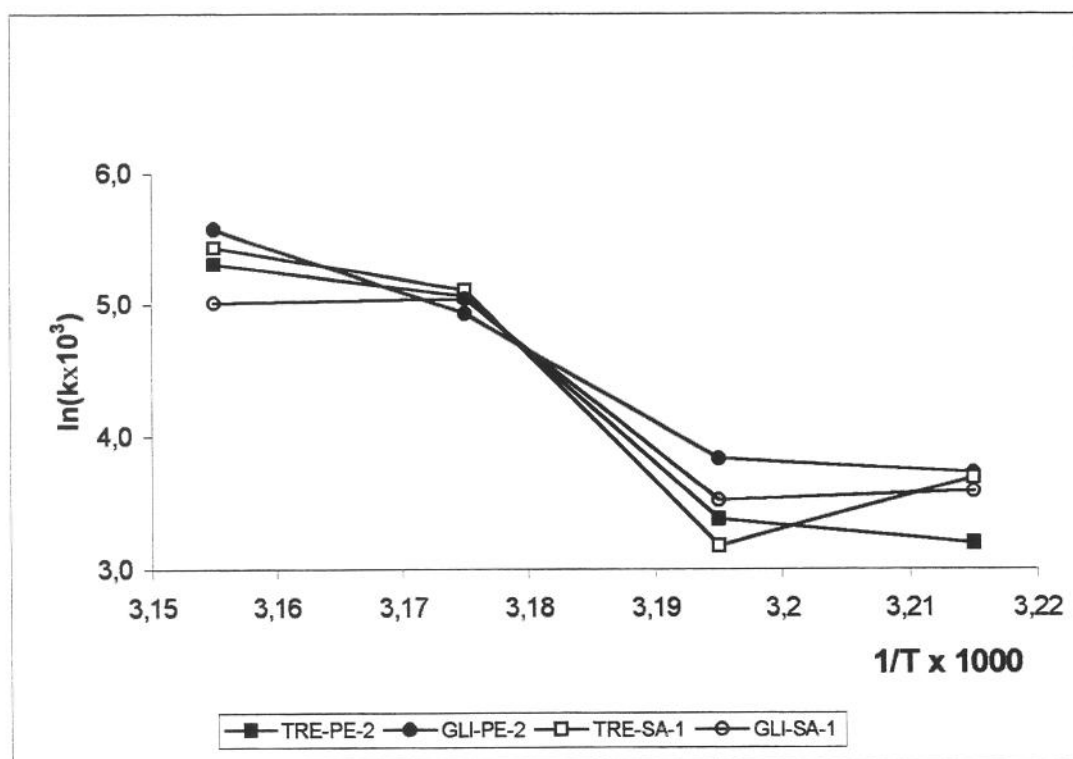


Figura 13. Valores das constantes específicas de degradação (k) (h^{-1}) dos carboidratos, trealose e glicogênio, das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *S. cerevisiae* SA-1 quando submetidas à fermentação endógena nas temperaturas de 38° , 40° , 42° e 44°C . Valores aplicados à equação de Arrhenius.

Os valores de energia de ativação (ΔE) apresentados na Tabela 4 mostram que a reação está bem acima da faixa normal de reações enzimáticas (10 a 15 kcal. $^{\circ}\text{K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) (Fruton & Simmonds, 1960). Isso pode ser devido à complexidade das reações envolvidas, com participação dos processos de degradação e síntese de forma simultânea. O processo de degradação da trealose é comandado pela enzima trealase (Thevelein, 1984) e do glicogênio por duas enzimas: glicogênio fosforilase (EC 2.4.1.1) e a enzima desramificadora do glicogênio (Voet & Voet, 1995). O processo de síntese da trealose é comandado pelas enzimas trealose sintetase e trealose fosfatase, já para o glicogênio temos as enzimas glicogênio sintetase (EC 2.4.1.11) e enzima ramificadora (EC 2.4.1.18) [(amilo-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-transglicosidase], que de certa forma é estimulada pelo incremento de temperatura (Neves & François, 1992; Londesborough & Vuorio, 1993; Parrou *et al.*, 1997). Além do elevado valor da energia de ativação, que talvez seja o motivo do desvio da linearidade na temperatura de 38°C (311,16° K), em temperatura superior a 42° C (315,16° K) o fenômeno de inativação térmica das enzimas pode ser o principal responsável pelo desvio da linearidade.

4.4. Aplicação do choque térmico para degradação de glicogênio e trealose.

Na indústria sucro-alcooleira, a manutenção de temperatura ao redor de 40° C durante 30 a 60 horas, exigida para se conseguir a degradação desejada de glicogênio e trealose (90%), envolve custo considerável uma vez que há necessidade de se empregar tanque isotérmico ou aquecimento térmico da suspensão celular através do trocador de calor para manutenção da temperatura. Seria conveniente, que o processo pudesse ser realizado sem a necessidade de manutenção da temperatura, uma vez que se tenha iniciado o mecanismo de degradação dos carboidratos pelo choque inicial.

Para verificar a possibilidade dessa prática conduziu-se o ensaio com choque de temperatura por 4 e 6 horas a 40° C, seguido de incubação a 33° C, que seria a temperatura média da suspensão celular posta em tanque comum. Para esse ensaio foi usado a *S. cerevisiae* PE-2. Os resultados da Tabela 5 mostram que a velocidade de degradação desse sistema é cerca da metade do processo isotérmico a 40°C (ver Tabela 3). Isso indica que, na prática, é recomendado que após o tratamento térmico (40°C), seja feito esforços para que a temperatura se mantenha o mais constante possível durante todo o período de incubação.

Tabela 5: Valores da constante específica de degradação (k) (h^{-1}) dos carboidratos trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da linhagem de *S. cerevisiae* PE-2, quando submetida a choque térmico.

Choque Térmico	TRE	GLI
(1)	0,0145	0,0284
(2)	—	0,0430

(1) = 4 horas a 40° C seguido de incubação a 33° C

(2) = 6 horas a 40° C seguido de incubação a 33° C

4.5. Aplicação de sulfito (NaHSO_3) para degradação de glicogênio e trealose

As Tabelas 6, 7, e 8 do anexo II apresentam os resultados das fermentações endógenas realizadas na presença e ausência de sulfito (0, 200, 256 e 400 ppm).

A Tabela 6, a seguir, mostra os valores da constante específica de degradação (k) dos carboidratos trealose e glicogênio, quando as células de levedura PE-2 foram submetidas a tratamento a 40°C sob diferentes concentrações de NaHSO_3 .

O sulfito (NaHSO_3) é um insumo disponível no processo industrial sucro-alcooleiro, o que o torna bastante conveniente se sua ação estressante sobre a

levedura, em combinação com o tratamento térmico, acelerasse o processo da fermentação endógena.

Basso & Amorim (1995) realizaram estudo da relação da tolerância de leveduras industriais a diferentes situações estressantes, expondo-as durante 24 horas na presença de etanol 10% a 40° C, sorbitol 1M; KCl 1M; SO₂ 1,6 mM, isoladamente. O sulfito foi o fator estressante que mais intensificou a diminuição no conteúdo de trealose das diferentes leveduras. Diante disso foi testada a influência do sulfito na degradação de glicogênio e trealose a 40° C. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores da constante específica de degradação (k) (h⁻¹) dos carboidratos trealose (TRE) e glicogênio (GLI) da linhagem de *S. cerevisiae* PE-2, quando submetida a tratamento com diferentes concentrações de NaHSO₃ sob 40° C.

Concentração de NaHSO ₃		TRE	GLI
(ppm)	m(M)		
CONTROLE	0,0	0,104	0,127
200	1,6	0,144	0,238
256	2,0	0,192	0,068
400	3,2	0,078	0,092

A variação de diversos parâmetros da suspensão de levedura durante a incubação a 40° C com ou sem sulfito pode ser representada satisfatoriamente pela equação de 2° grau (Figuras 14 a 19), exceto a variação do teor de carboidrato. A análise estatística desses dados está apresentada no anexo III.

Nesse período houve diminuição nos seguintes parâmetros: (1) viabilidade; (2) massa seca do fermento; (3) massa úmida do fermento; (4) carboidratos da célula (glicogênio e trealose); e proteína no fermento para a levedura submetida a 0 e 200 ppm de sulfito. Por outro lado houve incremento dos seguintes

parâmetros: (1) proteína no fermento, quando em 400 ppm de sulfito; (2) etanol no vinho; (3) glicerol no vinho e (4) proteína no vinho.

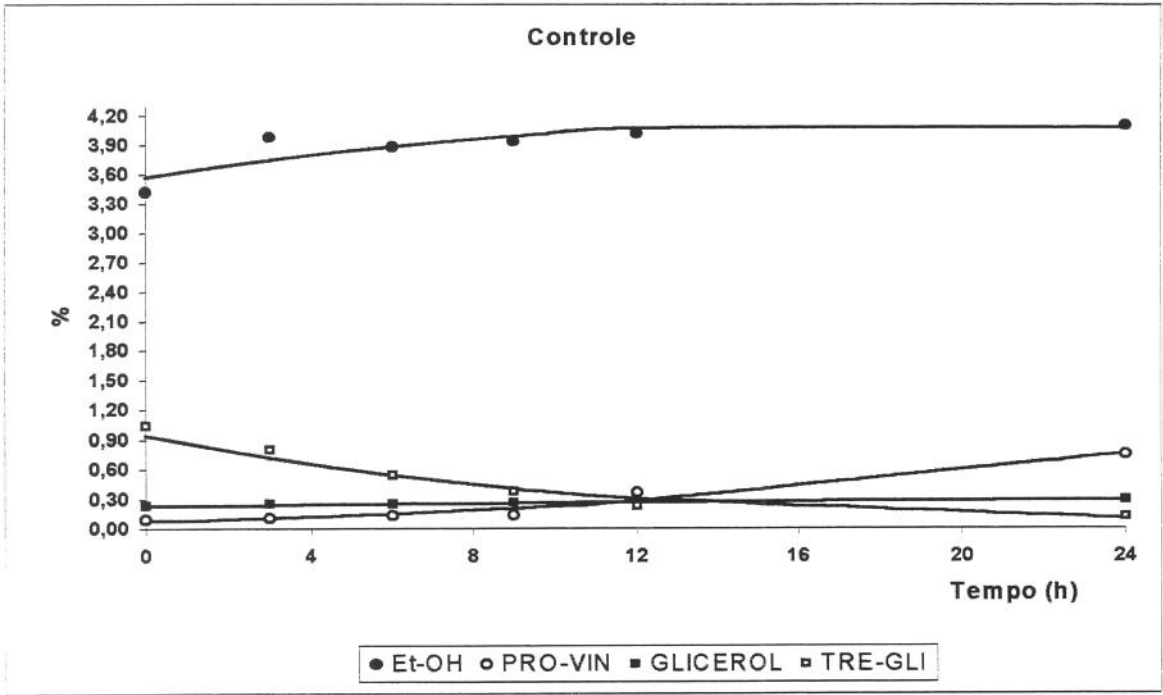


Figura 14. Valores percentuais de etanol (Et-OH), proteína (PRO-VIN) e glicerol no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE – GLI)] na massa seca da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, sem a aplicação de sulfito.

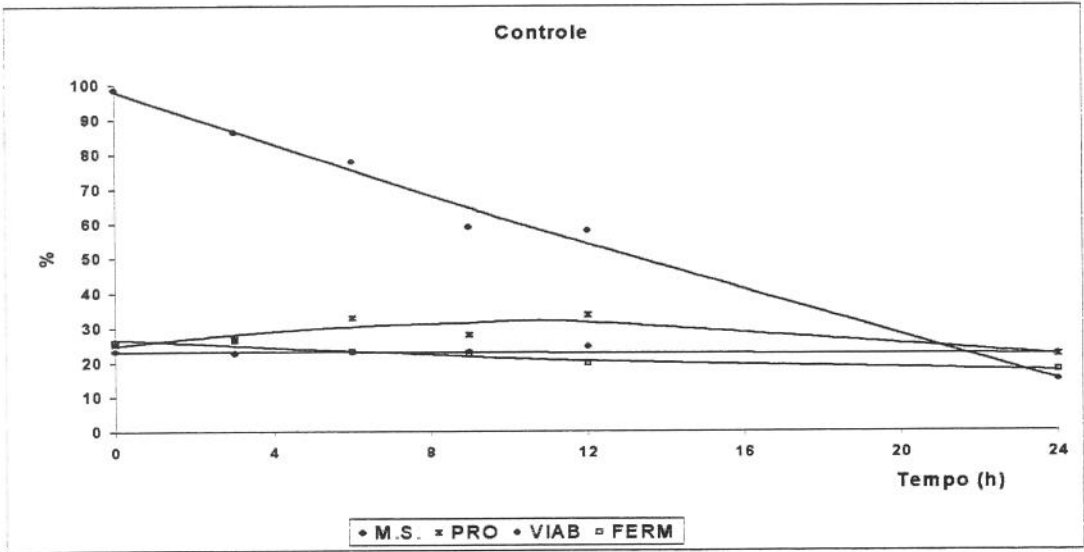


Figura 15. Valores percentuais de massa seca (M.S), proteína (PRO), viabilidade celular (VIAB), fermento úmido (FERM) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, sem a aplicação de sulfito.

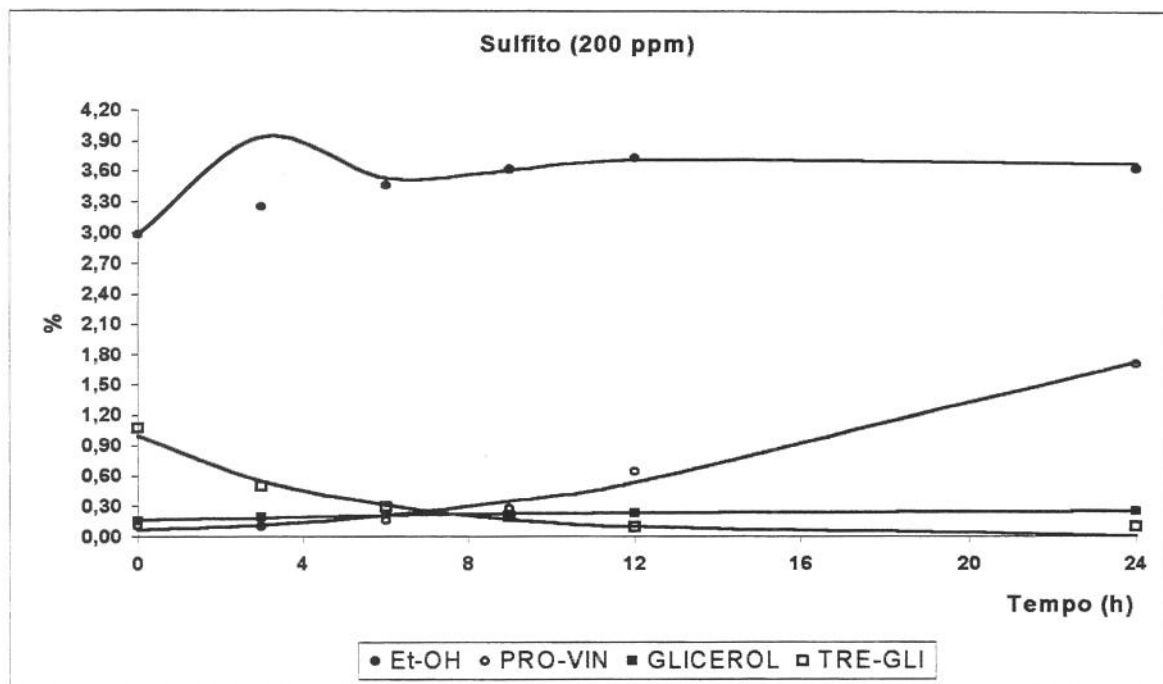


Figura 16. Valores percentuais de etanol (Et-OH), proteína (PRO-VIN) e glicerol no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE – GLI)] na massa seca da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, com a adição de sulfito (200 ppm).

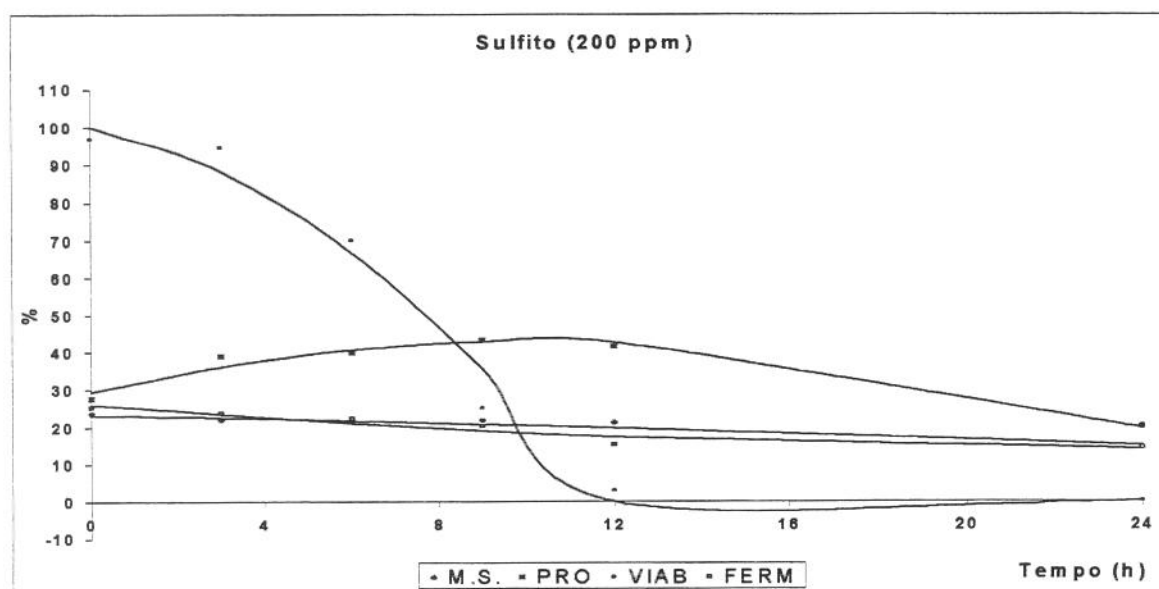


Figura 17. Valores percentuais de massa seca (M.S.), proteína no fermento (PRO), teor de fermento úmido (FERM) e viabilidade celular (VIAB) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sob fermentação endógena a 40° C com a adição de sulfito (200ppm).

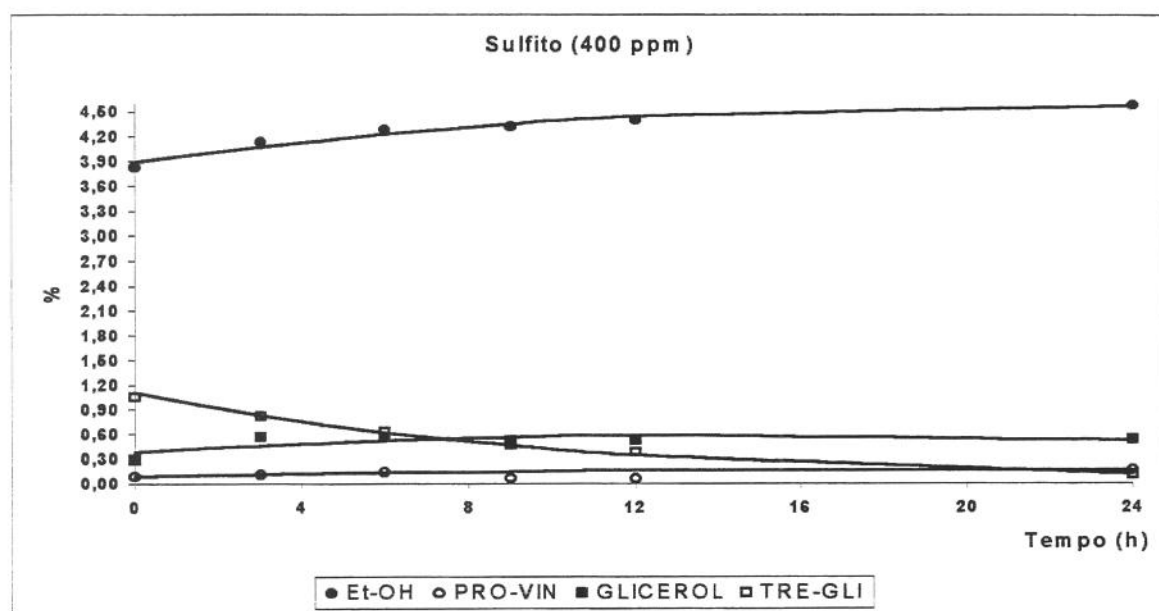


Figura 18. Valores percentuais de etanol (Et-OH), proteína (PRO-VIN) e glicerol no vinho, carboidratos [trealose e glicogênio (TRE – GLI)] na massa seca da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, com a adição de sulfito (400 ppm).

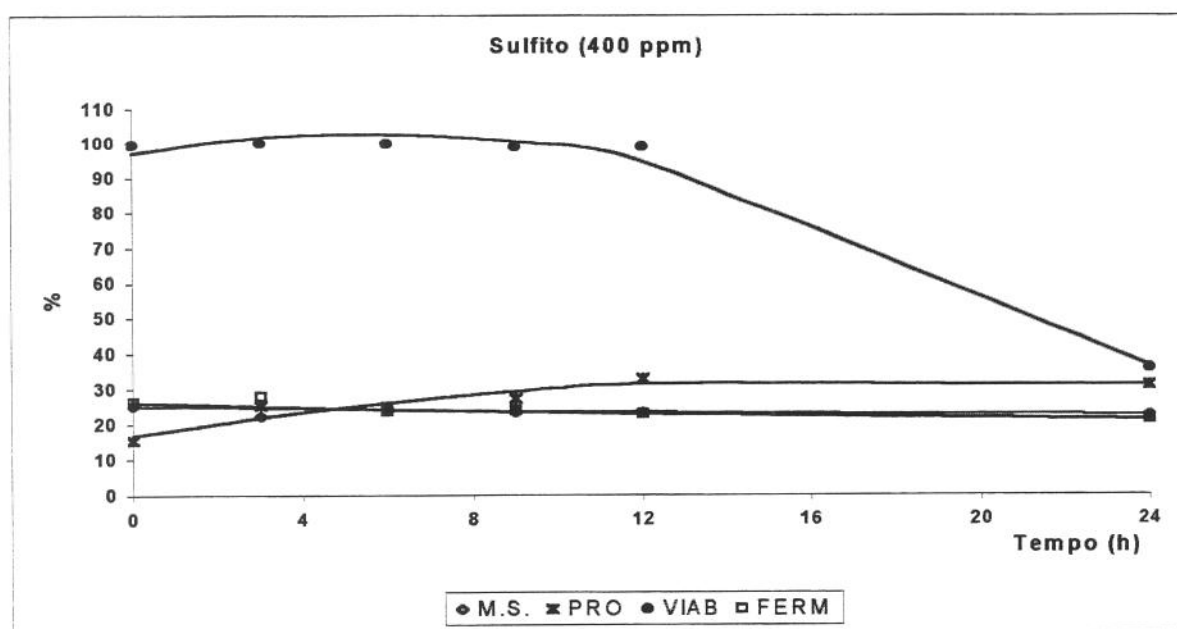


Figura 19. Valores percentuais de massa seca (M.S.), proteína (PRO), viabilidade celular (VIAB) e teor de fermento úmido (FERM) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, sob fermentação endógena a 40° C, com a adição de sulfito (400 ppm).

Considerando a variação desses parâmetros durante as primeiras 24 horas de incubação a 40° C, temos os valores apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7. Valores dos parâmetros obtidos pelas equações das curvas apresentadas nas Figuras 14 e 15 (calculadas usando as respectivas equações do anexo III).

0 ppm de sulfito

Parâmetros	Unidade	0 h	24 h	Variação no período
Proteína no fermento	g/100 g m.seca	24,74	22,11	-2,63
Viabilidade	% (n° / n°)	98,03	14,94	-83,09
Massa úmida no fermento	g/100 ml vinho	26,74	17,43	-9,31
Massa seca	g/100g m.úmida	23,05	22,22	-0,83
Trealose + glicogênio	g/100 g m. seca	17,29	2,54	-14,75
Trealose + glicogênio	g/100 mL vinho	0,940	0,100	+0,840
Etanol	g/100 mL vinho	3,57	4,08	+ 0,51
Proteína no vinho	g/100 mL vinho	0,07759	0,75295	+ 0,6753
Glicerol	g/100 mL vinho	0,233	0,283	+ 0,05

Tabela 8. Valores dos parâmetros obtidos pelas equações das curvas apresentadas nas figuras 16 e 17 (calculadas usando as respectivas equações do anexo III).

200 ppm de sulfito

Parâmetros	Unidade	0 h	24 h	Variação no período
Proteína no fermento	g/100 g m.seca	29,35	19,66	-9,69
Viabilidade	% (n° / n°)	100,0	0,0	-100,0
Massa úmida no fermento	g/100 mL vinho	26,07	13,80	-12,27
Massa seca	g/100g m.úmida	23,25	14,88	-8,37
Trealose + glicogênio	g/100 g m. seca	18,54	0,36	-18,18
Trealose + glicogênio	g/100 mL vinho	0,990	0,010	+0,980
Etanol	g/100 mL vinho	2,98	3,63	+0,650
Proteína no vinho	g/100 mL vinho	0,068	1,724	+1,656
Glicerol	g/100 mL vinho	0,163	0,253	+0,090

Tabela 9. Valores dos parâmetros obtidos pelas equações das curvas apresentadas nas Figuras 18 e 19 (calculadas usando as respectivas equações do anexo III).

400 ppm de sulfito				
Parâmetros	Unidade	0 h	24 h	Variação no período
Proteína no fermento	g/100 g m.seca	16,81	31,02	+14,21
Viabilidade	% (n° / n°)	96,95	36,28	-60,67
Massa úmida no fermento	g/100 mL vinho	26,04	21,29	-4,75
Massa seca	g/100g m.úmida	25,28	22,44	-2,84
Trealose + glicogênio	g/100 g m. seca	17,31	2,29	-15,02
Trealose + glicogênio	g/100 mL vinho	1,11	0,11	+1,00
Etanol	g/100 mL vinho	3,89	4,58	+0,69
Proteína no vinho	g/100 mL vinho	0,0843	0,1592	+0,0749
Glicerol	g/100 mL vinho	0,376	0,518	+0,142

Como pode ser visto na Tabela 7, a diminuição da proteína no fermento foi de cerca de 2,63 g/100g de proteína seca, quando não foi acrescentado sulfito na suspensão, e foi de 9,69 g/100g (Tabela 8) para a suspensão que continha 200 ppm de sulfito. Para a suspensão que continha 400 ppm de sulfito (Tabela 9) houve um incremento de proteína no fermento de 14,21 g/100g. Já a perda da proteína para o vinho foi de 0,675; 1,656 e 0,0749 g/100 mL para as leveduras nas suspensões de 0; 200 e 400 ppm de sulfito respectivamente. A percentual de proteína perdida (ΔPE) em relação àquela nas células de fermento foi calculada da seguinte forma:

$$\Delta PE = \Delta PV / \left(\frac{\%PF}{100} \times \frac{m.s. \times m.u.}{100} \right)$$

ΔPE = percentual de proteína perdida (g/100g proteína da célula) entre t_{24} e t_0h .

ΔPV = aumento no teor de proteína no vinho (g/100 mL de vinho) t_{24} e t_0h .

%PF = teor de proteína no fermento (g/100g m.s.) no t_0 h.

m.s. = teor de biomassa seca (g/100g de m.u.) no t_0 h.

m.u. = teor de biomassa úmida (g/100 mL de vinho) no t_0 h.

Para a levedura PE-2 em suspensão isenta de sulfito temos:

$$\Delta PE = 0,6753 \left/ \left(\frac{24,74}{100} \times \frac{23,05 \times 26,74}{100} \right) \right.$$

$$\Delta PE = 44,31 \text{ (g/100g de proteína da célula)}$$

O mesmo cálculo feito para a PE-2 em suspensão com 200 e 400ppm de sulfito:

$$\text{Para 200 ppm: } \Delta PE = 93,03 \text{ (g/100g de proteína da célula)}$$

$$\text{Para 400 ppm: } \Delta PE = 6,7722 \text{ (g/100g de proteína da célula)}$$

Neste caso a perda de proteína foi bastante elevada, principalmente no controle e a 200 ppm de sulfito. Essa perda está bastante relacionada à perda da viabilidade celular e por conseguinte ao aumento de permeabilidade de sua membrana. Diante disso, é importante monitorar a manutenção da viabilidade durante o tratamento térmico, para que a perda de proteína mantenha dentro da faixa aceitável.

Assim, a quantidade de ART acrescentado no sistema por mL de vinho é dada pela equação:

$$\Delta \text{ ART} = 1,075 \times (\Delta \text{ CH})$$

onde: $\Delta \text{ ART}$ = acréscimo de ART no sistema (g/100mL)

$\Delta \text{ CH}$ = carboidrato hidrolisado no sistema (g/100mL)

Para a levedura PE-2 nos diferentes tratamentos temos:

Em 0 ppm de sulfito: $\Delta \text{ ART} = 1,075 \times (0,840) = 0,90 \text{ g/100mL}$;

Em 200 ppm de sulfito: $\Delta \text{ ART} = 1,050 \text{ g/100mL}$ e

Em 400 ppm de sulfito: $\Delta \text{ ART} = 1,075 \text{ g/100mL}$

Desde que 1 g de ART nos fornece 0,51g de etanol, seria possível então, teoricamente, os seguintes incrementos de etanol no sistema (assumindo 100% de rendimento).

Para a levedura PE-2 em 0 ppm de sulfito: 0,46 g/100mL; em 200 ppm de sulfito: 0,54 g/100mL e em 400 ppm: 0,55 g/100mL.

Os valores determinados experimentalmente foram 0,51; 0,65 e 0,69 % (g/100 mL) de etanol respectivamente para a levedura PE-2 em suspensões com 0, 200 e 400ppm de sulfito.

Esse valor elevado na conversão aparente de etanol pode estar relacionado a degradação de outros componentes celulares durante a incubação, uma vez que houve uma redução muito grande no componente celular.

Para ilustrar, podemos comparar os dados da levedura PE-2 da tabela 2 com os das Tabelas 7, 8 e 9 montando a Tabela 10.

Tabela 10. Relação entre redução da viabilidade ($\Delta V\%$) e perda do material celular quanto à perda de massa celular (ΔMC).

Dados da	$\Delta V\%$	ΔMC	ΔAlc
Tabela 2	-15,4	18,70	0,17
Controle Tab. 7	-83,09	37,16	0,51
200 ppm Tab. 8	-100,00	66,12	0,65
400 ppm Tab. 9	-60,67	27,43	0,69

Essa perda de massa celular (ΔMC) é calculado pela expressão:

$$\Delta MC = \frac{(m.s.)_0 \times (m.u.)_0 - (m.s.)_{24} (m.u.)_{24}}{(m.s.)_0 \times (m.u.)_0} \times 100$$

Onde: $(m.s.)_0$ = massa seca no tempo 0;

$(m.u.)_0$ = massa úmida no tempo 0;

$(m.s.)_{24}$ = massa seca às 24 horas;

$(m.u.)_{24}$ = massa úmida às 24 horas.

Os resultados mostram que as células usadas no ensaio com teor variado de sulfito estavam menos saudáveis que as da Tabela 2. Também, nas condições de células pouco saudáveis, a aplicação de tratamento térmico na levedura é pouco recomendada, porque há uma redução considerável na massa de fermento e pouco ou nenhum incremento no teor protéico. Talvez o incremento maior no teor de etanol (ΔAlc) possa compensar essa redução e tornar o tratamento economicamente interessante. É necessário realizar um estudo técnico - econômico para avaliar as diferentes variações.

De qualquer forma, a adição de sulfito não afetou significativamente, na velocidade de redução dos carboidratos, nem na permeabilidade da célula. O que de certa forma contradiz os resultados obtidos por Basso & Amorim (1995).

5. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos com a fermentação endógena dos carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, das linhagens de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, Pedra-2 (PE-2) e Santa Adélia-1 (SA-1) pode concluir que:

a) A cinética de degradação dos carboidratos de reserva segue uma equação de primeira ordem, indicando que, à temperatura de 40°C, a sua velocidade é uma função exclusiva da concentração de carboidratos presentes;

b) A fermentação endógena dos carboidratos de reserva resulta em produção adicional de etanol e também permite aumento relativo no teor de proteína da levedura;

c) Para ambas linhagens, PE-2 e SA-1, obteve-se aumentos no teor de proteína devido à degradação anaeróbia do glicogênio e da trealose endógenos, sob temperaturas de incubação de 38 e 40° C;

d) Devido à diminuição na viabilidade, nas temperaturas de incubação de 42 e 44° C, houve diminuição no teor de proteína do fermento;

e) O aumento de N no vinho para ambas as linhagens foi devido à morte e conseqüente autólise das células, em todas as temperaturas de incubação;

f) Ambas as linhagens, PE-2 e SA-1, mostraram comportamento semelhante quanto à degradação de glicogênio e trealose e há evidências de que o sistema enzimático de degradação do glicogênio é relativamente termolábil, o que não ocorre com o sistema de degradação da trealose;

g) Quando se deseja diminuir ao máximo o teor de carboidratos da célula, a temperatura de incubação não deve ser igual ou superior a 42° C, pois a degradação de glicogênio cessará após certo período de tratamento;

h) A aplicação de sulfito não afetou a velocidade de degradação dos carboidratos, trealose e glicogênio, numa fermentação endógena realizada com a PE-2 a 40°C;

i) Quando se pretende realizar o tratamento térmico da levedura, para que ocorra a fermentação endógena, com o objetivo de obter aumento no teor protéico da levedura e produção de etanol é necessário que se faça o monitoramento da viabilidade celular, pois com células com baixa viabilidade ocorre diminuição na massa de fermento e pouco ou nenhum aumento de proteínas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCARDE, A.R. **Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas pelo processo de liofilização.** Piracicaba, 1996. 92p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
2. AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. **Processo para aumentar os teores alcoólicos do vinho e protéico da levedura após o término da fermentação.** Pedido de patente P.I. 9.102.738, 28 jun. 1991. Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
3. ARGÜELLES, J.C. Heat-shock response in a yeast *tps1* mutant deficient in trehalose synthesis. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 350, p. 266-270, 1994.
4. ATTFIELD, P.V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 225, p. 259-263, 1987.
5. AVIGAD, G.; ZIV, O.; NEUFELD, E. Intracellular trehalase of a hybrid yeast. **Biochemical Journal**, London, v. 97, p. 715-722, 1965.
6. BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Mobilização e armazenamento dos carboidratos de reserva durante a fermentação alcoólica. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n. 8, p. 1-59, 1988.
7. BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Estudo comparativo de leveduras isoladas do processo industrial. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n. 15, p. 1-148, 1995.
8. BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; BERNARDINO, C.D. Fermentação da trealose e glicogênio endógenos. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n. 13, p. 1-16, 1993.
9. BECKER, J.U. A method for glycogen determination in whole yeast cells. **Analytical Biochemistry**, v. 86, n.1, p. 56-64, 1978.
10. BIRCH, G.G. Trehaloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 18, p. 201-225, 1963.
11. BISWAS, N.; GHOSH, A.K. Regulation of acid trehalase activity by association-dissociation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1379, p. 245-256, 1998.

12. BRADY, T.G.; DUGGAN, P.F.; MCGNAN, C.; TULLY, E. Study of the endogenous fermentation induced in baker's yeast by azide, 2,4-dinitrophenol and arsenite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 93, p. 220-230, 1961.
13. BRIN, M. Transketolase: clinical aspects. In: **Methods in Enzymology**, v. 9, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds). Academic Press, New York, p. 506-514, 1966.
14. BROWN, D.H.; BROWN, B.I. Enzymes of glycogen debranching: Amylo-1,6-glucosidase (I) and oligo-1,4-glucantransferase (II). **Methods in Enzymology**, Academic Press, New York, v. 8, p.515-524, 1966.
15. CHESTER, V.E. Endogenous metabolism of freshly harvested cells of a Brewer's yeast. **Nature**, London, v. 183, n. 4665, p. 902-903, 1959.
16. CHESTER, V.E. The dissimilation of the carbohydrate reserves of a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, London, v. 86, p. 153-60, 1963.
17. CHUANBIN, L.; JIAN, X.; FENGWU, B.; ZHIGUO, S. Trehalose extraction from *Saccharomyces cerevisiae* after microwave treatment. **Biotechnology Techniques**, Amsterdam, v. 12, n. 12, p. 941-43, 1998.
18. COUTINHO, C.; BERNARDES, E.; FÉLIX, D.; PANEK, A.D. Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 23-32, 1988.
19. CROWE, J.H.; WHITTAM, A.A.; CHAPMAN, D.; CROWE, L.M. Interaction of phospholipid monolayers with carbohydrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 769, p. 151-9, 1984.
20. DAVIDSON, J.F.; WHYTE, B.; BISSINGER, P.H.; SCHIESTL, R.H. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings National Academy Science of USA**, Washington, v. 93, p. 5116-21, 1996.
21. DELLAMORA-ORTIZ, G.M.; ORTIZ, C.H.D.; MAIA, J.C.C.; PANEK, A.D. Partial purification and characterization of the interconvertible forms of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 251, p. 205-214, 1986.
22. DE VIRGILIO, C.; PIPER, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* without heat shock protein hsp104 and in the absence of protein synthesis. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 288, p. 355-358, 1991.

23. DE VIRGILIO, C.; HOTTIGER, T.; DOMINGUEZ, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 219, p. 179-86, 1994.
24. DIJCK, P.V.; COLAVIZZA, D.; SMET, P.; THEVELEIN, J.M. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n.1, p. 109-15, 1995.
25. FERREIRA, J.C.; PASCHOALIN, V.M.F.; PANEK, A.D.; TRUGO, L.C. Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 251-254, 1997.
26. FERREIRA, J.C.; THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S.; PASCHOALIN, V.M.F.; TRUGO, L.C.; PANEK, A.D. Trehalose accumulation in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the UDPG-dependent trehalase synthase – phosphatase complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1335, p. 40-50, 1997.
27. FRANÇOIS, J.; NEVES, M.J.; HERS, H.G. The control of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a catabolite inactivation and repression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase. **Yeast**, Chichester, v. 7, p. 575-87, 1991.
28. FRANÇOIS, J.; PARROU, J.L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiological Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 125-145, 2001.
29. FRUTON, J.S.; SIMMONDS, S. General Biochemistry, 2nd Ed. John Weley ; Sons, Inc. New York, 1960.
30. GÉLINAS, P.; FISET, G.; LEDUY, A.; GOULET, J. Effect of growth conditions and trehalose content on cryotolerance of baker's yeast in frozen doughs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 10, p. 2453-9, 1989.
31. 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.
32. GONZÁLEZ, M.I.; STRUCKA, R.; BLÁZQUEZ, M.A.; FELDMANN, H.; GANCEDO, C. Molecular cloning of *CIF1*, a yeast gene necessary for growth on glucose. **Yeast**, Chichester, v. 8, p. 183-192, 1992.

33. GRBA, S.; OURA, E.; SOUMALAIN, H. On the formation of glycogen and trehalose in bakers' yeast. **European Journal of Applied Microbiology**, Berlin, v. 2, p. 29-37, 1975.
34. GROSS, C.; WATSON, K. Heat shock protein synthesis and trehalose accumulation are not required for induced thermotolerance in depressed *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 220, p. 766-772, 1996.
35. GUNJA-SMITH, Z.; PATIL, N.B.; SMITH, E.E. Two pools of glycogen in *Saccharomyces*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 130, n. 2, p. 818-825, 1977.
36. GUTIERREZ, L. E. **Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum***. Piracicaba, 1989. 160p. Tese(Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
37. GUTIERREZ, L. E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 47, n. 2, p. 597-608, 1990.
38. GUTIERREZ, L. E. Changes in trehalose content of baker's yeast as affected by octanoic acid. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 3, p. 460-463, 1993.
39. GUTIERREZ, L. E. Bioquímica de Leveduras. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Depto de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Piracicaba - SP. 270p. 1997.
40. GUTIERREZ, L. E.; DE MARTIN ORELLI, V.F. Efeito do nitrito sobre a fermentação alcoólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 48, p. 41-54, 1991.
41. GUTIERREZ, L. E.; ANNICCHINO, A. V. K.O.; STIPPI, J.M.S. Efeitos do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 34 n. 2, p. 235-42, 1991.
42. HARDY, T.A.; ROACH, P.J. Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 32, p. 23799-23805, 1993.
43. HERBERT, D.; PHIPPS, P.J. ; STRANGE, R. E. Chemical analysis of microbial cells. In **Methods of Microbiology 5B**. Ed. Norris, J.R. and Ribbons, D.W., New York: Academic Press, 209-344, 1971.

44. HINO, A.; MIHARA, K.; NAKASHIMA, K. ; TAKANO, H. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 5, p. 1386-1391, 1990.
45. HOTTIGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 220, p. 113-115, 1987a.
46. HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P. ; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 12, p. 5518-5522, 1987b.
47. HOTTIGER, T.; DE VIRGILIO, C.; BELL, W.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. The 70-kilodalton heat-shock proteins on the SSA sub-family negatively modulate heat-shock induced accumulation of trehalose and promote recovery from thermal stress in yeast, (*Saccharomyces cerevisiae*), **Archives Microbiology**, Berlin, v. 131, p. 298-301, 1992.
48. HOTTIGER, T.; DE VIRGILIO, C.; HALL, M.N.; BOLLER, T. ; WIEMKEN, A. The role trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 219, p. 187-193, 1994.
49. HUANG, D.; FARKAS, I.; ROACH, P.J. Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and the Snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 16, n. 8, p. 4357-4365, 1996.
50. HUANG, D.; MOFFAT, J.; WILSON, W.A.; MOORE, L.; CHENG, C.; ROACH, P.J.; ANDREWS, B. Cyclin partners determine pho85 protein kinase substrate specificity in vitro and in vivo: control of glycogen biosynthesis by Pc18 and Pcl10. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 18, n. 6, p. 3289-3299, 1998.
51. HWANG, P.K.; TUGENDREICH, S.; FLETTERICK, R.J. Molecular analysis of *GPH1*, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 9, p. 1659-1666, 1989.
52. KANE, S.M.; ROTH, R. Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 118, n. 1, p. 8-14, 1974.

53. KELLER, F.; SCHELLENBERG, M.; WIEMKEN, A. Localization of trehalose in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 131, n. 1, p. 298-301, 1982.
54. KELLY, P.J.; CATLEY, B.J. A purification of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 353-358, 1976.
55. KRALLISH, I.; JEPPSSON, H.; RAPOPORT, A.; HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of xylitol and trehalose on dry resistance of yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 47, p. 447-451, 1997.
56. KOCH, E.M.; KOCH, F.C. Présence du tréhalose dans la levure. **Science**, Washington, v. 61, p. 570-572, 1925.
57. LEE, D.H. ; GOLDBERG, A.L. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 18, n.1, p. 30-38, 1998.
58. LELOIR, L.F. ; CABIB, E. The enzymic synthesis of trehalose phosphate. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 75, p. 5445-5446, 1953.
59. LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, 1980.
60. LING, Z.Y.; MORIMURA, S. ; KIDA, K. Effect of fermentation temperature on relationship between cell viability and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* KF-7 in repeated-batch fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 204-207, 1995.
61. LONDESBOROUGH, J.; VUORIO, O.E. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from baker's yeast: purification of a proteolytical activated form. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 137, p. 323-330, 1991.
62. LONDESBOROUGH, J.; VUORIO, O. E. Purification of trehalose synthase from baker's yeast. Its temperature – dependent activation by fructose 6 – phosphate and inhibition by phosphate. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 216, p. 841-848, 1993.
63. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **BROCK Biology of microorganisms**. 8 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986p.

64. MIYADA, V.S. **A levedura seca na alimentação de suínos; estudos adicionais sobre o seu valor protéico e vitamínico.** Piracicaba, 1987. 159p. Tese (Livre-Docência) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
65. MOORE, W.J. **Physical Chemistry.** 4.ed. London, Longmans, 869p. 1964.
66. MU, J.; CHENG, C.; ROACH, P.J. Initiation of glycogen synthesis in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 43, p. 26554-26560, 1996.
67. MYRBÄCK, K.; ÖRTENBLAD, B. Trehalose und Hefe. **Biochememische Zeitschrift**, Berlin, v. 291, p. 61-69, 1937.
68. NEVES, M.J.; FRANÇOIS, J. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, London, v. 288, p. 859-864, 1992.
69. NEWMAN, Y.M.; RING, S.G.; COLACO, C. The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation. In: **Biotechnology; Genetic Engineering Reviews**, ed. TOMBS, M.P, vol. 11, p. 263-294, 1993.
70. OESTREICHER, E.G.; PANEK, A.D. Effect of Mg^{2+} on the activity of yeast trehalose-6-phosphate synthase. **IRCS Medical Science**, Lancaster, v. 10, p. 418-419, 1982.
71. OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A. ; GARCIA, C.E. **Curso de Treinamento em Microbiologia**, Piracicaba, FERMENTEC, ESALQ-USP, 37p., 1996.
72. PANEK, A.C.; BERNARDES, E.J. Trehalose: Its role germination of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, Berlin, v. 7, p. 393-397, 1983.
73. PANEK, A.D. Synthesis of trehalose by baker's yeast. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 98, n. 3, p. 349-355, 1962.
74. PANEK, A.D. Energy requirements for trehalose synthesis. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 75-79, 1971.
75. PANEK, A.D. Trehalose metabolism and its role in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, p. 121-130, 1985.
76. PANEK, A.D.; MANSURE, J.J.C. ; ELEUTHERIO, E.C.A. **Cryobiol.** v. 30, p. 238-239, 1993.
77. PANEK, A.D. ; MATTOON, J.R. Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relationship between catabolite repression,

- trehalose synthesis, and mitochondrial development. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 183, p. 306-316, 1977.
78. PANEK, A.D.; SOUZA, N.O. Purification and properties of baker's yeast trehalase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 239, p. 1671-1673, 1964.
 79. PANEK, A.D.; OLIVEIRA, E.D.; FREITAS-VALLE, A.B.; OESTREICHER, E.S.; MATTOON, J.R. Genetic relationship between maltose and trehalose metabolism. In: **Current Developments in Yeast Research** (Stewart, G.G. and Russel, I., eds.), pp. 285-291. Pergamon Press/Labatt Brewing Company Ltd., London, Canada. 1980.
 80. PANEK, A.C.; BERNARDES, E.; PANEK, A.D. Does trehalose play a role in yeast cells under stress? LEOPOLD, A.C., ed. *Membranes, metabolism and dry organisms*. New York: Comstock publishing associates, 1987. cap. 7, p.123-142.
 81. PARROU, J.L. ; FRANÇOIS, J. A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 248, p. 186-188, 1997.
 82. PARROU, J.L.; TESTE, M.A.; FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, Reading, v. 143, p. 1891-1900, 1997.
 83. PATEL, G.B.; INGLEDEW, W.M. Internal carbohydrates of *Saccharomyces carlsbergensis* during commercial lager brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 79, p. 392-396, 1973.
 84. PATEL, G.B.; INGLEDEW, W.M. The relationship of acid-soluble glycogen to yeast flocculation. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 21, p. 1608-1613, 1975.
 85. PEJIN, D.; RAZMOVSKI, R. Continuous Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* at different biotin concentrations in nutrient media. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 80, p. 53-55, 1996.
 86. PHAFF, H.J., MILLER, M.W., MRAK, E.M. **The Life of Yeast**. 2ed. Cambridge, Massachutts and London, England: Harvard University Press, 341p. 1978.
 87. QUAIN, D.E. The determination of glycogen in yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 87, p. 289-291, 1981.

88. QUAIN, D.E.; THURSTON, P.A.; TUBB, R.S. The structural and storage carbohydrates of *Saccharomyces cerevisiae*: changes during fermentation of wort and role for glycogen catabolism in lipid biosynthesis. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 87, p. 108-111, 1981.
89. QUAIN, D.E.; TUBB, R.S. A rapid and simple method for the determination of glycogen in yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 89, p. 38-40, 1983.
90. RIBEIRO, M.J.S.; SILVA, J.T.; PANEK, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during heat-shock. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1200, n. 2, p. 139-147, 1994.
91. ROCHA-LEÃO, M.H.M.R.; PANEK, A.D.; CARVALHO, C.V.L.A. Glycogen accumulation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*: catabolite repression effects. **IRCS Medical Science**, Lancaster, v. 12, p. 411-412, 1984.
92. ROSE, A.H.; HARRISON, J.S., eds. **The Yeasts. Physiology and Biochemistry of Yeast**. Academic Press, London and New York. Vol.2., 1971.
93. ROTHMAN-DENES, L.B.; CABIB, E. Two forms of yeast glycogen synthase and their role in glycogen accumulation. **Proceedings National Academy Science of USA**, Washington, v. 66, p. 967-974, 1970.
94. SALMON, J.M.; PIÑÓN, R.; GANCEDO, C. Isolation and characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* able to sporulate in the presence of glucose. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 135, p. 203-209, 1989.
95. SAN-MIGUEL, P.F.; ARGUELLES, J.C. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1200, n. 2, p. 155-160, 1994.
96. SCHULZE, U.; LARSEN, M.E.; VILLADSEN, J. Determination of intracellular trehalose and glycogen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 228, p. 143-149, 1995.
97. SCHULZE, U.; LIDÉN, G.; VILLADSEN, J. Dynamics of ammonia uptake in nitrogen limited anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 46, p. 33-42, 1996.
98. SILLJÉ, H.H.W.; SCHURE, E.G.; ROMMENS, A.J.M.; HULS, P.G.; WOLDRINGH, C.L.; VERKLEIJ, A.J.; BOONSTRA, I.; VERRIPS, C.T. Effects of different carbon fluxes on G1 phase duration, cyclin expression, and

- reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 21, p. 6560-6565, 1997.
99. SLAUGHTER, J.C.; NOMURA, T. Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 14, p. 64-67, 1992.
 100. STAMBUK, B.U.; PANEK, A.D.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; ARAÚJO, P.S. Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1379, p. 118-128, 1998.
 101. SUOMALAINEN, L.; PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and standing. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 67, p. 249-254, 1961.
 102. SZOPA, J.S.; ZWOLINSKI, G.; KOWAL, K.; KUNICKA, A.; DOBROWOLSKA, I. The effect of substrate feeding on the physiological characteristics and the trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae*. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 1/42, n. 2, p. 41-50, 1992.
 103. THEVELEIN, J.M. Regulation of energy metabolism in fungi. **Microbiology Reviews**, v. 48, p. 42-59, 1984.
 104. TREVELYAN, W.E. Synthesis and degradation of cellular carbohydrates by yeast. In: COOK, A. H., ed. **The chemistry and biology of yeast**. New York. Academic Press. cap.8, p. 369-436. 1958.
 105. TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on Yeast Metabolism. 1. Fractionation and Microdetermination of Cell Carbohydrates. **Biochemical Journal**, London, v. 50, p. 298-303, 1952.
 106. TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on Yeast Metabolism.5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, London, v. 62, n. 2, p. 177-183, 1956a.
 107. TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on Yeast Metabolism.7. Yeast carbohydrate fractions. Separation from nucleic acid, analysis, and behavior during anaerobic fermentation. **Biochemical Journal**, London, v. 63, p. 23-33, 1956b.
 108. UNO, I.; MATSUMOTO, K.; ADACHI, K.; ISHIKAWA, T. Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 258, p. 10867-10872, 1983.

- 109.VAN DER PLAAT, J.B.; VAN SOLINGER, P. Cyclic 3'5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 56, p. 580-586, 1974.
- 110.VAN DIJCK, P.; COLAVIZZA, D.; SMET, P.; THEVELEIN, J.M. Differential Importance of Trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61 n. 1, p. 109-115, 1995.
- 111.VOET, D.; VOET, J.G. Biochemistry. 2 ed. New York: John Wiley; Sons, 1995. 1360p.
- 112.VUORIO, O.E.; KALKKINEN, N.; LONDESBOROUGH, J. Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 216, p. 849-861, 1993.
- 113.VUORIO, O.E.; LONDESBOROUGH, J.; KALKKINEN, N. Trehalose synthase: purification of the intact enzyme and cloning of the structural genes, **Yeast**, Chichester, v. 8, S 626, 1992.
- 114.WIEMKEN, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 58, p. 209-217, 1990.
- 115.WINKLER, K.; KIENLE, I.; BURGERT, M.; WAGNER, J.C.; HOLZER, H. Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 291, n. 2, p. 269-272, 1991.
- 116.WYATT, G.R. **Advances Insect Physiology**, London, v. 4, p. 287-360, 1967.
- 117.YOSHIKAWA, Y.; MATSUMOTO, K.; NAGATA, K.; SATO, T. Extraction of trehalose from thermally-treated baker's yeast. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 58, n. 7, p. 1226-1230, 1994.
- 118.ZAGO, E.A; SILVA, L.F.F. da; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, L.C. Métodos Analíticos para o Controle da Produção de Álcool, 2ª Ed., Piracicaba, FERMENTEC, FEALQ, ESALQ-USP, 1996, 194p.

ANEXO 1 – MEIOS DE CULTURA

1. Meio YEPD

COMPOSTOS	QUANTIDADE (g)
Extrato de levedura	10
Peptona bacteriológica	10
Dextrose	20
H ₂ O destilada	q.s.p. 1000 mL

2. Meio de Multiplicação (Mosto com 6 % de ART)

(A) Composição de sais

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÃO	
	g/L	mM
K ₂ HPO ₄	0,87	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,66	5
Uréia (NH ₂ CONH ₂)	0,30	5
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0,49	2
Zn SO ₄ . 7H ₂ O	0,03	0,1
Mn SO ₄ . H ₂ O	0,02	0,1
Ácido linolêico	1,00 (mL/L)	0,03 g/L de etanol
H ₂ O destilada	q.s.p. 1000 mL	

(B) Melaço – ajustado à concentração de 6 % de ART (p/v)

3. Mosto Misto (15% de ART)

Composto por 30% de melaço com ART de 15% e 70 % de caldo de cana-de-açúcar também com 15% de ART.

ANEXO 2 - TABELAS

Tabela 1. Valores médios de etanol, glicogênio, trealose, nitrogênio no vinho, proteína, matéria seca de fermento, fermento úmido e viabilidade, obtidos em uma fermentação endógena com as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e SA-1, a 38° C.

Tempo (h)	Linhagem	Etanol (%)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	N-vinho (ppm)	Proteína (%)	M.seca (%)	Fermento (%)	Viabilidade (%)
0	PE-2	4,14	13,54	7,81	119,06	37,24	26,93	18,51	98,99
0	SA-1	4,20	8,58	7,24	122,56	40,94	27,53	18,40	97,33
4	PE-2	4,36	11,23	6,15	133,07	35,75	26,01	18,13	98,94
4	SA-1	4,34	6,76	5,66	126,56	42,06	26,61	18,04	97,89
8	PE-2	4,46	7,78	5,47	154,08	38,31	25,52	17,79	96,51
8	SA-1	4,40	5,60	4,53	143,57	41,81	26,36	17,76	91,09
12	PE-2	4,50	6,33	5,42	168,08	39,63	25,03	17,59	93,16
12	SA-1	4,50	4,99	4,20	164,58	42,69	26,17	17,49	89,10
24	PE-2	4,54	2,27	5,35	227,61	43,13	25,38	16,68	83,28
24	SA-1	4,56	2,25	2,68	255,63	45,75	26,65	16,36	75,66
32	PE-2	4,74	2,33	5,04	266,13	44,44	25,18	16,29	75,57
32	SA-1	4,60	1,73	2,75	332,67	47,06	26,48	15,98	72,21
48	PE-2	4,08	2,30	1,74	441,22	46,00	25,61	14,98	50,74
48	SA-1	4,50	1,83	0,86	651,33	47,31	27,10	14,39	42,33

Tabela 2. Valores médios de etanol, glicogênio, trealose, nitrogênio no vinho, proteína, matéria seca de fermento, fermento úmido e viabilidade, obtidos em uma fermentação endógena com as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e SA-1, a 40° C.

Tempo (h)	Linhagem	Etanol (%)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	N-vinho (ppm)	Proteína (%)	M.seca (%)	Fermento (%)	Viabilidade (%)
0	PE-2	4,11	19,08	10,90	225,98	33,50	27,99	20,47	99,49
0	SA-1	4,12	15,90	12,60	231,60	36,13	28,19	19,73	97,52
4	PE-2	4,44	17,87	8,65	253,81	36,19	27,11	19,74	97,65
4	SA-1	4,33	13,51	10,91	241,89	39,38	27,96	18,82	97,85
8	PE-2	4,51	12,56	8,17	262,69	37,94	25,61	19,63	95,37
8	SA-1	4,47	10,32	9,91	250,89	40,06	26,59	18,80	95,67
12	PE-2	4,70	10,26	7,99	292,01	39,44	26,64	19,48	84,85
12	SA-1	4,51	11,48	9,43	255,96	41,63	26,17	18,69	93,36
24	PE-2	4,65	6,34	7,89	433,24	42,69	25,27	18,30	53,23
24	SA-1	4,65	5,40	10,68	346,12	43,19	25,99	17,87	75,10
32	PE-2	5,05	4,59	3,21	768,88	42,69	27,02	14,34	30,97
32	SA-1	4,94	5,99	4,50	435,69	45,19	26,13	16,27	66,20

Tabela 3. Valores médios de etanol, glicogênio, trealose, nitrogênio no vinho, proteína, matéria seca de fermento, fermento úmido e viabilidade, obtidos em uma fermentação endógena com as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e SA-1, a 42° C.

Tempo (h)	Linhagem	Etanol (%)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	N-vinho (ppm)	Proteína (%)	M.seca (%)	Fermento (%)	Viabilidade (%)
0	PE-2	4,04	4,36	5,09	114,11	39,63	24,72	19,24	98,91
0	SA-1	3,98	6,44	6,12	135,50	39,88	27,04	19,35	99,39
4	PE-2	4,18	2,45	3,48	135,50	44,00	21,02	18,61	92,21
4	SA-1	4,10	2,67	3,78	149,77	44,44	23,93	18,58	94,90
8	PE-2	4,30	1,43	1,48	171,16	45,75	21,64	17,78	92,82
8	SA-1	4,24	2,02	2,66	171,16	47,06	22,51	17,87	90,97
12	PE-2	4,34	1,31	0,38	213,95	46,44	20,51	17,36	73,43
12	SA-1	4,34	0,92	1,23	217,51	46,88	22,97	16,83	74,72
24	PE-2	4,26	1,24	0,06	513,48	44,00	12,97	15,81	19,28
24	SA-1	4,36	1,60	0,07	570,53	46,63	17,09	14,84	11,03
32	PE-2	4,24	1,69	0,05	1563,25	38,31	21,14	13,21	2,16
32	SA-1	4,34	1,50	0,05	994,86	42,88	23,09	14,18	9,70

Tabela 4. Valores médios de etanol, glicogênio, trealose, nitrogênio no vinho, proteína, matéria seca de fermento, fermento úmido e viabilidade, obtidos em uma fermentação endógena com as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e SA-1, a 44° C.

Tempo (h)	Linhagem	Etanol (%)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	N-vinho (ppm)	Proteína (%)	M.seca (%)	Fermento (%)	Viabilidade (%)
0	PE-2	3,96	8,29	4,81	135,50	39,63	24,20	19,26	99,43
0	SA-1	3,86	7,59	6,05	124,80	41,13	25,40	19,95	100,00
4	PE-2	4,30	2,87	2,96	169,02	42,25	22,41	18,13	82,89
4	SA-1	4,16	3,60	3,36	167,59	45,75	23,53	18,81	86,35
8	PE-2	4,40	2,43	0,99	278,13	45,06	22,76	17,00	46,65
8	SA-1	4,32	2,29	0,95	285,26	47,25	24,11	17,25	47,70
12	PE-2	4,38	2,20	0,46	513,48	44,88	23,14	15,69	22,71
12	SA-1	4,34	2,06	0,00	552,70	47,25	24,56	15,83	17,25
24	PE-2	4,36	2,40	0,00	2089,56	32,13	22,19	11,47	1,97
24	SA-1	4,18	2,360	0,00	2103,82	35,00	23,80	11,55	0,00

Tabela 5. Valores médios de etanol, glicogênio, trealose, nitrogênio no vinho, proteína, matéria seca de fermento, fermento úmido e viabilidade, obtidos em uma fermentação endógena com as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e SA-1, a 40° C

Tempo (min)	Linhagem	Etanol (%)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	N-vinho (ppm)	N-fermento (%)	Glicerol (%)	Fermento (%)	Viabilidade (%)
0	PE-2	4,40	10,68	7,62	165,40	5,65	0,261	19,28	99,28
	SA-1	3,86	18,00	10,24	90,98	6,81	0,262	20,63	91,94
10	PE-2		8,39	6,68	171,17	5,54	0,257	19,19	
	SA-1		15,17	9,71	79,84	6,76	0,286	20,43	
20	PE-2		9,35	7,77	175,01	5,40	0,259	19,22	
	SA-1		15,57	8,60	92,84	6,76	0,277	20,39	
30	PE-2		8,80	7,45	227,33	5,73	0,265	19,57	
	SA-1		15,46	8,17	115,12	6,76	0,275	20,29	
40	PE-2		7,25	6,95	182,71	5,76	0,264	19,14	
	SA-1		15,74	8,62	109,55	6,67	0,277	20,24	
50	PE-2		7,78	8,43	190,40	5,87	0,256	18,48	
	SA-1		15,31	8,30	111,40	6,85	0,284	20,17	
60	PE-2		8,11	7,31	194,25	5,76	0,268	19,48	
	SA-1		15,42	8,64	107,69	6,87	0,284	20,08	
90	PE-2		9,02	6,55	203,87	5,47	0,259	19,14	
	SA-1		14,48	8,37	120,69	7,04	0,268	19,97	
120	PE-2		6,31	5,11	184,63	6,12	0,261	18,90	
	SA-1		12,86	7,81	139,26	7,07	0,302	19,93	
150	PE-2		5,97	4,39	186,56	6,19	0,264	18,79	
	SA-1		13,62	7,48	141,11	6,94	0,286	20,14	
180	PE-2		5,25	5,00	184,63	6,12	0,255	18,93	
	SA-1		13,00	7,27	120,69	7,30	0,287	20,04	
210	PE-2		5,40	4,43	184,63	6,23	0,266	18,87	
	SA-1		12,93	6,86	142,97	7,32	0,288	19,69	
270	PE-2	4,54	6,75	4,45	265,41	6,26	0,273	18,68	99,90
	SA-1	4,10	11,76	6,79	141,11	7,32	0,286	19,75	89,89
480	PE-2	4,66	4,95	6,73	203,86	6,59	0,284	18,54	99,13
	SA-1	4,26	11,36	6,84	176,39	7,43	0,302	19,12	86,42
720	PE-2	4,66	3,69	7,00	203,87	6,52	0,292	18,33	97,10
	SA-1	4,28	9,17	5,94	202,39	7,85	0,307	18,53	84,95
1440	PE-2	4,62	1,46	1,26	300,03	7,13	0,295	16,80	83,87
	SA-1	4,42	5,39	1,73	347,21	8,31	0,306	16,96	59,61
1920	PE-2	-	-	-	-	-	-	-	-
	SA-1	5,54	5,25	1,11	505,04	8,26	0,311	15,86	34,89

Tabela 6. Valores médios de pH, etanol, peso de matéria seca e fresca, porcentagem de nitrogênio, glicogênio, trealose, viabilidade, numa fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem PE-2, com e sem sulfito (200 ppm) a 40° C.

Tempo (h)	Tratamento (NaHSO ₃)	pH	Etanol (%)	Fermento (%)	Proteína (%)	N-vinho (ppm)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	Viabilidade (%)
0	0 ppm	3,49	3,78	25,70	30,31	152	10,05	5,10	96,66
	200 ppm	3,70	3,72	25,20	27,69	173	13,28	4,56	96,80
3	0 ppm	3,86	5,00	24,20		180	8,12	4,23	72,43
	200 ppm	3,96	4,18	23,70	38,94	159	5,93	3,51	94,50
6	0 ppm	4,28	4,47	22,60	41,56	263	4,44	3,92	56,12
	200 ppm	4,36	4,48	22,30	39,81	249	3,15	2,84	69,98
9	0 ppm	4,58	4,58	20,60	32,00	277	3,12	1,81	19,01
	200 ppm	4,63	4,56	20,20	43,25	436	3,28	1,17	25,12
12	0 ppm	5,11	4,70	16,30	34,62	1052	2,05	0,0	
	200 ppm	5,17	4,66	15,10	41,56	1024	2,08	0,0	2,96
24	0 ppm	4,96	4,66	14,00	13,81	2027	3,12	0,0	2,08
	200 ppm	4,95	4,62	14,10	19,88	2733	3,33	0,0	0,0

Tabela 7. Valores médios de etanol, peso de matéria seca e fresca, porcentagem de nitrogênio, glicogênio, trealose, viabilidade, numa fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem PE-2, com e sem sulfito (256 ppm) a 40° C.

Tempo (h)	Tratamento (NaHSO ₃)	Etanol (%)	Fermento (%)	Proteína (%)	N-vinho (ppm)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	Viabilidade (%)
0	0 ppm	4,12	16,60	38,0	159,00	9,75	8,41	99,60
	256 ppm	4,12	16,70	38,0	159,00	9,22	8,29	99,10
4	0 ppm	4,38	15,90	39,3	168,00	6,79	7,41	94,00
	256 ppm	4,38	15,90	38,9	168,00	4,85	7,07	86,60
8	0 ppm	4,44	16,00	39,6	164,00	5,29	9,41	93,70
	256 ppm	4,44	15,60	39,3	164,00	3,91	9,01	83,40
12	0 ppm	4,52	15,60	39,3	175,00	3,07	8,41	85,50
	256 ppm	4,58	15,30	43,1	175,00	2,83	6,05	76,80
24	0 ppm	4,72	11,80	44,8	486,00	1,35	0,24	16,30
	256 ppm	4,76	11,90	45,8	458,00	1,60	0,09	5,75
36	0 ppm	4,70	9,40	40,6	1015,00	1,91	0,09	0,00
	256 ppm	4,68	9,60	40,3	1008,00	1,91	0,00	0,00

Tabela 8. Valores médios de pH, etanol, peso de matéria seca e fresca, porcentagem de nitrogênio, glicogênio, trealose, viabilidade, numa fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem PE-2, com e sem sulfito (400 ppm) a 40° C.

Tempo (h)	Tratamento (NaHSO ₃)	PH	Etanol (%)	Fermento (%)	Proteína (%)	N-vinho (ppm)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	Viabilidade (%)
0	0 ppm	4,52	4,88	25,95	20,13	153,84	14,58	4,98	100,00
	400 ppm	4,60	4,86	26,25	15,31	139,85	10,35	5,56	99,42
3	0 ppm	4,76	5,10	28,10	22,25	148,85	9,65	4,83	99,72
	400 ppm	4,96	5,24	27,80	25,31	160,84	8,46	4,67	99,84
6	0 ppm	4,82	5,36	23,35	23,62	153,84	6,54	5,17	99,13
	400 ppm	5,02	5,42	23,60	24,88	209,79	5,48	5,42	99,67
9	0 ppm	4,92	5,40	23,35	23,62	160,84	4,30	4,93	98,57
	400 ppm	5,12	5,48	23,95	27,12	94,40	2,25	5,99	98,83
12	0 ppm	4,98	5,48	22,60	32,31	104,89	1,93	5,07	94,17
	400 ppm	5,17	5,58	22,90	32,75	83,91	1,81	5,31	98,86
24	0 ppm	5,31	5,74	21,15	30,12	356,64	1,68	1,23	27,24
	400 ppm	5,46	5,82	21,25	31,00	258,74	1,32	0,80	35,61

Tabela 9. Valores médios de etanol, teor de fermento, nitrogênio no vinho e fermento, porcentagem de glicogênio, trealose, glicerol e viabilidade, numa fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem PE-2, à 40° C por 4 horas e depois à 33°C.

Temperatura (° C)	Tempo (h)	Etanol (%)	Fermento (%)	N-vinho (ppm)	N-fermento (%)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	Glicerol (%)	Viabilidade (%)
40	0	3,68	19,80	117,96	6,41	15,89	5,51	0,302	99,50
40	2	4,24	18,62	143,37	7,01	13,33	5,18	0,310	99,79
40	4	4,32	19,19	150,62	6,64	12,42	5,34	0,304	99,36
33	8	4,40	18,77	145,18	6,71	9,23	4,78	0,265	99,59
33	12	4,50	19,30	163,33	7,20	9,84	4,55	0,305	100,00
33	24	4,60	18,21	181,48	7,31	7,08	3,91	0,331	99,06
33	32	4,66	18,09	191,15	7,51	5,17	3,32	0,299	99,90
33	36	4,62	17,96	212,33	7,51	5,14	3,24	0,331	98,05
33	48	4,70	17,81	221,40	7,84	3,75	2,75	0,312	96,54

Tabela 10. Valores médios de etanol, teor de fermento, nitrogênio no vinho e fermento, porcentagem de glicogênio, trealose, glicerol e viabilidade, numa fermentação endógena com *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem PE-2, à 40° C por 6 horas e depois à 33°C.

Temperatura (° C)	Tempo (h)	Etanol (%)	Fermento (%)	N-vinho (ppm)	N-fermento (%)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	Glicerol (%)	Viabilidade (%)
40	0	4.82	19.99	159.70	6.46	14.42	5.04	0,3075	94.49
40	4	5.02	18.89	206.88	6.97	9.62	4.03	0,3205	94.26
40	6	5.14	18.59	206.88	6.97	8.73	4.38	0,3136	94.91
33	8	5.16	18.53	214.14	7.11	9.32	4.54	0,3357	93.71
33	10	5.16	18.31	232.29	7.19	9.02	4.24	0,3339	93.36
33	12	5.16	18.40	261.32	7.33	7.98	4.09	0,3220	91.26
33	24	5.20	18.16	278.26	7.55	7.42	4.11	0,3513	91.83
33	48	5.28	17.66	319.40	7.80	6.05	2.90	0,3361	80.41

ANEXO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela 1. Resultados da análise estatística da fermentação endógena da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 a 40°C, realizada através do programa "SAS".

VARIÁVEL OBSERVADA	EQUAÇÃO	ESTATÍSTICA	R ²	p value
Etanol	$y = 3,47 + 0,307t - 0,001t^2$	F	97%	< 0,0310
Trealose + Glicogênio	$y \text{ (LN)} = - 0,2492 - 0,0743t$	F	86%	< 0,0001
Proteína no vinho	$y = 0,126 - 0,001t + 0,0015t^2$	F	40%	< 0,0368
Proteína no fermento	$y = 35,266 + 0,85t - 0,0201t^2$	F	85%	< 0,0001
Massa seca (ms)	$y = 26,26 - 0,286t + 0,0088t^2$	F	70%	< 0,0005
Glicerol	$y = 0,26 + 0,0028t - 0,00004t^2$	F	87%	< 0,0001
Fermento (%)	$Y = 19,22 - 0,09617t$	F	86%	< 0,0001
Viabilidade	$y = 99,32 + 0,283t - 0,0386t^2$	F	99%	< 0,0001

Tabela 2. Resultados da análise estatística da fermentação endógena da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* SA-1 a 40°C, realizada através do programa "SAS".

VARIÁVEL OBSERVADA	EQUAÇÃO	ESTATÍSTICA	R ²	p value
Etanol	$y = 3,47 + 0,301t - 0,001t^2$	F	97%	< 0,0310
Trealose + Glicogênio	$y \text{ (LN)} = - 0,2492 - 0,07431t$	F	86%	< 0,0001
Proteína no vinho	$y = 0,126 - 0,001t + 0,00015t^2$	F	40%	< 0,0368
Proteína no fermento	$y = 42,29 + 0,77t - 0,15t^2$	F	94%	< 0,0001
Massa seca (ms)	$y = 25,80 - 0,133t + 0,0028t^2$	F	49%	< 0,0127
Glicerol	$y = 0,26 + 0,0028t - 0,00004t^2$	F	87%	< 0,0001
Fermento (%)	$y = 20,35 - 0,145t$	F	98%	< 0,0001
Viabilidade	$y = 91,33 - 0,0055t - 0,055t^2$	F	99%	< 0,0072

Tabela 3. Resultados da análise estatística da fermentação endógena da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 a 40°C, sem aplicação de sulfito (NaHSO₃), realizada através do programa "SAS".

VARIÁVEL OBSERVADA	EQUAÇÃO	ESTATÍSTICA	R ²	p value
Etanol	$y = 3,57 + 0,063t - 0,00172t^2$	F	71%	< 0,1569
Trealose + Glicogênio	$y \text{ (LN)} = - 0,0626 - 0,09351t$	F	96%	< 0,0007
Proteína no vinho	$y = 0,078 + 0,006t + 0,0009t^2$	F	96%	< 0,0068
Proteína no fermento	$y = 24,74 + 1,233t - 0,056t^2$	F	75%	< 0,1246
Massa seca (ms)	$y = 22,98 - 0,013t - 0,00088t^2$	F	56%	< 0,2917
Glicerol	$y = 0,233 + 0,003t - 0,00004t^2$	F	93%	< 0,0171
Fermento (%)	$y = 26,73 - 0,68t + 0,0122t^2$	F	94%	< 0,0152
Viabilidade	$y = 98,033 - 3,89t + 0,018t^2$	F	99%	< 0,0013

Tabela 4. Resultados da análise estatística da fermentação endógena da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 a 40°C, com a aplicação de sulfito (NaHSO₃: 200 ppm) realizada através do programa "SAS".

VARIÁVEL OBSERVADA	EQUAÇÃO	ESTATÍSTICA	R ²	p value
Etanol	$y = 2,98 + 0,097t - 0,00294t^2$	F	97%	< 0,0057
Trealose + Glicogênio	$y \text{ (LN)} = - 0,008 - 0,19669t$	F	99%	< 0,0006
Proteína no vinho	$y = 0,068 + 0,008t + 0,0025t^2$	F	99%	< 0,0012
Proteína no fermento	$y = 29,35 + 2,627t - 0,1263t^2$	F	97%	< 0,0052
Massa seca (ms)	$y = 23,28 - 0,253t + 0,0054t^2$	F	88%	< 0,0395
Glicerol	$y = 0,162 + 0,008t - 0,00018t^2$	F	94%	< 0,0130
Fermento (%)	$y = 26,07 - 0,948t + 0,0182t^2$	F	92%	< 0,0245
Viabilidade	$y = 111,4 - 1,27t + 0,2714t^2$	F	91%	< 0,0274

Tabela 5. Resultados da análise estatística da fermentação endógena da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 a 40°C, com a aplicação de sulfito (NaHSO₃: 400 ppm) realizada através do programa "SAS".

VARIÁVEL OBSERVADA	EQUAÇÃO	ESTATÍSTICA	R ²	p value
Etanol	$y = 3,89 + 0,064t - 0,00148t^2$	F	96%	< 0,0084
Trealose + Glicogênio	$y \text{ (LN)} = 0,10262 - 0,0976t$	F	99%	< 0,0001
Proteína no vinho	$y = 0,11 - 0,007t + 0,00038t^2$	F	53%	< 0,3189
Proteína no fermento	$y = 16,81 + 1,85t - 0,05236t^2$	F	89%	< 0,0381
Massa seca (ms)	$y = 25,39 - 0,23t + 0,00462t^2$	F	97%	< 0,0048
Glicerol	$y = 0,377 + 0,028t - 0,0009t^2$	F	48%	< 0,3701
Fermento (%)	$y = 27,10 - 0,437t + 0,00799t^2$	F	79%	< 0,0964
Viabilidade	$y = 96,94 + 2,12t - 0,19346t^2$	F	99%	< 0,0013

Tabela 6. Valores médios glicogênio, trealose, nitrogênio no vinho e fermento, fermento úmido e viabilidade com os seus respectivos desvios padrões, obtidos em uma fermentação endógena com a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 a 40° C.

Tempo (min)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	N-vinho (ppm)	N-fermento (%)	Fermento (%)	Viabilidade (%)
0	10,68 ± 2,37	7,62 ± 0,39	165,40 ± 10,88	5,65 ± 0,07	19,28 ± 0,06	99,28 ± 0,17
10	8,39 ± 1,71	6,68 ± 1,12	171,17 ± 3,85	5,54 ± 0,12	19,19 ± 0,02	
20	9,35 ± 1,31	7,77 ± 0,70	175,01 ± 7,36	5,40 ± 0,20	19,22 ± 0,13	
30	8,80 ± 1,48	7,45 ± 0,31	227,33 ± 62,57	5,73 ± 0,38	19,57 ± 0,06	
40	7,25 ± 1,00	6,95 ± 0,43	182,71 ± 13,14	5,76 ± 0,19	19,14 ± 0,01	
50	7,78 ± 1,33	8,43 ± 0,81	190,40 ± 7,37	5,87 ± 0,07	18,48 ± 0,43	
60	8,11 ± 0,69	7,31 ± 0,65	194,25 ± 9,68	5,76 ± 0,08	19,48 ± 0,10	
90	9,02 ± 2,76	6,55 ± 0,50	203,87 ± 10,88	5,47 ± 0,63	19,14 ± 0,21	
120	6,31 ± 2,02	5,11 ± 0,53	184,63 ± 26,65	6,12 ± 0,08	18,90 ± 0,09	
150	5,97 ± 0,68	4,39 ± 0,79	186,56 ± 11,54	6,19 ± 0,12	18,79 ± 0,01	
180	5,25 ± 1,18	5,00 ± 0,80	184,63 ± 8,88	6,12 ± 0,08	18,93 ± 0,08	
210	5,40 ± 0,64	4,43 ± 1,16	184,63 ± 8,88	6,23 ± 0,14	18,87 ± 0,01	
270	6,75 ± 0,38	4,45 ± 0,50	265,41 ± 45,94	6,26 ± 0,14	18,68 ± 0,08	99,90 ± 0,15
480	4,95 ± 0,53	6,73 ± 0,87	203,86 ± 14,73	6,59 ± 0,14	18,54 ± 0,13	99,13 ± 0,18
720	3,69 ± 0,53	7,00 ± 1,02	203,87 ± 49,26	6,52 ± 0,14	18,33 ± 0,14	97,10 ± 1,67
1440	1,46 ± 0,49	1,26 ± 0,46	300,03 ± 12,56	7,13 ± 0,08	16,80 ± 0,04	83,87 ± 0,20

Tabela 7. Valores médios de glicogênio, trealose, nitrogênio no vinho e fermento, fermento úmido e viabilidade com os seus respectivos desvios padrões, obtidos em uma fermentação endógena com a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*, SA-1 a 40° C.

Tempo (min)	Glicogênio (%)	Trealose (%)	N-vinho (ppm)	N-fermento (%)	Fermento (%)	Viabilidade (%)
0	18,00 ± 1,45	10,24 ± 1,61	90,98 ± 3,71	6,81 ± 0,11	20,63 ± 0,02	91,94 ± 0,36
10	15,17 ± 1,19	9,71 ± 0,61	79,84 ± 9,35	6,76 ± 0,13	20,43 ± 0,06	
20	15,57 ± 0,92	8,60 ± 0,62	92,84 ± 8,57	6,76 ± 0,05	20,39 ± 0,02	
30	15,46 ± 1,17	8,17 ± 1,07	115,12 ± 10,50	6,76 ± 0,14	20,29 ± 0,06	
40	15,74 ± 0,73	8,62 ± 0,94	109,55 ± 9,34	6,67 ± 0,16	20,24 ± 0,09	
50	15,31 ± 0,52	8,30 ± 0,86	111,40 ± 7,42	6,85 ± 0,09	20,17 ± 0,04	
60	15,42 ± 1,01	8,64 ± 0,45	107,69 ± 6,07	6,87 ± 0,06	20,08 ± 0,03	
90	14,48 ± 1,37	8,37 ± 0,45	120,69 ± 12,68	7,04 ± 0,16	19,97 ± 0,08	
120	12,86 ± 1,64	7,81 ± 0,56	139,26 ± 14,06	7,07 ± 0,04	19,93 ± 0,01	
150	13,62 ± 0,76	7,48 ± 0,49	141,11 ± 9,59	6,94 ± 0,06	20,14 ± 0,02	
180	13,00 ± 1,06	7,27 ± 0,43	120,69 ± 3,71	7,30 ± 0,04	20,04 ± 0,12	
210	12,93 ± 0,74	6,86 ± 0,63	142,97 ± 3,71	7,32 ± 0,14	19,69 ± 0,02	
270	11,76 ± 1,12	6,79 ± 0,57	141,11 ± 7,43	7,32 ± 0,12	19,75 ± 0,01	89,89 ± 3,66
480	11,36 ± 0,56	6,84 ± 0,60	176,39 ± 12,68	7,43 ± 0,13	19,12 ± 0,04	86,42 ± 0,27
720	9,17 ± 0,91	5,94 ± 0,30	202,39 ± 12,68	7,85 ± 0,13	18,53 ± 0,10	84,95 ± 1,12
1440	5,39 ± 0,46	1,73 ± 0,55	347,21 ± 12,68	8,31 ± 0,45	16,96 ± 0,03	59,61 ± 2,83

ERRATA

Na página 83. ANEXO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA, a Tabela 1 deve ser substituída por:

Tabela 1. Resultados da análise estatística da fermentação endógena da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 a 40°C, realizada através do programa "SAS".

VARIÁVEL OBSERVADA	EQUAÇÃO	ESTATÍSTICA	R ²	p value
Etanol	$y = 3,47 + 0,307t - 0,001t^2$	F	97%	< 0,0310
Trealose + Glicogênio	$y \text{ (LN)} = 0,73638 - 0,02849t$	F	94%	< 0,0001
Proteína no vinho	$y = 0,126 - 0,001t + 0,0015t^2$	F	40%	< 0,0368
Proteína no fermento	$y = 35,266 + 0,85t - 0,0201t^2$	F	85%	< 0,0001
Massa seca (ms)	$y = 26,26 - 0,286t + 0,0088t^2$	F	70%	< 0,0005
Glicerol	$y = 0,26 + 0,0028t - 0,00004t^2$	F	87%	< 0,0001
Fermento (%)	$Y = 19,22 - 0,09617t$	F	86%	< 0,0001
Viabilidade	$y = 99,32 + 0,283t - 0,0386t^2$	F	99%	< 0,0001

Na página 84. ANEXO 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA, a Tabela 2 deve ser substituída por:

Tabela 2. Resultados da análise estatística da fermentação endógena da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* SA-1 a 40°C, realizada através do programa "SAS".

VARIÁVEL OBSERVADA	EQUAÇÃO	ESTATÍSTICA	R ²	p value
Etanol	$y = 3,066 + 0,041t - 0,001t^2$	F	98%	< 0,0238
Trealose + Glicogênio	$y \text{ (LN)} = 1,24 - 0,04325t$	F	96%	< 0,0001
Proteína no vinho	$y = 0,063 + 0,0057t + 0,00002t^2$	F	97%	< 0,0001
Proteína no fermento	$y = 42,29 + 0,77t - 0,15t^2$	F	94%	< 0,0001
Massa seca (ms)	$y = 25,80 - 0,133t + 0,0028t^2$	F	49%	< 0,0127
Glicerol	$y = 0,277 + 0,0042t - 0,00012t^2$	F	68%	< 0,0006
Fermento (%)	$y = 20,35 - 0,145t$	F	98%	< 0,0001
Viabilidade	$y = 91,33 - 0,0055t - 0,055t^2$	F	99%	< 0,0072