

Efeito da temperatura de estocagem de leveduras de panificação sobre a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase

Claudia Regina Cançado Sgorlon Tininis, Edwil Aparecida Lucca Gattás*

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP

Níveis intracelulares de G-3-PDH (sn-glicerol-3-fosfato:NAD⁺ 2-oxidoreductase, EC 1.1.1.8) de levedura de panificação foram acompanhados durante a estocagem sob três diferentes temperaturas. Semelhantes valores de biomassa final e de atividade específica da enzima foram obtidos após crescimento por 48 horas de duas linhagens de leveduras de panificação. O melhor meio (meio indutor) para obtenção de G-3-PDH foi: extrato de levedura (1%, p/v), peptona (2%, p/v), glicerol (3%, v/v) e etanol (1%, v/v). O choque osmótico com adição de NaCl 0,6 M provocou aumento da atividade de G-3-PDH de 1,2 vezes para leveduras crescidas em meio indutor por 48 horas e transferidas para o meio salino, por 2 horas. A estocagem (até 10 dias) da linhagem de levedura GD0, sob temperatura ambiente (27 °C) estimulou a síntese da G-3-PDH de células propagadas no meio indutor, lavadas e liofilizadas. Estocagens em geladeira (temperatura de 4 – 5 °C) ou em “freezer” (temperatura de –18 °C) mantiveram a atividade da G-3-PDH por até 8 meses.

Unitermos:

- Temperatura de estocagem
- Levedura de panificação
- Atividade enzimática
- Glicerol-3-fosfato desidrogenase

*Correspondência:

E. A.L. Gattás

Departamento de Alimentos e

Nutrição

FCF/UNESP

Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01

14801-902 – Araraquara – SP- Brasil

E-mail: gattas@fcfcar.unesp.br

INTRODUÇÃO

O congelamento celular seguido de secagem, com ou sem adição de agentes conservantes (Bruehl, Coote, 1999; Sampedro *et al.*, 1998), é uma das formas de manutenção de leveduras para utilização na indústria de alimentos. Parâmetros físicos, como pH e temperatura, além do controle da pressão osmótica, aplicadas na preservação de alimentos levam à perda de viabilidade da população microbiana presente num produto alimentar (Abadias *et al.*, 2001; Marechal *et al.*, 1999). A manutenção da viabilidade de *Candida sake* após congelamento pode estar relacionada com a composição do meio de crescimento e formas de congelamento e de reidratação da célula congelada, segundo Abadias *et al.* (2001). Os autores sugerem que células de *Candida sake* são muito mais sensíveis à secagem a frio que as células de *Saccharomyces cerevisiae*.

O acompanhamento da manutenção de atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase, enzima utilizada pela célula viva na geração de glicerol e diretamente relacionada à viabilidade celular, pode ser um indicador para um método de estocagem de microrganismos.

A glicerol-3-fosfato desidrogenase citoplasmática é uma das enzimas metabólicas, cujo nível de atividade intracelular depende do estado fisiológico da célula (Albertyn *et al.*, 1998), da composição do meio de cultivo (Gancedo *et al.*, 1968) e da situação de estresse osmótico (Blomberg, Adler, 1983; Edgley, Brown, 1983). A adaptação do *Saccharomyces cerevisiae* a altas concentrações salinas resultou em grande quantidade de glicerol-3-fosfato desidrogenase (André *et al.*, 1991; Larson *et al.*, 1993), enquanto Blomberg e Adler (1983) já haviam crescido células de *Saccharomyces cerevisiae* e estudado a adaptação fisiológica, a altas concentrações de sais, das

células em estado de transição entre a fase logarítmica e a fase estacionária de crescimento. Bruinenberg (1985) verificou que células de *Debaryomyces hansenii* também apresentaram altos níveis de glicerol-3-fosfato desidrogenase em meio contendo glicose e NaCl 8%. Assim sendo, células de leveduras em ambiente de osmolaridade alta acumulam glicerol como resposta à água perdida para o ambiente e para reajustar seu volume a sua pressão interna (Goward *et al.*, 1986), além da regulação sobre outras funções celulares (Groleau *et al.*, 1995), como a biossíntese de fosfolípídeos e balanço entre os níveis de concentração da coenzima oxidada (NAD⁺) e reduzida (NADH).

Nossos estudos verificaram a viabilidade celular e a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase de leveduras de panificação crescidas em meio contendo glicerol e etanol como fonte de carbono, submetidas ao choque osmótico, lavadas, congeladas e liofilizadas. Ensaios comparativos das condições de estocagem das células foram realizados sob três diferentes temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* GD0 utilizada foi isolada de fermento de panificação produzido pela Fleischmann & Royal. A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* LH foi isolada do fermento comercial distribuído pela Gist Brocades da Holanda. A manutenção destas linhagens foi realizada em geladeira a 4 °C por até 6 meses em meio YPD em agar inclinado (20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura (Difco), 20 g/L de peptona (Difco) e 20 g/L de ágar (Difco)).

Preparo do Inóculo, Crescimento e Produção da Enzima

Transferiram-se duas alças de células para 50 mL de meio (extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) e glicerol 4% (v/v)), contidos em frascos tipo erlenmeyer de 125 mL e submetidos à agitação por 24 horas a 250 rpm e 30 °C. As células foram conservadas por uma noite a 4 °C em repouso, para sedimentação da biomassa (cerca de 12 horas). O sobrenadante foi descartado e a biomassa concentrada, convenientemente diluída, e utilizada como inóculo. Os experimentos de crescimento da levedura e produção da enzima foram realizados em frascos tipo erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio, em mesa agitadora operando a 250 rpm, a 30 °C. O pH do meio foi

ajustado para 4,5 antes da esterilização. O meio para o crescimento da levedura e produção da enzima foi esterilizado a 120 °C por 15 minutos e apresentou a seguinte composição: extrato de levedo 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glicerol 3% (v/v) e etanol 1% (v/v), sendo o etanol adicionado antes da inoculação. O inóculo foi adicionado para se obter densidade inicial de células de 0,050 mg/mL baseado em massa seca. O tempo total de crescimento foi de 48 horas, seguido de 2 horas de tratamento osmótico com NaCl 0,6 M. A determinação da biomassa final foi realizada por meio de medidas turbidimétricas a 570 nm e um coeficiente de conversão de uma curva padrão que relaciona medidas de absorvância e massa seca celular.

Liofilização e Estocagem

As células, lavadas duas vezes com aproximadamente 50 mL de água destilada a 4 °C e centrifugadas (9000 rpm durante 10 min), foram submetidas ao congelamento segundo o método de Manifold (Manual da Labconco, 1998). As amostras foram liofilizadas em liofilizador Labconco, modelo LYPH.LOCK à temperatura de -40 °C e pressão interna de 20-30 mHg por aproximadamente 12 horas, continuamente. A estocagem das células crescidas em meio YP-glicerol/etanol, submetidas ao choque osmótico e liofilizadas, foi realizada à temperatura ambiente (cerca de 27 °C) por 10 dias, temperatura de geladeira (4-5 °C) e temperatura de “freezer” (-18 °C), por período de 8 meses.

Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada por meio de coloração com azul de metileno (Lee *et al.*, 1981).

Preparo dos Extratos Celulares

Para cada 100 mg de células liofilizadas, pesadas em frascos de vidro com capacidade de 5 mL, foi adicionado 1 mL de tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 7,2 contendo 0,01 M de NaF. O rompimento celular foi realizado em agitador de tubos (Tecnal, modelo 162), por trituração com esferas de vidro (1 g) de diâmetro de 425-600 microns (Sigma, G8772) por 4 vezes (por período de 30 segundos seguido de 30 segundos de intervalo, em banho de gelo), atingindo rompimento celular de aproximadamente 80%. O extrato enzimático foi obtido do sobrenadante da centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm e utilizado imediatamente nos ensaios de dosagem de atividade enzimática.

Atividade da Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase

Foi utilizada uma modificação do ensaio descrito por Wieland *et al.* (1974), que se baseia na conversão enzimática do glicerol-fosfato em dihidroxicetona-fosfato, com redução do NAD⁺ a NADH. A mistura da reação (tubo teste), de volume final de 3,3 mL continha os seguintes reagentes: 0,42 mM de NAD⁺ (Sigma N 7505), 3,6 mM de glicerol-fosfato (Sigma G 6501), 0,11 M de tampão glicina/NaOH contendo 0,88 M de hidrato de hidrazina, pH 9,8, 10 mM de cloreto de cálcio e extrato enzimático diluído. O controle (tubo branco) foi determinado da mesma maneira, adicionando-se água no lugar do glicerol fosfato. A atividade do extrato frente ao glicerol-fosfato foi realizada pela diferença de absorvância a 340 nm (teste – branco), por minuto, e o coeficiente de absorção do NADH foi $6,02 \times 10^3$ /M cm. Uma unidade de G-3-PDH é equivalente a 1 μ mol de NADH formado por minuto nas condições acima mencionadas. As determinações enzimáticas foram realizadas em duplicatas e os resultados apresentados mostraram desvios com variações de até 5 %.

Determinação de Proteína Total

O teor de proteína foi determinado utilizando o método Folin-Lowry modificado por Layne (1975).

RESULTADOS

A Tabela I mostra a produção de biomassa, proteína total e atividade da G-3-PDH de duas linhagens de leveduras (GD0 e LH) crescidas em meio YP-glicerol 3%-etanol 1%. Semelhantes valores de biomassa e de atividade de G-3-PDH foram obtidos utilizando-se as duas linhagens de leveduras de panificação usadas na propagação, sob as mesmas condições de cultivo. A linhagem de levedura LH apresenta superfície de crescimento levemente

rugosa, dificultando a operação microscópica de contagem das células viáveis. Assim, foi selecionada a linhagem de levedura GD0 para dar continuidade ao trabalho.

A atividade específica da glicerol-3-fosfato desidrogenase de leveduras crescidas em meio YP glicerol 3% e etanol 1% foi 25% maior quando comparada com a mesma atividade de leveduras crescidas em meio contendo apenas glicerol como fonte de carbono. A vantagem da adição de 1% de etanol sobre o glicerol para compor a fonte de carbono se refletiu no acúmulo de biomassa sendo 4,4 vezes maior do que a biomassa final gerada em meio YP glicerol 4%, Tabela II.

TABELA II - Efeito da fonte de carbono sobre a biomassa e a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase em células da linhagem GD0

Meio (% , v/v)	Biomassa final (mg/mL)	Atividade	
		U/mL	U/mg
YP-glicerol	3,6	1,0	0,06
YP-glicerol(3%)/ etanol (1%)	15,9	1,9	0,08
YP-etanol (4%)	12,4	1,6	0,07

O crescimento de leveduras de panificação em meio contendo glicerol/etanol (meio indutor da síntese de G-3-PDH), seguida da adição de 0,6 M de cloreto de sódio, estimulou a atividade desta enzima intracelularmente. A Tabela III mostra os resultados obtidos com células de leveduras da linhagem GD0 crescidas em meio YP-glicerol-etanol por 48 horas, seguido de tratamento osmótico com cloreto de sódio (0,6 M e 1,2 M) e/ou glicerol (4 e 8 %, v/v), por 2 horas. O tratamento das células de leveduras com alta concentração de sal (1,2 M) ou glicerol (4 e 8 %, v/v) não estimularam o aumento da síntese de G-3-PDH intracelularmente e o estímulo na síntese da enzima pela célula teve um limite máximo com adição de 0,6 M de NaCl.

TABELA I - Comparação entre duas linhagens de levedura de panificação quanto ao nível de atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G-3-PDH), acúmulo de biomassa e pH final após crescimento por 48 horas em meio YP-glicerol 3% e etanol 1%

Linhagem	Cultivo			Extrato Celular Bruto		
	Valor do pH		Biomassa Final (mg/mL)	Proteína Total		Atividade (U/mg)
	Inicial	Final		(mg/mL)	(U/mL)	
GD0 ^a	4,5	5,0	15,9	24,2	1,9	0,08
LH ^b	4,5	4,9	16,0	19,0	1,7	0,09

a – procedência Fleischmann & Royal (Brasil); b – procedência Gist-Brocades (Holanda)

TABELA III - Efeito do choque osmótico sobre atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase de linhagem GD0

Tratamento ^a		Extrato Celular Bruto		
NaCl (M)	Glicerol (% v/v)	Proteína Total (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade (U/mg)
0,0	0,0	24,2	1,9	0,08
0,6	0,0	24,8	2,2	0,09
1,2	0,0	25,7	1,9	0,07
0,0	4,0	21,4	1,5	0,07
0,0	8,0	16,9	1,1	0,06
0,6	4,0	33,0	2,2	0,07

^a por 2 horas sobre células crescidas em meio YP-glicerol 3 %/etanol, 1% por 48 horas.

Os ensaios de estocagem das células de leveduras crescidas em nosso laboratório foram realizados sob três diferentes condições de temperaturas (27 °C; 4-5 °C e -18 °C). As determinações de atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase foram realizadas em células de leveduras de panificação propagadas em meio YP glicerol-etanol, por 48 horas, seguidas de tratamento osmótico por duas horas com NaCl 0,6 M, lavadas, congeladas, liofilizadas e mantidas a: 27 °C; 4-5 °C e -18 °C. A Tabela IV mostra a variação da atividade de glicerol-3-fosfato

desidrogenase em função do tempo de estocagem. As células liofilizadas puderam ser estocadas à temperatura de geladeira ou em congelador por período de até 8 meses sem prejuízo de atividade da G-3-PDH e com redução de até 20% na viabilidade celular. A velocidade de queda na viabilidade celular foi maior em células liofilizadas e estocadas à temperatura ambiente (27 °C), que apresentaram uma pequena ativação na atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase após o segundo dia de estocagem.

DISCUSSÃO

Os processos biotecnológicos direcionados à produção de alimentos vêm, atualmente, sendo utilizados como importante ferramenta para suprir a demanda do consumidor por um produto seguro, natural, fresco e conveniente (Lerayer *et al.*, 2000). Alimentos fermentados ou adicionados de microrganismos, para serem utilizados em dietas humanas (Salminen *et al.*, 1998) ou animais (Angeles *et al.*, 1998), tanto podem ter aumentado sua qualidade nutricional pela melhora na sua digestibilidade (Caplice, Fitzgerald, 1999) como apresentar aumento na sua qualidade funcional, por introdução de fibras, vitaminas, antioxidantes, entre outros, presentes numa grande variedade de produtos fermentados (Steinkraus, 1998).

A variação da pressão osmótica, fator importante na manutenção da viabilidade celular em *Saccharomyces*

TABELA IV - Efeito do tempo e da temperatura de estocagem de leveduras de panificação crescidas por 48 horas em meio YP-glicerol 3% e etanol 1% seguida de tratamento osmótico com NaCl 0,6 M, sobre a viabilidade celular, proteína total e o nível de atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase (G-3-PDH)

Estocagem			Extrato Celular Bruto		
Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Viabilidade celular (%)	Proteína Total (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade (U/mg)
27	0	100	29,0	1,8	0,06
	2	100	29,0	1,9	0,07
	4	98	29,1	2,1	0,07
	10	89	28,5	2,1	0,07
5	0	100	29,0	1,9	0,07
	15	98	29,6	2,2	0,08
	30	96	28,4	2,2	0,08
	120	90	27,2	2,1	0,08
	240	80	25,6	1,9	0,08
-18	0	100	29,0	1,9	0,07
	120	95	28,1	2,1	0,07
	240	84	26,7	2,1	0,08

cerevisiae (Beney *et al.*, 2000), e o acompanhamento cinético de enzima indicativa do acúmulo do glicerol intracelular, glicerol-3-fosfato desidrogenase, podem estar correlacionados com a manutenção da vida da célula em alimentos. Ensaios envolvendo reações que utilizem enzimas conduzem a resultados confiáveis e rápidos para análises em alimentos fermentados.

A síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase foi estimulada pela adição de altas concentrações de NaCl sobre células crescidas em meio contendo glicose como fonte de carbono em estudos realizados por Gancedo *et al.*, 1968. Abertyn *et al.* (1998) mostraram que a repressão provocada pela glicose e a resposta da célula ao estresse osmótico são controladas por sistemas de regulação independentes e a repressão pela glicose não apareceu em condições de osmolaridade alta, quando se tratou da síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase. Nossos resultados mostram que a síntese da glicerol-3-fosfato desidrogenase foi estimulada com o tratamento osmótico (0,6 M de NaCl) em células de leveduras crescidas em meio indutor (YP-glicerol/etanol). A adição de glicerol (4% e 8%) não foi suficiente para aumentar ainda mais a síntese da enzima, porém, o nível de proteína total gerada pela célula foi 36% maior após tratamento por 2 horas com 0,6 M de NaCl e 4% de glicerol (Tabela III).

Células com altos teores de glicerol interno foram submetidas a diversos procedimentos de estocagem e monitoradas pelo acompanhamento da atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase. O acompanhamento da atividade de uma enzima microbiana durante um período de estocagem de células, sob diversas temperaturas, pode mostrar a eficiência do processo de preservação do alimento contendo microrganismos vivos na sua formulação. Sampedro *et al.* (1998) verificaram que não houve mudança estrutural da enzima H⁺-ATPase do microrganismo *Kluyveromyces lactis*, quando estas células foram preservadas sob congelamento na presença de altas concentrações de açúcares. Da mesma forma, a adição de cloreto de sódio sobre leveduras eleva a pressão osmótica na célula e induz a formação do glicerol, que é um protetor celular (André *et al.*, 1991; Blomberg, Adler, 1992; Neves *et al.*, 1997). A manutenção da viabilidade celular acima de 80%, e da atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase durante estocagem por período de até 8 meses à temperatura de -18 °C tornam possível esta metodologia de acompanhamento de estocagem de células de leveduras.

CONCLUSÃO

Com base nos parâmetros apresentados, pode-se sugerir que, por meio do acompanhamento da atividade de

uma enzima chave do metabolismo celular, como a glicerol-3-fosfato desidrogenase, e da viabilidade da levedura, é possível estudar formas de estocagem de *Saccharomyces cerevisiae* para serem agregados a alimentos, contribuindo para a melhoria das suas qualidades nutricionais e sensoriais. A manutenção de células contendo altos teores de glicerol interno, sob temperaturas de 4-5 °C ou -18 °C, apresentou os melhores resultados em relação à atividade de glicerol-3-fosfato desidrogenase de leveduras de panificação.

ABSTRACT

The effect of storage temperature on the glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity of baker's yeasts

Intracellular levels of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G-3-PDH) in baker's yeasts were monitored during storage at 3 different temperatures. Similar values for final biomass and specific activity of the enzyme were found, in each of two strains of baker's yeast, after 48 hours growth. The best medium tested, for the induction of G-3-PDH, contained: yeast extract (1% w/v), peptone (2% w/v), glycerol (3% w/v) and ethanol (1% w/v). Osmotic shock, provoked by suspending cells, after 48 hours growth in inducing medium, in 0.6 M NaCl solution for 2 hours, caused the activity to increase by a factor of 1.2. Cells of the GDO yeast strain, grown in inducing conditions, washed and lyophilized, exhibited a 35% rise in G-3-PDH activity during storage (10 days) at ambient temperature (about 27 °C). Both refrigeration (4-5 °C) and freezer storage (-18 °C) maintained the G-3-PDH activity for up to 8 months.

UNITERMS: Storage temperature. Baker's yeast. Enzyme activity. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Leveduras Industriais do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 98/14881-7).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M., BENABARRE, A., TEXIDÓ, N., USALL, J., VIÑAS, I. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 65, p. 173-182, 2001.

- ALBERTYN, J., HOHMANN, S., THEVELEIN, J. M., PRIOR, B. A. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate deshydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, Washington, v. 14, p. 4135-4144, 1998.
- ANDRÉ, L., HEMMING, A., ADLER, L. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett.*, Amsterdam, v. 286, p. 13-17, 1991.
- ANGELES, S.C.C., MENDOZA, G.D.M., COBOS, M.A.P., CROSBY, M.M.G., CASTREJÓN, F.A.P. Comparison of two commercial yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed on corn-storver diet. *Small Ruminant Res.*, Amsterdam, v. 31, p. 45-50, 1998.
- BENEY, L., MARAÑÓN, I.M., MARECHAL, P., GERVAIS, P. Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 55, p. 275-279, 2000.
- BLOMBERG, A., ADLER, L. Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in regulation to physiological state. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 11, p. 1087-1092, 1983.
- BLOMBERG, A., ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.*, London, v. 33, p. 145-212, 1992.
- BRUEL, S., COOTE, P. Preservative agents in foods – Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 50, p.1-17,1999.
- BRUINENBERG, P. M. The NADP(H) Redox couple in yeast metabolism: fundamental and applied aspects. 1985. 136p. [Thesis, (PhD) - Delf University of Techonology, The Netherlands].
- CAPLICE, E., FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 50, p. 131-149, 1999.
- EDGLEY, M., BROWN, A. D. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v. 129, p. 3453-3463, 1983.
- GANCEDO, C., GANCEDO, J. M., SOLS, A. Glycerol metabolism in yeasts: pathways of utilization and production. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v. 5, p.165-172, 1968.
- GOWARD, C. R., ATKINSON, T., SCAWEN, M. D. Rapid purification of glucokinase and glycerokinase from *Bacillus stearothermophilus* by hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 369, p. 235-239, 1986.
- GROLEAU, D., CHEVALIER, P., TSE HING YEUN, T. L. S. Production of polyols and ethanol by the osmophylic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biotechnol. Lett.*, London, v. 17, p. 315-320, 1995.
- LABCONCO MANUAL. *A guide to freeze drying for the Laboratory*. Kansas City: Labconco Company, 1998, p. 11.
- LARSON, K., ANSELL, R., ERICKSSON, P., ADLER, L. A gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v. 10, p. 1101-1111, 1993.
- LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: COLOWICH, S.P., KAPLAN, N.O. eds, *Methods Enzymol.*, New York: Academic, v. 73, 1975. p. 448-450.
- LEE, S.S., ROBISON, F.M., WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v. 11, p.641-649, 1981.
- LERAYER, A.L.S., GRAEL-MARASCA, E.T., VIALTA, A. Utilização de microrganismos geneticamente modificados na indústria de alimentos. In: GIÚDICE, M.P., BORÉM, A., SILVA, P.H.A., MONTEIRO, J., B., R., COSTA, N.M.B., OLIVEIRA, J. S., eds. *Alimentos transgênicos*. Viçosa: UFV, 2000. p.201-274.
- MARECHAL, P.A., MARTINEZ de MARNAÑÓN, I., POIRIER, I., GERVAIS, P. The importance of the kinetics of application of physical stresses on viability of microorganisms: significance for minimal food processing. *Trends Food Sci. Techonol.*, Cambridge, v.10, p. 15-20, 1999.

- NEVES, M.L., OLIVEIRA, R.P., LUCAS, C.M. Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, New York, v. 143, p. 1133-1139, 1997.
- SALMINEN, S., vonWRIGHT, A., MORELI, L., MARTEAU, D.B., VOS, W.M., FONDÉN, R., SAXELIN, M., COLLINS, K., MOGENSEN, G., BIRKELAND, S., MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.44, p. 93-106, 1998.
- SAMPEDRO, J.G., GUERRA, G., PARDO, J.P., URIBE, S. Trehalose-mediated protection of plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* during freeze-drying and rehydration. *Cryobiology*, New York, v.37, n.2, p.131-138, 1998.
- STEINKRAUS, K.H. Bio-enrichment production of vitamins in fermented foods. In: WOOD, B. J. B., ed. *Microbiology of Fermented Foods*. 2 ed. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p. 603-619.
- WIELAND, O. Glycerol, UV-Method. In: BERGMAYER, H. U., ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2 ed. New York: Academic Press, 1974. p.1404-1409.

Recebido para publicação em 05 de novembro de 2001.