

UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de
*Saccharomyces cerevisiae***

DAYVISON SOARES FERREIRA

RECIFE-PE

Março de 2015

DAYVISON SOARES FERREIRA

**Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS ANTÔNIO DE MORAIS JÚNIOR

RECIFE-PE

Março de 2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Ferreira, Dayvison Soares

Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae*/ Dayvison Soares Ferreira– Recife: O Autor, 2016.

37 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Fermentação 3. Fisiologia I. Moraes Júnior, Marcos Antonio (orientador) II. Título

579.563

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-091

**Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de
*Saccharomyces cerevisiae***

Dayvison Soares Ferreira

Aprovado em 31 de março de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior (Depto. de Genética/UFPE)

Prof^a. Dr. Márcia Vanusa da Silva (Depto. de Bioquímica/UFPE)

Prof. Dr. Will de Barros Pita (Depto. de Antibióticos/UFPE)

AGRADECIMENTOS

À minha família pela educação, valores, amor e confiança depositados em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior, pela oportunidade dada para a realização deste trabalho, bem como pelo empenho em transmitir conhecimentos e estímulos durante toda a dissertação.

Ao João Assis Scavuzzi Menezes pela confiança e apoio na realização do projeto.

À equipe FERMENTA pelos momentos compartilhados nessa jornada.

À Miriri Alimentos e Bioenergia por ceder as amostras para a realização do trabalho.

À Usina Petribu pela colaboração na aquisição das amostras.

Aos meus amigos por fazerem parte da minha vida e dividirem seus momentos comigo.

Ao CETENE/MCT, destacando: Raquel, Isack, Kelvin e Esteban, pela estrutura oferecida para a realização das análises e pelos conselhos e ajudas dadas nos momentos difíceis.

A CAPES pelo suporte financeiro oferecido.

À coordenação do Centro de Ciências Biológicas que ajudaram no esclarecer e orientar as exigências para a realização do projeto.

Aos meus amigos do mestrado: Paula, Daniel, Cláudio, Cláudia, Rafael, Gabriel, Monially, Dayanna e Ana Livia pelos momentos vivenciados nesses anos.

Aos amigos do LABEM por todo o companheirismo e contribuição dada na realização do projeto.

Dedico este trabalho a minha família: minhas tias Uiaracira e Iracema por terem dedicado suas vidas para minha criação e ao meu irmão Diorginis pela amizade e apoio, sendo muitas vezes um “pai” para mim.

“A dor é inevitável,
o sofrimento é opcional”.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A fermentação alcoólica é um processo amplamente usado no setor sucroalcooleiro brasileiro que usa a cana de açúcar como a principal matéria prima e a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* como agente fermentativo. Muito se conhece sobre o funcionamento da fermentação e as diversas variáveis físicas, químicas e biológicas a que ela está sujeita. No entanto, dentre essas variáveis, o papel da suplementação mineral ainda não foi bem esclarecido, fato que se deve as variações na composição química das matérias-primas decorrentes do tipo de solo, variedade da cana de açúcar e suas condições de cultivo. Sabe-se que o uso inadequado da suplementação mineral pode diminuir o rendimento fermentativo, além de causar toxicidade celular nas células de levedura do processo. Por isso, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do magnésio e do cobre no metabolismo de *S. cerevisiae*, íons esses comumente usados nas suplementações minerais. As amostras de caldo de cana e melão utilizadas no estudo foram coletadas em destilarias localizadas na Paraíba e em Pernambuco, respectivamente. Estes meios foram fracionados em duas amostras, uma para a análise da composição mineral de Cu^{++} e Mg^{++} no Instituto de Tecnologia de Pernambuco e a outra para a análise do crescimento celular e realização dos ensaios fermentativos para avaliação dos metabólitos produzidos, como glicerol, ácidos e álcool a partir dos açúcares presentes nos meios. Todos os ensaios foram realizados com a linhagem industrial JP1 da *S.cerevisiae* por ela ser utilizada com maior frequência em fermentações industriais da região Nordeste. Após os ensaios, constatou-se que o magnésio tem um papel importante no direcionamento metabólico de *S.cerevisiae*, estimulando a rota fermentativa da levedura e inibindo a produção de biomassa pela célula. Ao se analisar o ensaio fermentativo, verificou-se que os nas amostras de caldo de cana suplementados apresentaram um maior rendimento fermentativo, porém nas amostras de melão suplementadas, houve uma redução no rendimento fermentativo. Quanto à toxicidade mineral para a levedura, nenhum dos dois minerais testados afetou a viabilidade e o brotamento celular, estas permanecendo com valores $> 95\%$ e $>5\%$, respectivamente 20 horas após o término da fermentação. Ao compararmos o efeito do magnésio em diferentes meios de cultura e com diferentes minerais (cálcio e manganês) além do cobre, concluímos que a concentração do magnésio possui uma grande influência no direcionamento metabólico de *S. cerevisiae*, mais do que a própria concentração mineral no meio.

Palavras chave: fermentação, suplementação mineral, magnésio, cobre.

ABSTRACT

The alcoholic fermentation is a widely used process in the Brazilian sugar and ethanol industry that uses sugarcane as the main raw material and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* species as fermentation agent. Much is known about the functioning of fermentation and the several variables physical, chemical and biological to which it is subject. However, among these variables, the role of mineral supplementation is not yet well understood, a fact that is due to the variations in the chemical composition of raw materials resulting from soil type, variety of sugarcane and your cultivation. It is known that misuse of mineral supplementation can reduce the fermentative yield and cause cell toxicity in the process the yeast cells. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of magnesium and copper in the metabolism of *S. cerevisiae*, these ions commonly used in the mineral supplementation. Samples of sugarcane juice and molasses used in the study were collected in distilleries located in Paraíba and Pernambuco, respectively. These medium were fractionated into two samples, one for analyzing the mineral Cu ++ and Mg ++ composition in Instituto de Tecnologia de Pernambuco and another for analysis of cell growth and carrying out fermentation test for evaluating the produced metabolites such as glycerol, acids and alcohol from the sugars present in the medium. All assays were performed with the JP1 industrial strain of *S. cerevisiae* because it is used more frequently in industrial fermentations in the Northeast. After the tests, it was found that magnesium has an important role in the metabolic targeting of *S. cerevisiae*, stimulating the fermentation route and inhibiting yeast biomass production by the cell. When analyzing the fermentation test, it was found that the sugarcane juice supplemented samples exhibited an increased fermentation yield, but in molasses supplemented samples, there was a reduction in fermentation yield. As the mineral toxicity to yeast, neither tested mineral affected cell viability and budding, these remaining values with > 95% and > 5%, respectively, 20 hours after fermentation. Comparing the effect of Mg in different culture media with different mineral (calcium and manganese) in addition to copper, we conclude that the concentration magnesium has a great influence on the metabolic *S. cerevisiae* targeting more than the actual mineral concentration medium.

Keywords: fermentation, mineral supplements, magnesium, copper.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Três tipos de variedades de cana de açúcar cultivadas no Brasil (da esquerda para a direita): RB835089, propícia para corte automatizado; RB845257, para solos com alta disponibilidade em água; RB835486, ideal para solos com baixa fertilidade (adaptado de UDOP, 2015).....04
- Figura 2:** Células de *Saccharomyces cerevisiae* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura formando brotos, principal meio de reprodução assexuada da espécie (adaptado de MASUR, 2015).....05
- Figura 3:** Fluxograma da produção de açúcar e etanol de cana (adaptado de SANTOS, 2011).....06
- Figura 4:** Esquema geral da rota fermentativa e respiratória em *S.cerevisiae* (adaptado de REOCITIES, 2009).....07
- ### Capítulo 1
- Figura 1.** Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melão (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de magnésio.....31
- Figura 2.** Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melão (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de cobre.31
- Figura 3.** Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melão (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de magnésio e cobre.32
- Figura 4.** Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melão (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de cálcio.32
- Figura 5.** Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melão (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de manganês.33
- Figura 6.** Crescimento relativo das células de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes meios com suplementação de magnésio, cobre, cálcio e manganês.33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química do caldo de cana.....	09
Tabela 2: Teores de minerais em uma amostra de 100g de caldo de cana de açúcar.....	11
Tabela 3: Teores de minerais em uma amostra de 100g de melaço de cana de açúcar.....	12
Tabela 4: Constituintes inorgânicos da levedura.....	13

Capítulo 1

Tabela 1: Concentração dos minerais nos substratos.....	27
Tabela 2: Parâmetros de fermentação de caldo de cana (CC) e caldo de cana suplementado com cobre e/ou magnésio.....	28
Tabela 3: Parâmetros de fermentação de melaço (ML) e melaço suplementado com cobre e/ou magnésio.....	28
Tabela 4: Valores percentuais da viabilidade e brotamento celular de <i>S.cerevisiae</i> sem e com suplementação mineral em caldo de cana de açúcar.....	29
Tabela 5: Valores percentuais da viabilidade e brotamento celular de <i>S.cerevisiae</i> sem e com suplementação mineral em melaço de cana de açúcar.	29
Tabela 6: Valores de pH das amostras sem e com suplementação mineral submetidas a fermentação.....	30

LISTA DE ABREVIACOES

ATP	Adenosine triphosphate
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CO₂	Dióxido de carbono
D.O	Densidade ptica
HPLC	High-performance liquid chromatography
IAA	Instituto de Aar e lcool
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IR	ndice de refração
ITEP	Instituto de Tecnologia de Pernambuco
JP1	Linhagem 1 da usina Japung
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced
pH	Potencial hidrogeniônico
RIDESA	Rede Intrauniversitria para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
WLN	Wallerstein Laboratories Nutrient Agar
YNB	Yeast nitrogen base
YPD	Yeast extract peptone dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Histórico.....	14
2.2 A cana de açúcar.....	15
2.3 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.4 Produção industrial de etanol.....	17
2.5 Fermentação alcoólica.....	19
2.6 Qualidades da matérias-prima para fermentação.....	20
2.7 Suplementação mineral.....	22
2.8 Magnésio e <i>S.cerevisiae</i>	24
2.9 Cobre e <i>S.cerevisiae</i>	24
2.10 Considerações.....	25
REFERÊNCIAS	26
OBJETIVOS	31
Objetivos gerais.....	31
Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO I.....	32

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a fermentação alcoólica se destaca no cenário econômico do país desde a criação do Programa Nacional do Alcool (Pró-álcool), tendo a cana-de-açúcar como a principal fonte de matéria-prima. Apesar dos diversos avanços feitos nesta área, principalmente no que se refere à engenharia do processo, ainda não se conhece totalmente os efeitos da qualidade da matéria-prima sobre o processo fermentativo, mais especificamente a sua composição nutricional. O entendimento desses efeitos poderá contribuir para a melhoria do processo, pois permitirá uma melhor seleção da cana de açúcar e um melhor entendimento sobre a suplementação nutricional e quando ela se faz necessária. Como resultado, o gerenciamento agrícola e industrial será mais eficaz, possibilitando uma maior eficiência fermentativa do processo.

O processo inicia na coleta da cana, pois o tipo de coleta (manual ou automatizada) e o tempo decorrido para o seu processamento podem interferir na qualidade do caldo que será usado para a fermentação. Após esta etapa, a cana é submetida a uma etapa de extração do caldo. O mosto gerado pode variar sua composição dependendo do tipo de solo em que a cana foi cultivada, da variedade da cana usada e do tipo de suplementação nutricional recebida. Obtido o caldo, ele será tratado para a remoção de impurezas e possíveis contaminantes para então ser utilizado juntamente com células de leveduras selecionadas para a fermentação alcoólica. Como o processo fermentativo está sujeito a variações físico-químicas tais como pH do meio, temperatura da dorna, pressão osmótica pela quantidade de solutos no mosto, aumento na concentração de álcool, presença de micro-organismos contaminantes, torna-se difícil identificar o papel dos íons metálicos nesse cenário tão complexo. Dentre os vários íons presentes nos caldos de cana, o magnésio e o cobre aparecem em destaque na literatura e em relatórios industriais como nutrientes importantes na promoção da fermentação alcoólica, o que levou a escolha desses dois íons para o estudo em relação aos demais.

Dessa forma é de grande importância saber de que modo o magnésio e o cobre ajudam as leveduras a produzirem mais etanol, bem como as suas dosagens ideais e suas concentrações máximas e mínimas nos meios de caldo de cana e melaço. Este estudo servirá como referência para a elaboração de suplementos minerais, visando à adequação deles com a concentração de minerais já existentes no caldo ou melaço de modo a garantir a dosagem ideal de nutrientes para as células de levedura.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

Os produtos oriundos da fermentação são conhecidos desde a Antiguidade. Existem registros que povos do Mediterrâneo como egípcios, assírios, sumérios e babilônios, bem como chineses e índios da América Central consumiam alimentos fermentados por volta de 6.000 a 1000 a.C. Esses povos usavam a fermentação para produção de cerveja, vinagre, iogurte, queijos, entre outros produtos, porém desconheciam os agentes responsáveis pelo processo e tinham pouco controle sobre ele (Pacheco, 2010).

Passado algum tempo de estudos sobre o assunto, atribui-se a Benchner, no século XVII, a afirmativa de que apenas líquidos açucarados eram capazes de entrar em fermentação alcóolica. Ele propôs esta teoria, mesmo contrariando alguns pesquisadores que o antecederam, julgando erroneamente que era necessária a presença de ar para a produção de álcool, pois ele considerava a fermentação um processo semelhante à combustão. Neste período, os estudos sobre fermentação relacionavam apenas os compostos iniciais e os produtos obtidos, até que Black postulou que gás carbônico e álcool etílico eram os únicos produtos formados do açúcar na fermentação alcóolica (Menezes, 1980).

Foi em meados do século XVII que com a invenção do microscópio por Antonie Van Leeuwenhoek, se descobriu a existência de micro-organismos invisíveis a olho nu, dando início a um intenso estudo sobre esses novos seres. Contudo, só em 1876, Louis Pasteur provou que a fermentação era consequência da ação de micro-organismos específicos, ao invés da teoria vigente da fermentação na época, que afirmava ser um processo puramente químico. Além disso, ele constatou que as leveduras expostas a uma alta oxigenação produziam água e dióxido de carbono, ao invés do álcool e dióxido de carbono (Martins, 2009).

Posteriormente, em 1897, Eduard Buchner mostrou ser possível a conversão de açúcar em álcool, utilizando células de levedura maceradas, ou seja, na ausência de organismos vivos, provando que a fermentação é uma sequência de reações químicas e poderiam ocorrer fora das células vivas. Já no século XX as grandes guerras mundiais motivaram a produção em escala industrial de produtos advindos de processos fermentativos. A partir da primeira guerra, a

Alemanha, que necessitava de grandes quantidades de glicerol para a fabricação de explosivos, desenvolveu através de Neuberg, um processo microbiológico para obtenção deste álcool, tendo chegado a produzir 1.000 toneladas do produto por mês. Por outro lado, a Inglaterra produziu em grande quantidade a acetona para a fábrica de munições, tendo essas atividades microbiológicas contribuído para o desenvolvimento dos fermentadores industriais e técnicas de controle de infecções (Villen, 2009).

No Brasil, o etanol produzido pela cana de açúcar se desenvolveu basicamente pela necessidade de se diminuir a dependência do petróleo importado. Já, no início do século XX foram implementadas ações para inserir o etanol na matriz energética do país, iniciando em 1925 a primeira experiência com etanol brasileiro. Em 1933 foi criado o Instituto de Açúcar e Álcool (IAA) e pela lei nº 737, tornou-se obrigatório a mistura de álcool na gasolina. Contudo, a medida de maior impacto no consumo e produção de álcool pelo país, foi a criação do programa Proálcool em 1975, tornando o Brasil naquele momento e por muitos anos o maior produtor mundial de etanol (Leite e Cortez, 2008)

2.2 A cana de açúcar

É a principal matéria-prima brasileira usada no setor sucroalcooleiro para a produção de etanol. Sua produção concentra-se em alguns estados da região Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, sendo o estado de São Paulo o maior produtor nacional de cana (Unica, 2015). A *Saccharum officinarum*, nome científico da cana de açúcar, é uma monocotiledônea da família das gramíneas, sendo que os cultivares atuais são híbridos, principalmente constituídos das espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. robustu* (MATSUOKA, 1996). É uma planta C4 com elevada capacidade de fotossíntese, possuindo maior desempenho fotossintético em altas temperaturas (30 - 40°C) comparado as plantas C3, pois necessitam de concentrações menores de CO₂ (TAIZ e ZEIGER, 2004). Composta por uma raiz fasciculada, a cana possui um colmo (um tipo de caule em que os nós e entrenós são bem visíveis) que possui pouco crescimento em espessura, folhas paralelinérvias (nervuras paralelas entre si) com bainhas desenvolvidas e flores do tipo inflorescência (Raven, 2007).

Devido a sua importância no cenário da fermentação alcoólica industrial, essa espécie foi alvo de vários estudos de melhoramento genético a partir de cruzamentos assistidos e até mais recentemente envolvendo modificação por engenharia genética. Isto tudo com o intuito de torná-la mais adaptada às variações do clima, solo e condições de cultivo. O objetivo era obter melhorias na cana de açúcar, tanto no campo, como na usina e essas canas provenientes do cruzamento de tipos distintos de cana, chamadas de variedades, seriam produzidas para atender a extensa área territorial

cultivável para cana de açúcar e suas singularidades (RIDESA, 2010). Neste cenário, vários centros de estudo desenvolveram canas híbridas, como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), a Copersucar, a Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e a Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA), que se destaca na produção de novas variedades de cana (figura 1), contribuindo para maior produtividade das lavouras. No último levantamento de dados realizado em 2012 as variedades RIDESA ocupavam 75% das áreas cultivadas de cana do país (RIDESA, 2015).



Figura 1: Três tipos de variedades de cana de açúcar cultivadas no Brasil (da esquerda para a direita): RB835089, propícia para corte automatizado; RB845257, para solos com alta disponibilidade em água; RB835486, ideal para solos com baixa fertilidade (UDOP, 2015).

2.3 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Pertencente ao grupo dos Ascomycetos, este fungo é um organismo unicelular com uma forma celular oval, elíptica ou esférica, desenvolve-se bem em temperaturas entre 20 a 40°C (mesófilos), reproduz-se principalmente de forma assexuada por brotamento, podendo também se reproduzir de forma sexuada (figura 2). Possui uma parede celular que ajuda na proteção do organismo a estresses ambientais e devido à ausência de flagelo ele é um ser imóvel, alimentando-se da matéria orgânica presente no meio, ou seja, um organismo saprófita (Alexopoulos, 1996). É considerado um micro-organismo aeróbio facultativo, pois tem condições de se ajustar metabolicamente tanto em aerobiose, transformando o açúcar em biomassa, CO₂ e água ou em anaerobiose, convertendo maior parte do açúcar em etanol e CO₂ (Santos 2010).

Devido a seu fácil cultivo e manipulação genética, além de não ser patogênico e ter um rápido crescimento, a *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um organismo modelo para estudos

da biologia dos eucariotos. Já as características que a tornam interessantes para os processos industriais, de acordo com Oura (1995) são: a capacidade de se desenvolver em substrato barato e facilmente disponível; facilidade de obtenção e multiplicação; utilização de nutrientes nas suas formas mais simples; pequena exigência de água e de área; possibilidade de cultivo independente do ambiente e formação de produtos nutritivos e de bom valor comercial. Uma característica metabólica, que lhe confere o status de micro-organismo fermentador por excelência, é a sua capacidade de captar e assimilar as hexoses pela via glicolítica e desviar os intermediários desta via para a via fermentativa de produção de etanol. A alta atividade das enzimas destas vias assegura este fluxo metabólico intenso. Durante esse processo, as células necessitam de vários nutrientes, que aumentam eficiência na transformação de açúcar em álcool, além de influenciarem também no crescimento e multiplicação celular. Dentre os principais nutrientes requeridos estão o nitrogênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco, manganês e ferro (Amorim, 2005).

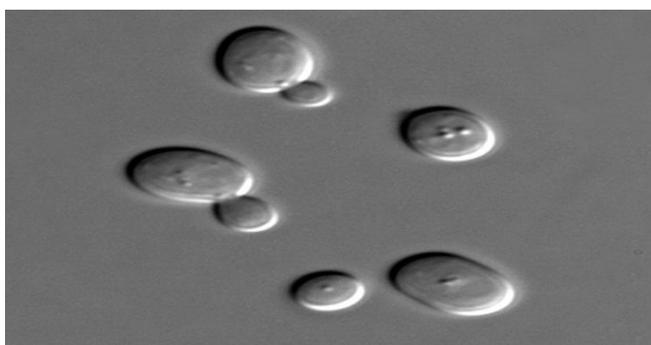


Figura 2: Visualização por microscopia eletrônica de células de *S.cerevisiae* formando brotos, principal meio de reprodução assexuada da espécie (MASUR, 2015).

2.4 Produção industrial de etanol no Brasil

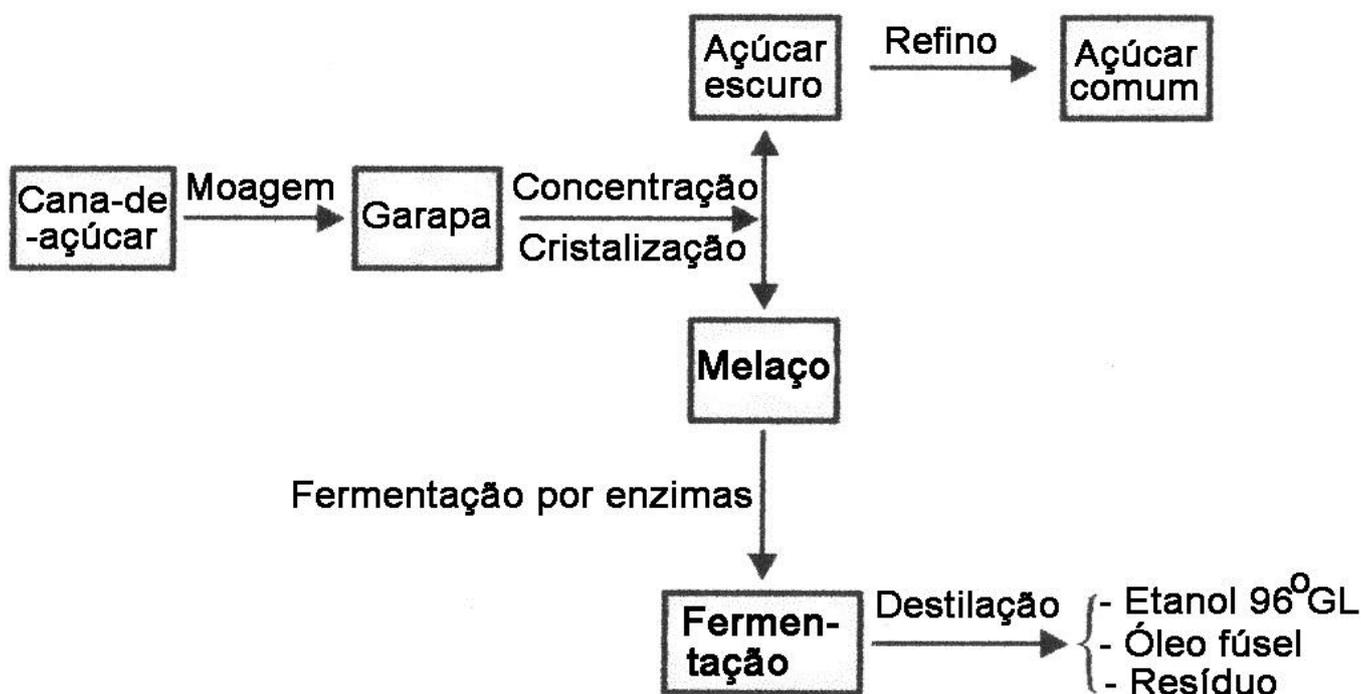
Desde o início do século XX, o etanol é produzido por indústrias pelo processo de fermentação. Hoje, cerca de 400 usinas e destilarias esmagam milhões de toneladas de cana por safra, produzindo em média 30 bilhões de litros de etanol e 40 milhões de toneladas de açúcar. Nas três últimas décadas, ocorreram várias inovações na forma de coleta da cana, em sua amostragem, no processo de fermentação utilizado e nos materiais das dornas usadas na produção do álcool nas destilarias do Brasil, possibilitando melhorias na eficiência da planta industrial e na competitividade econômica do setor sucroalcooleiro (Amorim *et al.*, 2011).

O etanol é um combustível líquido obtido principalmente pela fermentação de carboidratos derivados da cana de açúcar. Desta matéria-prima, podem-se obter dois meios industriais para a produção de etanol, o caldo de cana e o melaço, um subproduto da produção de açúcar que deve ser

diluído para servir como substrato do processo fermentativo. Ao usar o melaço como meio fermentativo, o produtor tem uma redução no custo total da produção, pois ao usar um subproduto há uma redução no uso da matéria prima, além disso, podem-se obter melhores resultados na utilização de leveduras eficientes na conversão do substrato em produto (Schmidell, 2005).

Devido a sua importância na eficiência do processo, a matéria-prima usada nas industriais de açúcar e álcool é alvo de um controle rigoroso na qualidade e no manejo, tanto em campo como na indústria (Caldas, 1998). Mesmo o Brasil possuindo uma moderna estrutura no que diz respeito à produção de etanol, existem muitos questionamentos em relação à influência da matéria-prima na fermentação alcohólica, sendo um desses a possível presença de inibidores fermentativos nos substratos de caldo de cana e melaço (Tossetto, 2008).

De acordo com a disponibilidade da matéria-prima, as fábricas brasileiras produtoras de etanol são divididas em autônoma e dependente ou anexa (Campos, 1980). A autônoma tem basicamente o caldo de cana como meio para fermentação, enquanto a anexa depende do melaço proveniente da fabricação de açúcar. Independente do tipo de fábrica, as etapas para a obtenção do produto final são as mesmas (figura 3), diferindo apenas a matéria-prima a ser utilizada.



2.5 Fermentação alcohólica

Figura 3: Fluxograma da produção de açúcar e etanol de cana (adaptado de SANTOS, 2011).

38

parcialmente oxidado das hexoses, e que normalmente serve para reestabelecer o balanço $NAD^+/NADH$ (Steckelberg, 2001). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui o metabolismo mais eficiente para a realização deste processo, tanto por conseguir atingir uma eficiência de 90%

na conversão de açúcar em etanol em anaerobiose quanto em conseguir rendimentos bem expressivos, em torno de 80 a 85% de conversão açúcar para etanol, mesmo em aerobiose. No entanto, produção de outros compostos além do etanol e o consumo específico de ATP (adenosina trifosfato) para o crescimento celular, podem reduzir essa eficiência fermentativa (figura4) (Teh e Lutz, 2010). Por isso, muitos estudos são realizados na compreensão do metabolismo central do carbono em *S. cerevisiae* para determinar os subprodutos do tipo C1 (CO₂), C2 (etanol e acetato), C3 (piruvato e glicerol) e C4 (ácidos orgânicos, representados pelo ácido fumárico, málico e succínico) (Otero *et al.*, 2007).

O processo fermentativo ocorre na ausência de oxigênio ou com sua presença em concentrações altas de glicose, neste caso devido à inibição da respiração em *S. cerevisiae* (Esposito e Azevedo, 2004). Essas altas concentrações de glicose são comumente encontradas no caldo de cana e no melaço. O rendimento máximo teórico na fermentação anaeróbica corresponde a produção de 0,51g de etanol e 0,49g de CO₂ para cada grama de glicose assimilada pela via glicolítica em amostras de caldo de cana. No entanto, nas fermentações industriais há o aumento da biomassa e também a produção de glicerol durante o processo, fato que diminui a quantidade de glicose que seria convertida nos produtos finais, correspondendo a uma conversão de aproximadamente um grama de glicose em 0,46g de etanol e 0,44g de CO₂ (Menezes, 2012).

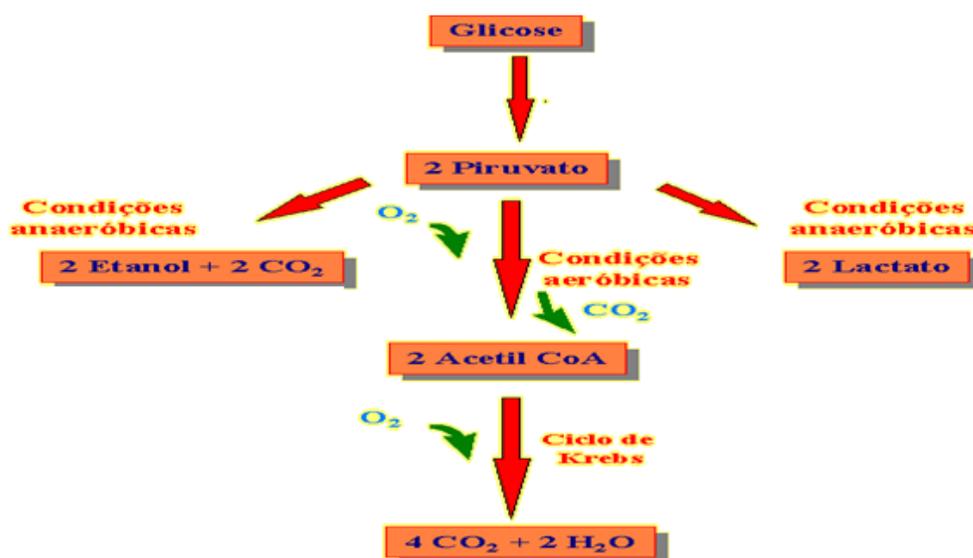


Figura 4: Esquema geral da rota fermentativa e respiratória em *S. cerevisiae* (adaptado de REOCITIES, 2009).

, 0

caldo de cana e o melaço e como agente fermentador, linhagens de *S. cerevisiae* adaptadas às condições da fermentação industrial. As células destas leveduras a cada fermentação são separadas por centrifugação e reutilizadas no próximo processo, após um tratamento com ácido sulfúrico para

diminuição da carga bacteriana. A elevada concentração de açúcares redutores encontrada nessas amostras, temperaturas entre 33°C e 35°C e um ambiente anaeróbico favorecem uma maior eficiência fermentativa e conseqüentemente, uma maior produção de etanol. No sistema adotado pela maioria das usinas do Brasil, a fermentação é de curta duração (6 a 10h), permitindo a reutilização das leveduras cerca de três vezes ao dia durante o período de aproximadamente 200 dias de atividade fermentativa (Wheals *et al.*, 1999).

Em condições industriais, as amostras de melação e de caldo de cana, esta última chamada sofrem rapidamente ação da enzima invertase, a hidrolase que quebra as moléculas de sacarose em glicose e frutose. A glicose é o substrato de preferência das células de *S. cerevisiae* e sua concentração no meio pode ser determinante para o tipo de metabolismo apresentado pela levedura, se em baixas concentrações e na presença de oxigênio o metabolismo tende a ser oxidativo ou respiratório; se em grande quantidade e independente da disponibilidade de oxigênio o metabolismo tende a ser redutivo ou fermentativo (efeito Crabtree). Isso é mediado por duas vias de sinalização da glicose: a Rgt2/Snf3 responsável pela captação da glicose e a Snf1/Mig1 via que regula negativamente genes envolvidos na oxidação da glicose e do uso de outras fontes de açúcares (Eide, *et al.*, 2005).

Além da fonte de carbono, há diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, teor de oxigênio, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e biológicos (composição da população microbiana) que afetam a eficiência da conversão de açúcar em etanol (Lima *et al.*, 2001). Por isso é de suma importância o controle do máximo de parâmetros possíveis, a fim de garantir uma fermentação de qualidade.

2.6 Qualidade da matéria-prima para fermentação

A conversão de açúcar em álcool é a atividade primária das leveduras durante a fermentação, envolvendo diretamente processos de transporte de açúcares através da membrana plasmática, catabolismo de açúcares, armazenamento de reservas de carbono, geração de energia e a produção de etanol (Gibson *et al.*, 2008). O conteúdo e a composição desses carboidratos influenciam o metabolismo das leveduras, assim como a concentração e qualidade do produto final (Boulton e Quain, 2001).

O preparo dos mostos deve ser feito com alguns cuidados, principalmente no que se refere à concentração de açúcares totais e sua relação com sólidos solúveis, acidez total e pH. Em alguns casos pode ser necessária a suplementação de nutrientes, adição de anti-sépticos e aumento da

temperatura para se obter rendimentos satisfatórios. Já o preparo do mosto de melaço é simples, pois constitui apenas a correção dos açúcares totais (todos os açúcares encontrados no mosto de fermentação como sacarose, glicose e frutose) por meio de diluição (EMBRAPA, 2011).

Para possibilitar um bom desempenho fermentativo, o mosto deve estar com o pH na faixa entre 4,5 a 5 e a uma temperatura entre 32 a 34° C, pois estas condições favorecerem uma melhor atividade das células de leveduras.

Tabela 1: Composição química do caldo de cana.

Componente	(%) em sólidos solúveis
Açúcares	75-92
Sacarose	70-88
Glicose	2,0-4,0
Frutose	2,0-4,0
Sais	3,0-4,5
De ácidos inorgânicos	1,5-4,5
De ácidos orgânicos	1,0-3,0
Ácidos orgânicos	1,5-5,5
Ácidos carboxílicos	1,1-3,0
Aminoácidos	0,5-2,5
Outros não açúcares orgânicos	-
Proteínas	0,5-0,6
Amido	0,001-0,100
Gomas	0,30-0,60
Ceras, lipídeos e fosfolipídios	0,05-0,15
Não identificados	3,0-5,0

Fonte: SOUZA, 1988; CHEN; CHOU, 1993.

2.7 Suplementação mineral

A composição do caldo de cana é complexa e varia bastante de acordo com a região e a variedade da cana (Tabela 1). O caldo é um líquido viscoso, opaco, de cor variando de amarela até um verde escuro, no qual partículas menores de 1µm de diâmetro (sacarose, glicose e sais minerais)

estão solubilizadas no meio e partículas entre 1 a 10 μ m de diâmetro (proteínas, ceras, gomas e impurezas) ficam em suspensão (Payne, 1989).

Além das fontes de carbono (sacarose, glicose e frutose), compostos inorgânicos e compostos orgânicos, como vitaminas (A, C e complexo B), aminoácidos e ácidos orgânicos formam juntamente com a água o típico caldo de cana. Esses ácidos orgânicos são os responsáveis pelo pH do caldo entre 4 e 5,5. Os compostos inorgânicos presentes no caldo são fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, potássio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em menores concentrações, sendo todos necessários para suprir as exigências nutricionais das leveduras durante a fermentação alcoólica industrial, influenciando seu crescimento e sua eficiência fermentativa (Menezes, 2012).

Os minerais presentes no caldo consistem de componentes dissolvidos em água sob a forma de íons, com exceção de alguns minerais de sílica que se encontram na forma de sólidos (Walford, 1996). Vários parâmetros estão envolvidos na determinação da composição mineral do caldo de cana, como a variedade de cana, tipo de solo, as estratégias de fertilização, as condições climáticas, o nível de maturidade da cana, do tipo de colheita, período de tempo entre a queima, corte e processamento, tipos de conteúdo e de palha da cana e também pelo uso ou não de fertirrigação com vinhaça (Basso, 2011). Essa composição mineral difere um pouco entre caldo (Tabela 2) e melaço (Tabela 3), devido o processo de desidratação que ocorre no melaço, tornando a amostra mais concentrada (Nogueira, 2009).

Apesar do teor de cinzas no caldo de cana ser um pouco constante, a sua composição mineral pode variar bastante, dependendo da fonte da matéria-prima. Com intuito de diminuir estas diferenças, muitas destilarias adicionam melaço no caldo, o que é mais recomendado já que algumas amostras têm nível nutricional deficiente e o melaço geralmente contém altas concentrações de minerais na sua composição (Souza *et al.*, 2014). Apesar da importância, a composição mineral em caldos de cana e melaço utilizada nas destilarias do Brasil é muitas vezes negligenciada pelos produtores. Diversos são os minerais importantes na nutrição das leveduras, possibilitando um metabolismo e crescimento celular adequado para as células. Dentre esses, o potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, zinco e cobre são minerais essenciais, de alguma maneira, para o metabolismo fermentativo (Walker, 2004).

Para produtores de etanol que procuram melhorar o rendimento do processo, a suplementação mineral é de grande importância, mas isso só pode ser feito corretamente se há o entendimento sobre a influência dos minerais sobre a fisiologia da célula (Walker, 1996). Isto se faz necessária para a correção dos níveis adequados de macro e micronutrientes no meio para o

funcionamento do metabolismo celular, como também para a manutenção da viabilidade celular frente às condições adversas do processo, tais como instabilidade de temperatura, diminuição do pH do meio, presença de inibidores (álcool, fenóis), desenvolvimentos de micro-organismos contaminantes e alteração no equilíbrio iônico (Zinnai *et al.*, 2012). Íons metálicos, principalmente os cátions divalentes são necessários para a ativação de várias enzimas glicolíticas, por exemplo a piruvato descarboxilase, de maneira que a deficiência desses cátions nos meios industriais pode comprometer a conversão de açúcar em etanol, produzindo uma fermentação lenta ou e incompleta (Walker, 2006).

Tabela 2: Teores de minerais em uma amostra de 100g de caldo de cana de açúcar.

	Fe	K	P	Na	Cu	Mg	Zn	Mn	Ca
CE1	2,3	7,1	1,9	0	0,45	12	0,14	0,63	31
CE2	0,12	27	1,1	0	0,02	9,4	0,06	0,25	14
CR1	2,9	42	3,7	0,45	0,04	17	0,11	0,54	28
CR2	0,06	17	1,4	0	0,03	12	0,09	0,41	21
MC	0,22	63	52	0	0,02	25	0,14	0,34	4

CE1: caldo de cana cultivado no Espírito Santo, amostra 1; CE2: caldo de cana cultivado no Espírito Santo, amostra 2; CR1: caldo de cana cultivado no Rio de Janeiro, amostra ; CR2: caldo de cana cultivado no Rio de Janeiro, amostra 2; e MC: média dos teores minerais de 14 amostras dos dois estados (adaptado de NOGUEIRA, 2009).

Tabela 3: Teores de minerais em uma amostra de 100g de melão de cana de açúcar.

	Fe	K	P	Na	Cu	Mg	Zn	Mn	Ca
MC	3,37	288	57	23,7	0,37	94	0,61	1,8	36
MI	0,64	244	19	0,91	0,06	86	0,48	1,2	204
CV	79	68	79	117	235	44	52	37	40

MC: média dos teores de minerais em 10 amostras de melaços comerciais; MI: média dos teores de minerais em 10 amostras de melaços industriais CV: coeficiente de variação (adaptado de NOGUEIRA, 2009).

2.8 Magnésio e *S.cerevisiae*

O Mg^{++} é o segundo cátion mais abundante nos micro-organismos, portanto é denominado como um macronutriente, ou seja, um nutriente exigido em grande quantidade pela célula (Jones e Gadd, 1990). Essa alta demanda por Mg^{++} é consequência de seu papel como cofator em mais de 300 enzimas, participando de várias funções bioquímicas e fisiológicas essenciais das leveduras, dentre elas no crescimento, divisão celular, ativação enzimática, estimulação da síntese de ácidos graxos essenciais, regulação dos níveis iônicos celulares, manutenção da integridade e permeabilidade da membrana. (Blackwell, 1997) O magnésio também participa na proteção da levedura contra estresses ambientais durante a fermentação, como os causados pelo etanol, pelas altas temperaturas ou pelo estresse osmótico. Além disso, há forte correlação entre o acúmulo desse íon por leveduras e o progresso da fermentação (Walker, 1998). Uma evidência que reforça essa correlação é a capacidade dos íons Mg^{++} de diminuir a permeabilidade da membrana plasmática submetidas a estresse etanólico, ou seja, aumentando a tolerância a etanol das células de levedura (Hu *et al.*, 2003).

2.9 Cobre e *S.cerevisiae*

O Cobre é micronutriente que atua como co-fator para a atividade de muitas enzimas em leveduras, das quais aquelas envolvidas em reações que necessitam a transferência de elétrons, tais como citocromo c-oxidase e Cu-Zn dismutase (Stehlik-Tomas *et al.*, 2004). Considera-se a faixa de 1 a 10 μM (Tabela 4) a concentração adequada de cobre para o crescimento e atividade fermentativa da levedura. De acordo com Jones e Greenfield (1984) a concentração ótima é em torno de 1 a 1,5 μM , pois já quando presente a 10 μM pode exercer efeito inibitório do crescimento celular.

Tabela 4: Constituintes inorgânicos da levedura.

Elementos (g/100g peso seco)	AIBA <i>et al.</i> (1973)	REED e NAGODAWITHANA (1991)
Fósforo	0,8-2,6	1,35
Enxofre	0,01-0,24	0,39
Potássio	1,0-4,0	2,1
Magnésio	0,1-0,5	0,165
Sódio	0,01-0,1	0,012

Cálcio	0,1-0,3	0,075
Ferro	0,01-0,5	0,002
Zinco	-	0,017
Cobre	0,002-0,01	0,0008
Manganês	0,0005-0,007	0,000002
Molibdênio	0,0001-0,00	0,00004
Total de Minerais	5-10	

2.10 Considerações

Há cerca de 40 anos, foram dados muitos incentivos no desenvolvimento da fermentação alcoólica industrial, visando uma maior produtividade capaz de atender o mercado que passava a ter uma demanda maior sobre o produto, após o início do Proálcool. Inovações agrícolas com a produção de variedades de cana adaptadas a diferentes climas e solos e industriais com o melhoramento dos equipamentos para a condução da fermentação são alguns dos avanços que ocorreram no setor sucroalcooleiro, possibilitando o Brasil ter o que há de mais moderno na produção de etanol.

Mesmo com esses avanços e com os que estão em desenvolvimento, existem lacunas no entendimento e controle do processo, principalmente no que diz respeito à composição mineral das matérias-primas. Este trabalho visa esclarecer a influência desses minerais no crescimento celular, na eficiência fermentativa, na toxicidade celular e a relação direta de determinado mineral e seu efeito nas leveduras industriais, relações feitas facilmente com outros parâmetros como a temperatura, o pH e a contaminação bacteriana.

3. REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. John Wiley & Sons, Inc, 4^a ed., New York, 1996.

AMORIM, H. V. *et al.* **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. Appl Microbiol Biotechnol, v. 9, pp 1267 – 1275, 2011.

AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba-SP, Fermentec, 448p, 2005.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and Its impact on yeast fermentation**. In M. A. S. Bernardes (Ed.), Biofuel production-recent developments and prospects. Rijeka: Intech, pp. 85–100, 2011.

BLACKWELL, K. J.; TOBIN, J. M.; AVERY, S. V. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 47, 180–184, 1997.

BOULTON, C.; QUAIN, D. E. **Brewing yeast and fermentation**. Blackwell, Oxford, United Kingdom, 2001.

CALDAS, C. **Manual de análises selecionadas: para indústrias sucroalcooleiras**. Sindicato da Indústria do Açúcar e Álcool no Estado de Alagoas, p. 424, 1998.

CAMPOS, M. P. **Produção de etanol a partir de matérias-primas sacarinas**. In: FURTADO, J. S. Fermentações industriais & Transformações Microbianas. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo, p. 92-98, 1980.

EIDE, D. J. *et al.* **Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae***. Genome Biology, v. 5, issue 9, article R77, 2005.

EMPRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Árvore do conhecimento cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_105_22122006154841.html. Acessado em 24/02/2015.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Coleção Biotecnologia. EDUCS, Caxias do Sul, p. 510, 2004.

GIBSON, B. R. *et al.* **Carbohydrate utilization and the lager yeast transcriptome during brewery fermentation**. Yeast 25:549 –562, 2008.

HU, C-K.; BAI, F-W.; AN, L-J. **Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg²⁺ via reduction in plasma membrane permeability**. Biotechnology Letters 25: 1191–1194, 2003.

JONES, R. P.; GREENFIELD, P. F. **Process Biochemistry**, 4, 48–59, 1994.

JONES, R.P.; GADD, G.M. **Enzyme Microb. Technol**, v. 12: 1-17 1990.

LEITE, R. C .; CORTEZ, L. A. B. **O etanol combustível no Brasil**. Revista Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas, Ministério das Relações Exteriores, 2008.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Edgard Blücher, v. 3, p. 1-43, São Paulo, 2001).

MARTINS, L. A. P. **Filosofia e a história da biologia**, v. 4, p. 65-100, 2009.

MATSUOKA, S. **Botânica e ecofisiologia de cana-de-açúcar**. Apostila: Curso de Qualificação em Plantas Industriais Cana-de-açúcar p. 93, São Paulo, 1996.

MENEZES, J. A. S. **Aspectos físicos e químicos do caldo de cana de açúcar que afetam a capacidade fermentativa das células de levedura**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 141 – 178, 1980.

NOGUEIRA, F. S.; FERREIRA, K. S.; JUNIOR, J. B. C.; PASSONI, L. C. **Minerais em melados e em caldos de cana**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 29(4): 727-731, 2009.

OTERO, J. M.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* microbial cell factories for succinic acid production**. Journal of Biotechnology, pp. 196-210, 2007.

OURA, E.; REHM, H. J.; REED, G. **Biomass from Carbohydrates**. Biotechnology: a multivolume comprehensive treatise. Wheimeim: Verlang Chemie, cap. 1, v. 3, 1995.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PAYNE, J. H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. Novel: STAB, São Pao, 1989.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. . **Biologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan, 7^a ed., Rio de Janeiro, 2007.

RIDESA (Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do setor Sucroenergético). Catálogo Nacional de Variedades “RB” de cana de açúcar. Curitiba. p. 136, 2010.

RIDESA (Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do setor Sucroenergético). Variedades plantadas e cultivadas no Brasil, safra 2012. Disponível em:

<http://www.ridesa.agro.ufg.br/>. Acessado em 14/01/2015.

SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, B. G.; GOUVEIA, E. R. **Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p.75-80, 2010.

SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgar Blucher. v. 2, p. 541, 2005.

SOUZA, R. B. *et al.* **Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation**. Appl Biochem Biotechnol 175:209-222, 2014.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. Universidade de Campinas, Campinas, 2001.

STEHLIK-THOMAS, V.; ZETIC, V. G.; STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N. **Food Technology and Biotechnology**, 42, 115–120, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Editora Artmed, 3^a ed., Porto Alegre, 2004.

TEH, K. Y.; LUTZ, A. E. **Thermodynamic analysis of fermentation and anaerobic growth of baker’s yeast for ethanol production**. Journal of Biotechnology, v. 147, pp. 80-87, 2010.

TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presente no melão de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. Universidade de Campinas, Campinas, 2008.

ÚNICA, União das Indústrias de cana de açúcar. Disponível em:

<http://www.greenenergy.com/Environment/perspectives/08-Bioethanol.pdf/>. Acessado em 10/01/2015.

VILLEN, R. A. Mauá: **Biotechnologia – Histórico e Tendências**. Escola de Engenharia de Mauá. Apostila, 2009.

WALFORD, S. N. **Composition of cane juice**. Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association. Durban, v. 70, p. 265-266, 1996.

WALKER G.; DENICOLA R.; ANTHONY S.; LEARMONTH R. **Yeast metal interactions: impact on brewing and distilling fermentations**. In: Institute of Brewing and Distilling Asia Pacific Section Convention, Hobart, Australia, 2006.

WALKER, G. M. **Advances in Applied Microbiology**, 54, 197–229, 2004.

WALKER, G. M. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, 56, 109–113, 1998.

WALKER, G. M.; MAYNARD, A. I. **Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae***. Enzyme and Microbial Technology 18: 455-459, 1996.

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

ZINNAI, A. *et al.* **Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae***. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 115 nº 1,43-49, 2012.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a influência dos minerais no crescimento celular, na eficiência fermentativa e na toxicidade celular da linhagem industrial de *S.cerevisiae*.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração tóxica para as leveduras dos íons Cu^{++} e Mg^{++} .
- Identificar a dosagem ótima de cada mineral na composição do caldo de cana e no melaço.
- Observar se outros minerais divalentes apresentam efeito similar aos íons estudados.
- Verificar em qual(is) etapas(s) da fermentação esses minerais estão envolvidos.

5. CAPÍTULO I

TÍTULO: Effect of mineral supplementation with magnesium and copper in the physiological behavior of *Saccharomyces cerevisiae*.

AUTORES: Dayvison Soares Ferreira, Marcos Antônio de Morais Júnior.

REVISTA: Journal of Agricultural and Food Chemistry

IMPACT FACTOR: 3.107

Resumo

Existem muitos questionamentos sobre o efeito da qualidade da matéria-prima sobre o processo fermentativo, dentre eles a composição nutricional do caldo de cana recebe destaque neste cenário devido a sua importância para um bom desempenho das células de levedura na conversão de açúcar em etanol. Por isso este estudo visa explicar a relação da suplementação mineral de magnésio e cobre, podendo contribuir para a melhoria do processo, influenciando a escolha da cana, a necessidade de suplementação nutricional no caldo e no melaço quando necessário, tornando o gerenciamento agrícola e industrial cada vez mais eficaz e, conseqüentemente, efeitos positivos sobre a eficiência fermentativa. As amostras de caldo de cana e de melaço foram coletadas de duas usinas dos estados de Pernambuco e Paraíba. Elas foram submetidas a fermentações e ensaios de crescimento com uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Foi avaliado o consumo de açúcares, produção de metabólitos, produção de biomassa, composição mineral de magnésio e cobre, viabilidade celular e a variação de pH. Os resultados indicaram que a suplementação com magnésio desvia o metabolismo oxidativo da levedura para o metabolismo fermentativo ou redutivo, sem causar toxicidade celular. Este efeito não foi encontrado em nenhum dos outros minerais testados, cobre, manganês e cálcio. Além disso, os valores de etanol e a variação de pH sugerem que a concentração de magnésio no meio influencia mais o comportamento da levedura do que o tipo de meio utilizado na fermentação.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, suplementação mineral, *Saccharomyces cerevisiae*, magnésio, cobre, rendimento fermentativo.

INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica brasileira possui grande destaque na atividade industrial do país, o que impulsiona o desenvolvimento de novas técnicas para uma maior eficiência do processo. Nesse contexto, a composição do caldo de cana é um fator determinante para um bom rendimento fermentativo e para a obtenção de produtos de qualidade ao final do processo. Existem vários fatores responsáveis pela composição do caldo de cana de açúcar, dentre eles a variedade de cana, tipo de solo, condições climáticas, maturidade da cana, tipo de cultivo, corte e processamento, período entre queimadas e uso ou não de fertirrigação (BASSO, 2011). Desta forma a composição do caldo de cana e, conseqüentemente, sua composição mineral varia bastante, dificultando o controle nutricional da matéria-prima que frequentemente passa despercebido pelos produtores brasileiros.

Esses minerais são muito importantes para a nutrição da levedura, permitindo seu crescimento e metabolismo saudável, sendo os principais presentes no caldo o amônio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre e ferro. Em relação à fermentação alcoólica, os minerais potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, zinco e cobre, são de alguma forma essenciais para o processo (WALKER, 2004). Contudo, esses minerais se não bem dosados podem ser tóxicos em altas concentrações e causar danos nas funções em que atuam como é o caso do potássio e do cálcio, que quando estão presentes em altas concentrações causam estresse osmótico, dificultando a atividade fermentativa da levedura (AMORIM *et al.*, 2009). Por outro lado, minerais como o magnésio, não possui relatos apontando seu efeito tóxico na célula. Ele é o mais abundante intracelular catión divalente, atuando como cofator para mais de 300 enzimas envolvidas em diferentes reações metabólicas, tais como a síntese de DNA e ATP. O magnésio tem um papel multifuncional na fisiologia de células de levedura, desde sua citologia, bioquímica e biofísica, além de ser muito importante na fermentação industrial, sendo necessário para a ativação de várias enzimas glicolíticas e na proteção aos estresses ambientais durante a fermentação, como os causados por etanol, altas temperaturas ou alta pressão osmótica (WALKER, 2004).

Outros metais também influenciam a fermentação, como o ferro, manganês e cobre. Eles são cofatores de enzimas, principalmente o manganês, e como componentes do redoxisomos na respiração da levedura, cobre e ferro especialmente (DE FREITAS, 2003). O cobre também atua como cofator de algumas enzimas, tais como citocromo C-oxidase e Cu / Zn superóxido dismutase. O manganês por sua vez é essencial para a célula de levedura como um elemento traço, atuando em algumas enzimas, como a piruvato carboxilase (STEHLIK-THOMAS, 2004), porém ele também é

um concorrente de magnésio para algumas enzimas de síntese de ATP e de DNA (BLACKWELL, 1997). Já o ferro é essencial para a levedura até certos níveis, podendo ser tóxicos se a sua utilização pelas células de levedura não for bem regulados (PAS *et al.*, 2009).

Outro cátion divalente de importância é o cálcio, mesmo apresentando poucas funções bioquímicas e sendo necessário em pequenas quantidades quando comparado ao magnésio (YOUATT, 1993). Dentre suas funções estão a indução de ligações entre as proteínas de superfície de células diferentes, ocasionando a floculação, fenômeno importante na produção da cerveja (WALKER, 2004). Apesar de não estar envolvido aparentemente no crescimento celular das leveduras (VASCONSELOS, 1987), o cálcio é importante para a fermentação envolvido com a proteção celular ao estresse etanólico (COURCHESNE *et al.*, 2011). Há indícios que o cálcio poderia estar envolvido também com a proteção celular ao estresse ácido (DE LUCENA *et al.*, 2012), já que ele é um marcador intracelular de regulação homeostática (CYRET, 2003).

Dando continuidade aos trabalhos realizados por BARROS *et al.*, 2014, nós focamos na análise de dois desses nutrientes, magnésio como macronutriente e o cobre como micronutriente, para observar a influência desses dois minerais no crescimento e metabolismo celular das leveduras de *S. cerevisiae*, visto que dentre os minerais citados, estes desempenham funções importantes no processo fermentativo da célula.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de cana de açúcar e de melaço

Amostras de caldo de cana e de melaço foram coletadas da usina Miriri, localizada no município de Santa Rita, estado Paraíba, da usina Petribu, localizada no município de Paudalho, estado de Pernambuco, respectivamente. As amostras foram coletadas em recipientes estéreis, acondicionadas em refrigeração por bolsas térmicas durante o transporte e armazenadas a -20°C até serem processados.

As amostras de caldo e de melaço foram padronizadas a 12 °Brix (escala usada para medir a quantidade de sólidos solúveis em uma solução) por diluição em água deionizada para simulação das condições industriais. A partir daí os substratos receberam a denominação de mosto de alimentação. O °Brix foi mensurado a temperatura ambiente em um refratômetro analógico portátil Modelo HSR-500 seguindo as instruções do fabricante.

Meios de cultivo e preparo da levedura

A linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no estudo foi a JP1 (SILVA-FILHO *et al*, 2005) utilizadas com frequência por indústrias na região Nordeste, incluindo as duas usinas em que as amostras foram coletadas. As células foram mantidas em placas contendo meio levedura, peptona dextrose (YPD) contendo (m/v) 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose e 2% agar bacteriológico. Para os cultivos em meio líquido o agar foi suprimido. A produção da biomassa para os ensaios de fermentação ocorreu a partir de cultivos sucessivos em meio YPD a 30°C em incubadora tipo shake orbital a 200 rpm. A cada 24 h as culturas eram retiradas da incubadora para deixar as células precipitarem. O sobrenadante corresponde a cerca de metade do volume do meio que era removido assepticamente e substituído pelo mesmo volume de meio fresco, seguindo-se nova incubação. Esse procedimento foi repetido até se conseguir a quantidade suficiente em peso úmido das células de levedura. No final do processo as células foram coletadas por centrifugação por 3 minutos a 3.000rpm em tubos de fundo cônico graduado de forma a se obter o sedimento úmido equivalente a 5 mL. e o sobrenadante foi desprezado. Após isso, pesou-se 5g da levedura úmida e esta foi adicionada a 50ml do caldo misto e do melaço para que as leveduras atingissem 10%(m/v) da solução.

Para os ensaios fermentativos foram adicionados os mostos de alimentação em cada tubo de forma a se atingir o volume final de 50 ml, produzindo os mostos de fermentação, que foram transferidos para frascos de 125ml. A incubação ocorreu por oito horas a 33°C sem agitação e sem ajuste de pH. As fermentações foram realizadas em triplicata.

Ensaio e parâmetros fermentativos

Os parâmetros de viabilidade e brotamento celular foram avaliados em triplicata antes da suplementação mineral, após a suplementação e ao término da fermentação. Para isso foi retirado 1ml do meio de fermentação com as células de levedura que foram submetidas a coloração com azul de metileno a 0,1g/l, seguida ela análise e contagem no microscópio (400x de ampliação) usando câmera de Neubauer (CALDAS, 1998). A variação do pH antes e após a fermentação foi avaliada, não havendo diferença entre os valores de pH da amostra pura e das amostras suplementadas antes de começarem a fermentar.

Para a determinação da composição mineral de magnésio e cobre as amostras dos mostos de alimentação foram enviadas para o Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP). A análise foi feita por espectrometria de emissão óptica e espectrometria de chama pelo método LQA-PT-015 (AOAC INTERNATIONAL, 1990). Já para a determinação de metabólitos orgânicos (açúcares, álcoois, ácidos orgânicos) as amostras foram enviadas para o Centro de Tecnologias Estratégicas do

Nordeste (CETENE) para serem analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Para tal, as amostras do início e final da fermentação foram centrifugadas e o sobrenadante filtrados em filtros de 0,22 μ m e acondicionadas em vials de 1,5ml e armazenadas a -20°C até o momento da análise. Quando necessário, diluições foram feitas com água deionizada. As análises de HPLC foram realizadas em equipamento Waters Technologies 2414 Series, sendo a coluna do tipo de exclusão molecular modelo Phenomenex com a água ultrapura como fase móvel, fluxo de 0,6ml/min e temperatura de trabalho do forno e do detector de 35°C. O método de detecção foi feito por índice de refração (IR). A identificação e quantificação dos metabólitos foram feitas por comparação do tempo de retenção e da concentração de soluções-padrão usadas na calibração do equipamento.

Ensaio de crescimento com suplementação mineral

Foram utilizadas placas com 96 poços de fundo chato com capacidade para 500 μ l. Para cada placa utilizou-se quatro meios de crescimento distintos, caldo de cana e melão, ambos padronizados para 2 de °Brix, YPD e YNB (meio levedura nitrogênio base). Estes meios foram selecionados para o estudo porque são os principais meios usados em fermentação industrial e em ensaios fermentativos laboratoriais, respectivamente. Outra variável, além dos diferentes meios testados, foi a concentração dos íons, sendo testadas sete concentrações (mg/l) diferentes: 1,99; 3,98; 5,97; 7,96; 9,95; 11,94 e 13,93 para o cobre; 101; 161,6; 222,2; 282,8; 343,4; 404 e 464,6 para o magnésio; 1,625; 3,25; 4,875; 6,5; 8,125; 9,75 e 11,375 para o manganês e 147; 235,2; 323,4; 411,6; 499,8; 588 e 676,2. A escolha destes valores foi baseada no trabalho de Souza *et al*, 2014 e em relatórios industriais de usinas da região Nordeste. o controle foi feito com todos os meios, mas sem a adição do íon. Cada condição foi feita em triplicata, inclusive o controle.

A cepa de JP1 usada no teste de crescimento com as placas foi cultivada em meio YPD líquido por 24 horas para a ativação da levedura, posteriormente 100 μ l do meio com o inóculo foi semeado por espalhamento, com auxílio de uma alça de Drigalski, em placas de meio Wallerstein Laboratories Nutrient Agar (WLN). Após 48 horas de crescimento a 33°C, colônias isoladas da levedura foram resuspensas em solução salina estéril a 0,85% NaCl e padronizadas a uma densidade óptica (D.O) de 0,1, leitura esta feita a 600nm em um espectrofotômetro da Biosystems modelo T7X. A Densidade óptica inicial da suspensão de células no ensaio em placa foi de 0,025 devido à diluição do inóculo com os demais componentes da solução usada em placa.

As soluções dos sais foram preparadas pesando-se os sais de sulfato dos quatro cátions testados, Mg, Cu, Ca e Mn, sendo o último usado na sua forma monoidratada. Os sais de sulfato

foram escolhidos porque são as formas de apresentação mais comuns e são muito usadas na indústria e em testes laboratoriais. Para cada uma das sete concentrações utilizadas, uma amostra 10x concentrada foi preparada usando água MiliQ estéril e posteriormente filtradas em filtro de 0,22µm autoclavado para garantir que a solução mineral não tivesse nenhum tipo de contaminação. As soluções foram estocadas em refrigeração a 4°C em tubos Falcon estéril de 15ml. As concentrações de cada íon foram consideradas, ao invés concentração do sal.

Cada poço da placa de microtitulação continha o meio de cultura, as células de leveduras e as soluções dos minerais, sendo o volume completado com água MiliQ estéril, totalizando 200µl. As placas foram incubadas a 33°C com agitação constante equivalente a 250rpm em multileitor de placas Biotek modelo Sinergy HT. Os cultivos foram realizados por 36 horas, com leitura de densidade óptica a cada 15 minutos, totalizando 144 leituras durante todo o experimento. Os dados foram processados pelo software Gen5, aplicativo instalado junto com o equipamento.

Análise Estatística

Todas as análises foram feitas em triplicata. Os resultados foram representados com a média e desvio padrão. O GraphPad Prism foi usado para calcular as médias, desvios padrão e as diferenças entre os meios e as diferentes concentrações de sais usadas. A análise de variância (two-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni foram usados para testar a hipótese sobre a diferença de valores médios no crescimento de meios sem suplementação e meios suplementados com magnésio e ou cobre.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Composição mineral dos meios industriais fermentativos

A análise da composição mineral mostrou que a quantidade de magnésio é aproximadamente duas vezes mais concentrada no melaço em relação ao encontrado no caldo de cana (Tabela 1). Esta diferença pode ser explicada pelo processo de produção do melaço que é um subproduto da produção de açúcar após ser centrifugado e desidratado, o que torna ele um substrato mais concentrado que o caldo de cana de açúcar (BETITE, 2011). No entanto, os valores de cobre foram semelhantes nas duas amostras, o que era esperado para esse micronutriente nos meios industriais (NOGUEIRA, 2009). Estes valores obtidos reforçam o trabalho de SOUZA *et al.*(2014), que relata a diferença na composição mineral de caldos de três regiões distintas de plantação na região do Nordeste do Brasil. O trabalho também associou os caldos com deficiência mineral e a eficiência fermentativa obtida, concluindo que há uma redução na produção de álcool em torno de

10% em relação a caldos com concentrações satisfatórias de minerais, ou seja, valores mínimos de minerais (MALTA,2006) para que a levedura possa crescer e realizar seu metabolismo.

Pode-se concluir a partir dos dados na Tabela 1 que a avaliação da composição mineral do caldo e do melaço é necessária para a realização de uma suplementação adequada, pois nem sempre a mistura de melaço ao caldo pode corrigir a carência de minerais, o que pode comprometer a produtividade das fermentações. Vale salientar que o magnésio apresenta função essencial para a levedura e sua carência, níveis abaixo de 1g/kg, afeta não só o metabolismo fermentativo da célula como a modulação do crescimento e divisão celular (WALKER, 1996).

Tabela 1. Concentração dos minerais nos substratos.

Mineral	Concentração (mg/kg)	
	Cana de açúcar	Melaço de cana
Cobre	<0,6	<0,6
Magnésio	91	180

Parâmetros fermentativos

Os experimentos fermentativos em caldo de cana com a linhagem JP1 mostraram que o maior rendimento foi obtido quando o cobre estava presente no, mesmo que na presença de magnésio (Tabela 2).

Nas amostras de caldo foi visto que todas as suplementações usadas foram benéficas para a produção de álcool, não sendo observado nenhum efeito inibitório em relação à solução mineral. Os dados mostrados na Tabela 2 indicam que não houve produção de acetato, o qual quando presente no meio de fermentação diminui a viabilidade celular e afetando o rendimento fermentativo (PEREIRA *et al.*, 2011). O glicerol por sua vez, foi pouco produzido em todas as condições, indicando que quase todo o açúcar foi convertido para etanol ou para o crescimento celular. Por ser o principal sub-produto da fermentação alcoólica, a produção de glicerol está relacionada diretamente com o aumento da biomassa e a condições de estresse (CRONWRIGHT *et al.*, 2002). Por outro lado, a suplementação mineral do melaço resultou na diminuição do rendimento fermentativo (Tabela 3), o que pode ser consequência da presença de compostos sulfurados usados na clarificação do açúcar que interferem no rendimento fermentativo.

Ao analisarmos as curvas de crescimento dos nossos resultados percebemos que a inibição no crescimento celular da levedura nos meios suplementados com magnésio é bem intensa, o que reflete na produção de etanol. Para (CHAVES, 2006) o desenvolvimento das leveduras, favorece a transformação completa dos açúcares fermentáveis, o que não foi possível com a concentração de magnésio usada na fermentação. Por esse motivo, as amostras suplementadas apenas com cobre, tiveram uma maior eficiência na conversão dos açucares em álcool.

Tabela 2: Parâmetros de fermentação de caldo de cana (CC) e caldo de cana suplementado com cobre e/ou magnésio.

Meio	Açúcar residual (g/L)			Produto (g/L)		Rendimento (g/g)	
	Sacarose	Glicose	Frutose	Etanol	Glicerol	Etanol	Glicerol
CC (inicial)	24,12	34,56	54,78				
CC	2,2	0	4,44	44,9	1,78	0,420	0,017
CC + Cu	1,85	0	3,53	54,94	2,28	0,508	0,021
CC + Mg	3,38	0	2,39	50,74	2,39	0,471	0,022
CC + Cu + Mg	4,88	0	5,04	52,46	1,48	0,507	0,014

Tabela 3: Parâmetros de fermentação de melaço (ML) e melaço suplementado com cobre e/ou magnésio.

Meio	Açúcar residual (g/L)			Produto (g/L)		Rendimento (g/g)	
	Sacarose	Glicose	Frutose	Etanol	Glicerol	Etanol	Glicerol
ML (inicial)	71,86	17,16	16,38				
ML	3,18	0,02	4,13	34,54	0,38	0,352	0,004
ML + Cu	2,58	0	3,64	28,76	0,20	0,290	0,002
ML + Mg	2,57	0	3,55	32,43	0,37	0,327	0,004
ML + Cu + Mg	2,41	0	3,57	31,14	0,11	0,313	0,001

Aspectos biológicos e físicos de *S.cerevisiae*

Com o intuito de verificar a toxicidade dos minerais magnésio e cobre, o percentual de células vivas foi determinado conforme Pereira *et al.*(2011). A tabela 4 e 5 mostra que mesmo nas concentrações mais altas dos íons testados, não houve morte celular nem mesmo comprometimento do brotamento celular nos meios de caldo e melaço de cana de açúcar, respectivamente. Os valores

de viabilidade deram acima de 95% de células vivas e o brotamento manteve-se constante em relação ao meio ausente de suplementação.

Tabela 4: Valores percentuais da viabilidade e brotamento celular de *S.cerevisiae* sem e com suplementação mineral em caldo de cana de açúcar.

Amostras	Viabilidade	Brotamento
Sem suplementação	97,4%	4,3%
Suplementação com Cu ⁺⁺ (11,94mg/l)	95,72%	3,9%
Suplementado com Mg ⁺⁺ (343,4mg/l)	97,18%	4,08%
Suplementado com Cu ⁺⁺ e Mg ⁺⁺ (11,94 e 343,4mg/l)	95,09%	3,87%

Tabela 5: Valores percentuais da viabilidade e brotamento celular de *S.cerevisiae* sem e com suplementação mineral em melaço de cana de açúcar.

Amostras	Viabilidade	Brotamento
Sem suplementação	98,3%	5,22%
Suplementação com Cu ⁺⁺ (11,94mg/l)	99,04%	4,78%
Suplementado com Mg ⁺⁺ (343,4mg/l)	98,7%	4,53%
Suplementado com Cu ⁺⁺ e Mg ⁺⁺ (11,94 e 343,4mg/l)	98,61%	5,1%

Quanto aos aspectos físicos, o pH das amostras foi mensurado antes e após a fermentação com o intuito de corroborar com os dados obtidos pela análise cromatográfica e pelas curvas de crescimento, (Tabela 6). Os valores indicaram uma maior redução no pH das amostras suplementadas, efeito este mais acentuado na suplementação com magnésio, devido seu papel na indução do metabolismo fermentativo nas leveduras de *S.cerevisiae*. Esta redução do pH é ocasionada pela produção de ácido acético, um subproduto frequente da fermentação alcoólica com *S. cerevisiae* (LEÃO, *et al.*, 2000).

Tabela 6: Valores de pH das amostras sem e com suplementação mineral submetidas a fermentação.

Amostra	Inicial	Padrão	Cobre	Magnésio	Cobre e Magnésio
Caldo	4,75	4,33	4,17	3,94	3,55
Melaço	5,23	4,74	4,57	4,57	4,63

Crescimento celular

As células de levedura foram cultivadas em diferentes meios de cultura contendo diferentes concentrações de magnésio (Figura 1), cobre (Figure 2) ou ambos (Figura 3). Os resultados mostraram que o aumento da concentração de magnésio diminui a velocidade de crescimento celular, o que não foi observado com o aumento da concentração de cobre. A especificidade da resposta ao magnésio na inibição do crescimento celular foi atestada pela suplementação dos diferentes meios com diferentes concentrações de cálcio (Figura 4). e de manganês (Figura 5) e pela análise de crescimento relativo comparando-se todos os minerais usados no estudo (Figura 6).

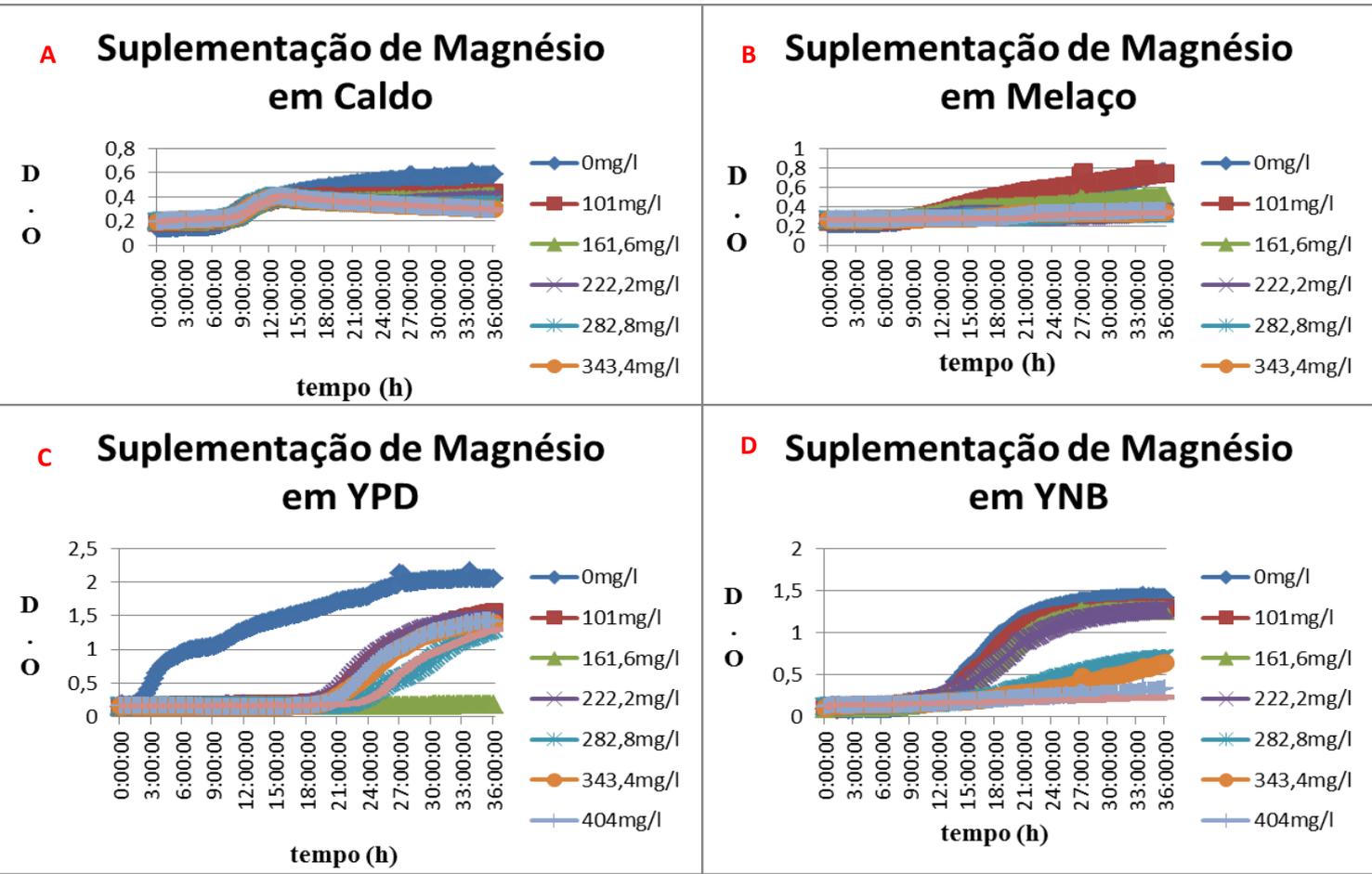


Figura 1. Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melaço (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de magnésio.

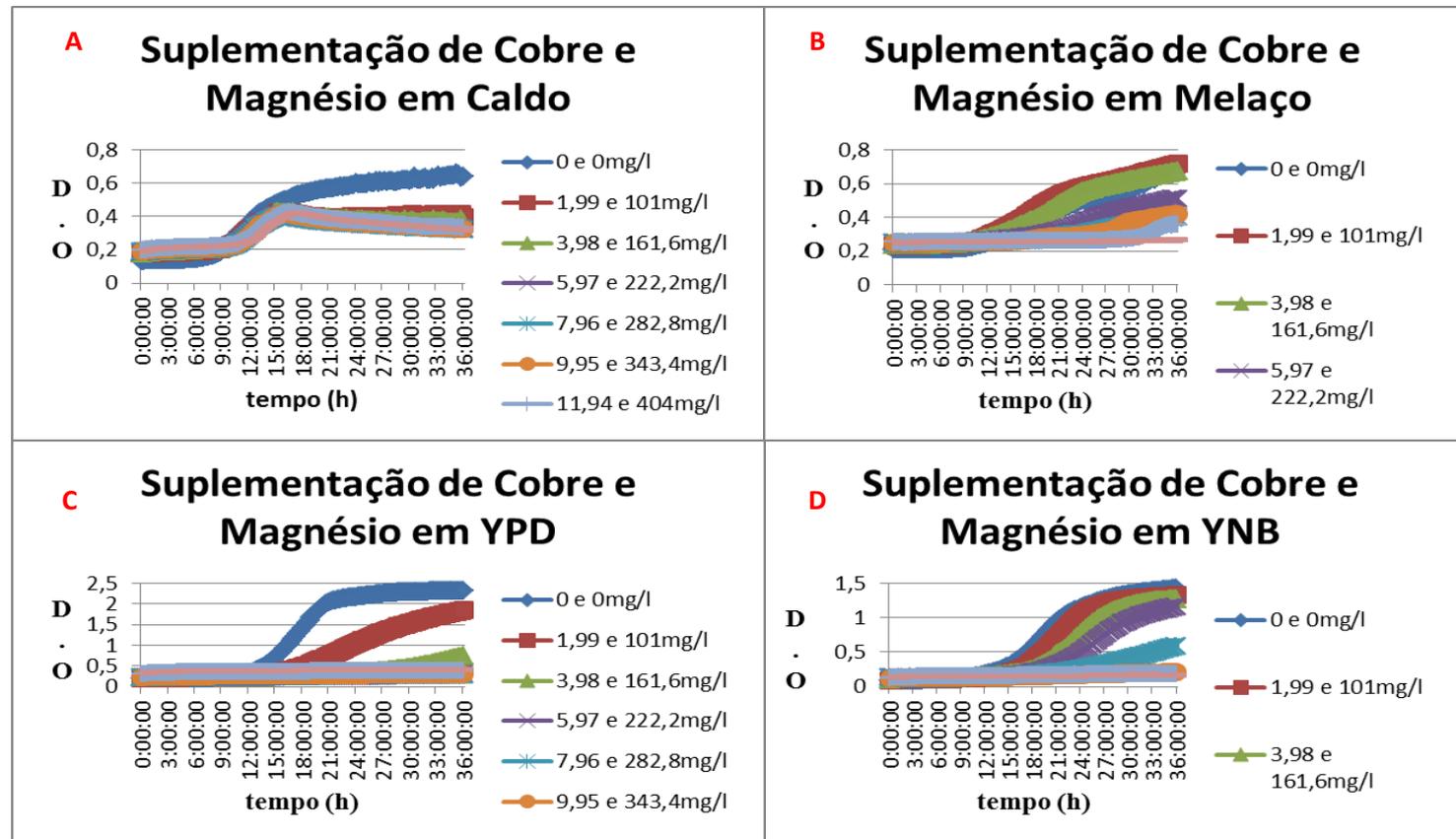


Figura 2. Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melaço (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de cobre.

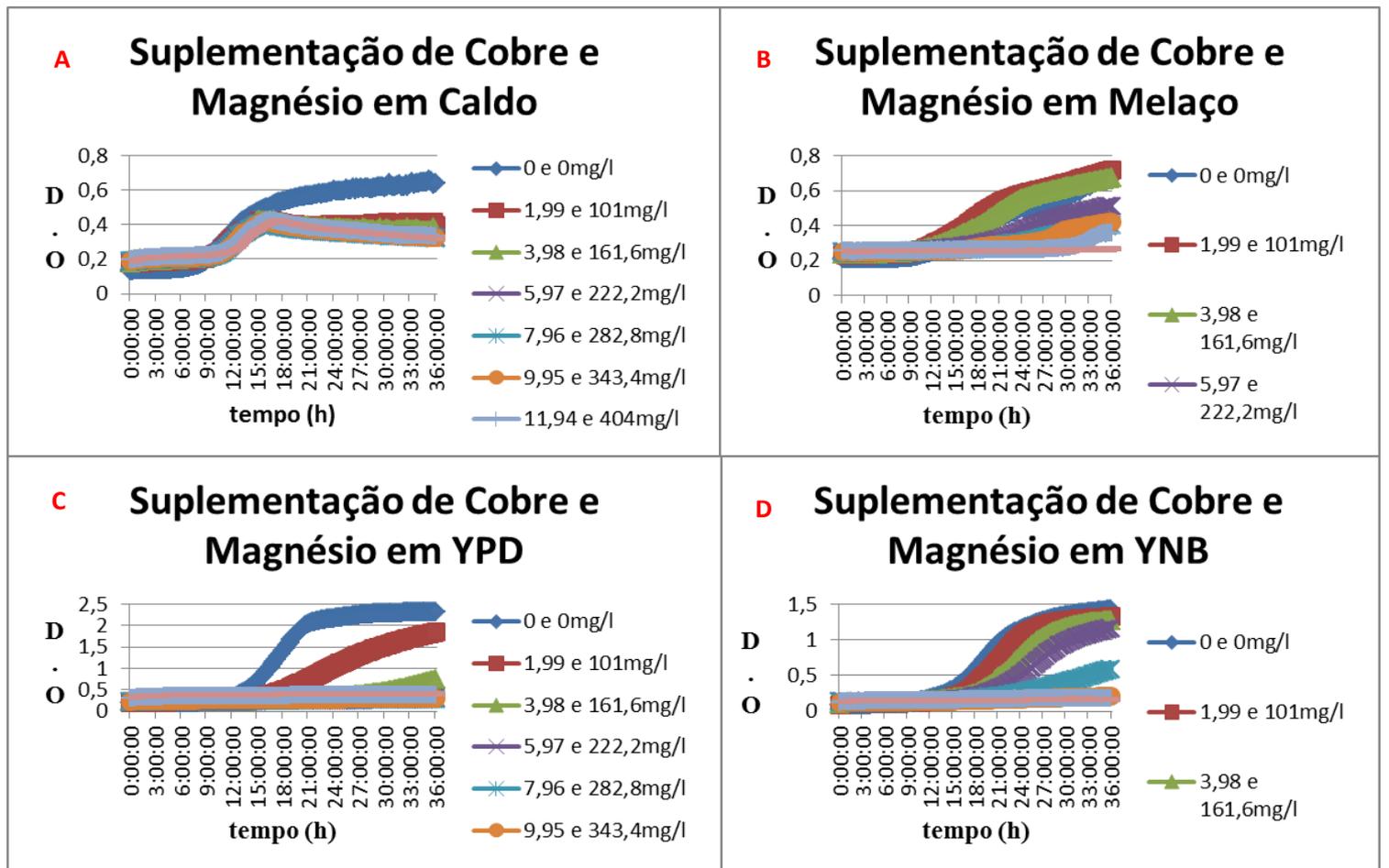


Figura 3. Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melaço (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de magnésio e cobre.

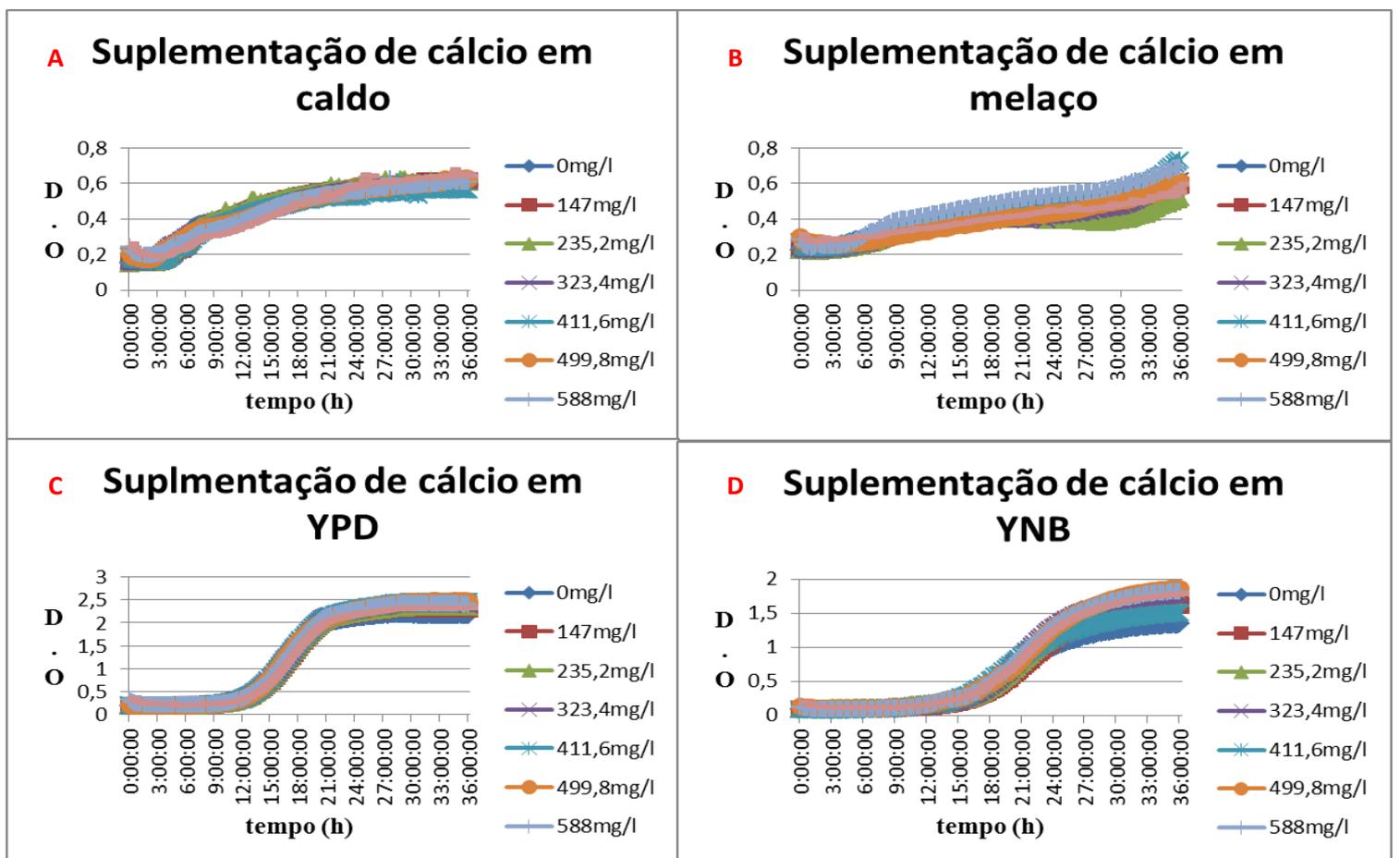


Figura 4. Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melaço (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de cálcio.

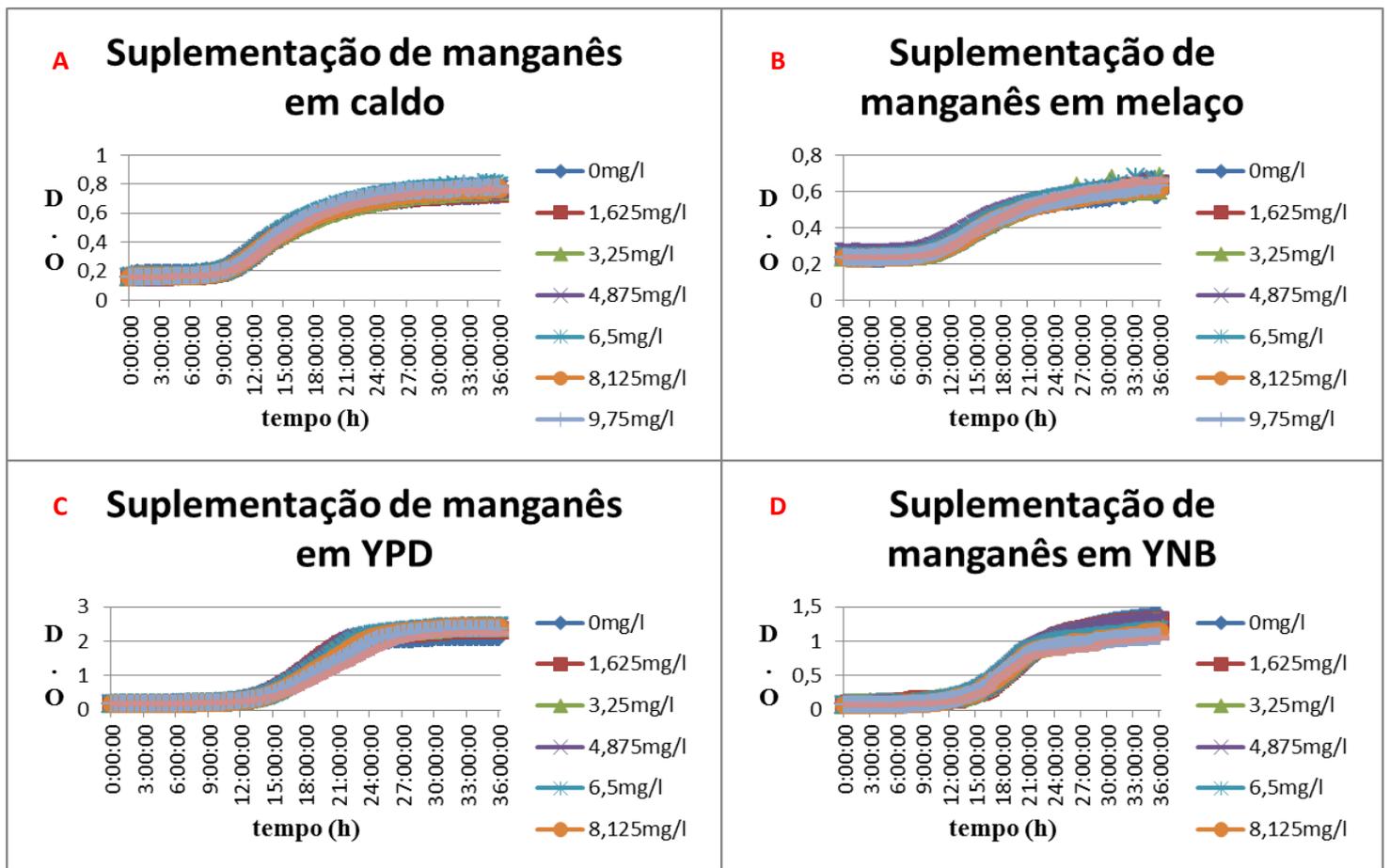


Figura 5. Curvas de crescimento da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 nos meios de caldo de cana (A), melão (B), YPD (C) e YNB (D) suplementados com diferentes concentrações de manganês.

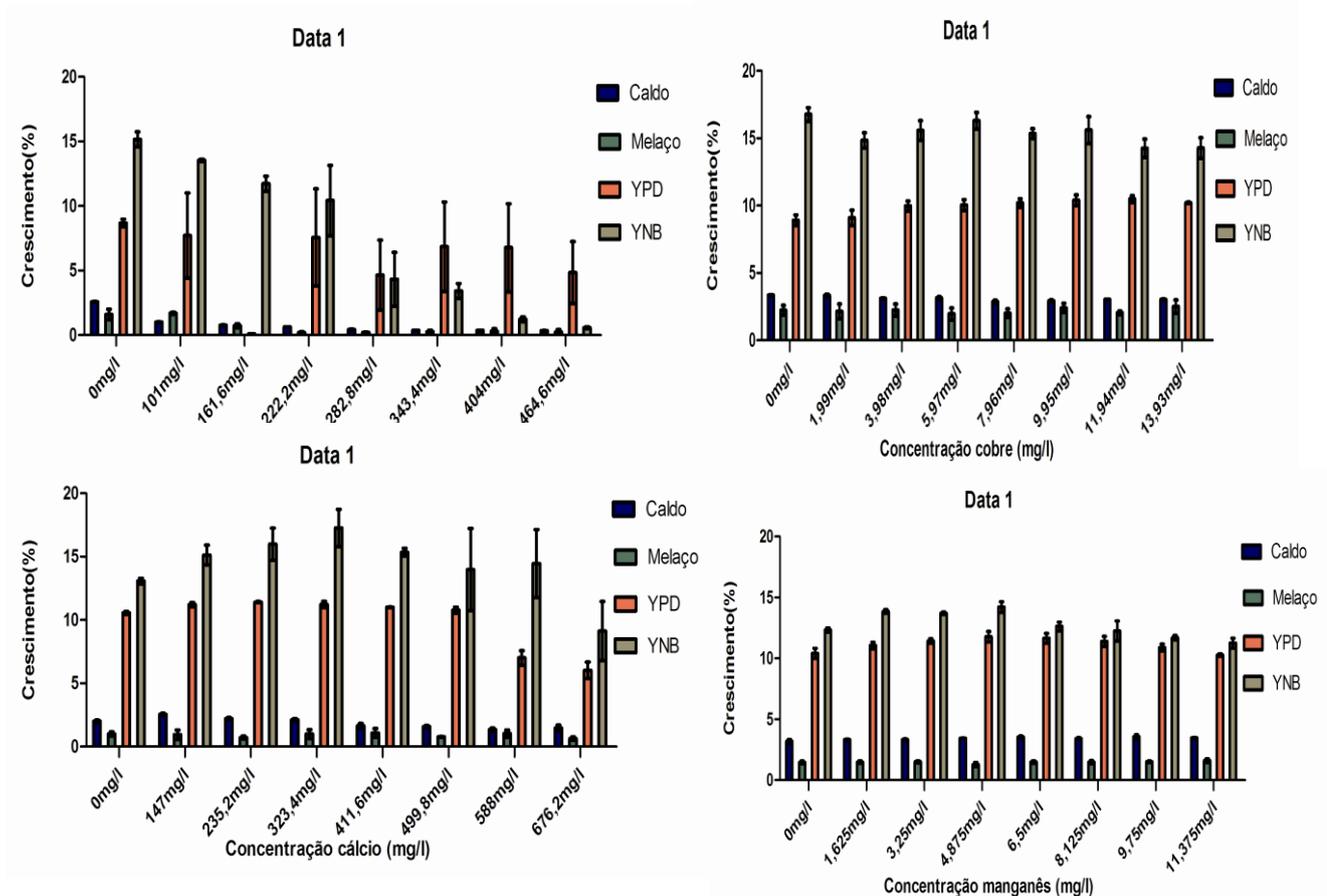


Figura 6. Crescimento relativo das células de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes meios com suplementação de magnésio, cobre, cálcio e manganês.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho indicaram que a suplementação mineral com o magnésio atua no direcionamento metabólico de *S.cerevisiae* para um metabolismo redutivo ou fermentativo, inibindo o crescimento celular da levedura. Contudo a maior produção de etanol foi observada na suplementação com o cobre, pois ele estimulou o processo fermentativo sem comprometer o crescimento celular, aumentando a eficiência da fermentação. Também foi observado que a suplementação de magnésio e cobre nas concentrações máximas no estudo em 464,4mg/l e 13,93mg/l, respectivamente, não causam efeitos tóxicos nas células de levedura, estas permanecendo com uma viabilidade acima de 95% após a suplementação.

Nas suplementações com cálcio e com manganês em concentrações similares a do magnésio e do cobre, respectivamente, houve um acréscimo no crescimento celular, diferentemente do que foi observado com a suplementação desses dois íons. Este trabalho identifica a oportunidade de desenvolver um protocolo com as concentrações ideais dos principais minerais presentes nos meios industriais de caldo e melão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectiva para próximos estudos, iremos verificar a influência dos outros minerais comumente encontrados nos meios industriais de fermentação sobre a *S. cerevisiae*, bem como a concentração em que eles se tornam tóxicos para as células de levedura. Para um melhor entendimento do papel que cada mineral exerce na levedura, analisaremos o nível de expressão gênica dessas células submetidas à suplementação mineral e assim identificaremos em qual (is) via(s) esses minerais exercem sua função.

Desta forma, este trabalho busca o entendimento da composição mineral e sua influência no rendimento fermentativo, buscando aperfeiçoar a prática da suplementação mineral de forma que esta seja feita de forma consciente, contribuindo para uma maior produção de etanol no setor sucroalcooleiro.

REFERÊNCIAS

AOAC, I. **Official Methods of Analysis**. Washington, D.C., Volume 1, 1990.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. **Sugarcane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage**. In W. M. Ingledew, G. D. Austin, C. Kluhspies, & D. R. Kelsall (Eds.), *The alcohol textbook* 5th ed., p. 39–46. Nottingham: Nottingham University Press, 2009.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and Its impact on yeast fermentation**. In M. A. S. Bernardes (Ed.), *Biofuel production-recent developments and prospects*. Rijeka: Intech, pp. 85–100, 2011.

BETITE, V. C. **Comportamento fermentativo de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto com diferentes concentrações de sacarose e fontes estruturalmente complexas de nitrogênio**. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

BLACKWELL, K. J.; TOBIN, J. M.; AVERY, S. V. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 47, 180–184, 1997.

CALDAS, C. **Manual de análises selecionadas: para indústrias sucroalcooleiras**. Sindicato da Indústria do Açúcar e Alcool no Estado de Alagoas, p. 424, 1998.

CHAVES, J. B. **Cachaça Capixaba- Um pouco de História: Informações Técnicas Básicas para a Produção de Cachaça Artesanal de Qualidade**, 2006. Disponível em:
<http://201.2.118.66/arquivos/biblioteca/Cacha%C3%A7a%20Capixaba.pdf> Acessado em:
01/03/2015.

COURCHESNE, W. E.; VLASEK, C.; KLUKOVICH, R.; COFFEE, S. **Archives of Microbiology**, 193, 323–334, 2011.

CRONWRIGH, G. R.; ROHWER, J. M.; PRIORL, B. A. **Metabolic Control Analysis of Glycerol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae***. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. p. 4448-4456, 2002.

CYERT, M. S. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311, 1143–1150, 2003.

DE LUCENA, R. M.; ELSZTEIN, C.; SIMÕES, D. A.; MORAIS, M. A., JR. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 629–640, 2012.

DE FREITAS, J.; WINTZ, H.; KIM, J. H.; POYNTON, H.; FOX, T.; VULPE, C. *Biometals*, 16, 97–185, 2003.

LEÃO, C. *Boletim de biotecnologia*, 66: 7-13, 2000.

MALTA, H. L **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

NOGUEIRA, F. S.; FERREIRA, K. S.; JUNIOR, J. B. C.; PASSONI, L. C. **Minerais em melados e em caldos de cana**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 29(4): 727-731, 2009.

PAS, M.; PISKUR, B.; SUSTARIC, M.; RASPOR, P. *Bioresource Technology*, 98, 1622–1628, 2009.

PEREIRA, F. B. *et al.* **Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2**. Springer. *Biotechnol Lett.* 34:45-53, 2011.

SILVA-FILHO, E. A. **Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprint**. *Antonie van Leeuwenhoek*. 88:13-23, 2005.

SOUZA, R. B. *et al.* **Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation**. *Appl Biochem Biotechnol* 175:209-222, 2014.

STEHLIK-THOMAS, V.; ZETIC, V. G.; STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N. **Food Technology and Biotechnology**, 42, 115–120, 2004.

VASCONCELOS, J. N. **Brasil Açucareiro**, 105, 41–48, 1987.

WALKER, G. M.; MAYNARD, A. I. **Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae***. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 455-459, 1996.

WALKER, G. M. **Advances in Applied Microbiology**, 54, 197–229, 2004.

YOUATT, J. **Critical Reviews in Microbiology**, 19, 83–97, 1993.