

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL - CTA

VALKIREA MATOS NASCIMENTO

**FISIOLOGIA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*
CAT-1 E DA BACTÉRIA *Burkholderia sacchari* LFM 101 EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Dourados

2016

VALKIREA MATOS NASCIMENTO

**FISIOLOGIA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*
CAT-1 E DA BACTÉRIA *Burkholderia sacchari* LFM 101 EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO GRACIANO FONSECA

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Tecnologia Ambiental.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N244f	<p>Nascimento, Valkirea Matos. Fisiologia da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 e da bactéria <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 em diferentes condições de cultivo. / Valkirea Matos Nascimento. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 51f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Bioprocessos. 2. Metabolismo. 3. Cinética. 4. Repressão catabólica. I. Título.</p>
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

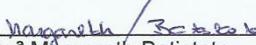


Termo de Aprovação

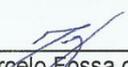
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "**Fisiologia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e da bactéria *Burkholderia sacchari* LFM 101 em diferentes condições de cultivo**", de autoria de **Valkirea Matos Nascimento**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Presidente da banca examinadora



Prof.^a Dr.^a Margareth Batistote
Membro Examinador (UEMS)



Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 25 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, e aos meus pais e irmãs, pelo suporte em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e coragem durante toda esta caminhada, por me dar força para alcançar meus objetivos e me confortar nos momentos difíceis.

A minha família, fonte de constante apoio e incentivo durante todos esses anos de estudo. Obrigada pai, mãe e irmãs pelo amor, paciência e compreensão.

Aos integrantes do Grupo de Bioengenharia (BIOENG) pelo conhecimento, companheirismo e amizade desfrutados neste período. Aqui não cito nomes, pois todos, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pela orientação e confiança em mim depositada, pelos conhecimentos transmitidos, apoio e experiência adquirida.

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez por ceder um dos microrganismos estudados e pelos conhecimentos transmitidos sobre biopolímeros.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A UFGD pela formação profissional proporcionada.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

“Quem não pode fazer grande coisa, faça ao menos o que estiver na medida de suas forças; certamente não ficará sem recompensa.”

(Santo Antônio de Pádua)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Objetivos	1
2 FISIOLOGIA DA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	2
2.1 Introdução	2
2.2 Metodologia	4
2.2.1 Microrganismo e manutenção	4
2.2.2 Meio de cultura e condições de cultivo	4
2.2.3 Cultivos em combinações binárias de substratos	5
2.2.4 Amostragens e preparo das amostras	5
2.2.5 Determinação da biomassa e pH	5
2.2.6 Determinação da concentração de açúcares e metabólitos extracelulares	6
2.2.7 Determinação de parâmetros cinéticos	6
2.2.8 Análise estatística	7
2.3 Resultados e discussão	7
2.3.1 Cultivos em diferentes substratos como única fonte de carbono	7
2.3.2 Cultivos em combinações binárias de monossacarídeos	12
2.3.2.1 Glicose mais galactose	16
2.3.2.2 Glicose mais frutose	17
2.3.2.3 Frutose mais galactose	19
2.4 Conclusão	20
2.5 Referências	20
3 CRESCIMENTO DE <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 COM SUBSTRATOS SACAROSE, GLICOSE E GLICEROL EM DIFERENTES TEMPERATURAS	23
3.1 Introdução	23
3.2 Metodologia	24

3.2.1 Microrganismo e preservação	24
3.2.2 Meio de cultivo	25
3.2.3 Cultivos em incubador rotativo	26
3.2.4 Determinação da biomassa	26
3.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos	26
3.2.6 Extração do polímero	27
3.2.7 Determinações da concentração de metabólitos extracelulares	27
3.2.8 Determinações de PHA por cromatografia gasosa	27
3.2.9 Análise estatística	28
3.3 Resultados e discussão	28
3.4 Conclusão	33
3.5 Referências	33
4. CONCLUSÕES GERAIS	35
5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	36
5.1 Artigo completo publicado em anais de congressos	36
5.2 Resumos expandidos publicados em anais de congressos	36
5.3 Artigo aceito para publicação	36
APÊNDICES	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Parâmetros cinéticos dos cultivos realizados com <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em diferentes fontes de carbonos e temperaturas.....	8
Tabela 2.2. Parâmetros cinéticos dos cultivos realizados com <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 com diferentes combinações de fontes de carbonos e temperaturas.....	15
Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos dos cultivos com <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101, a partir de glicose, sacarose e glicerol nas temperaturas de 30 e 35°C.....	29

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1. Cinética de crescimento, a formação de metabólito e o consumo de açúcar durante cultivos com a glicose/30°C, b glicose/37°C, c frutose/30°C, d frutose/37°C, e sacarose/30°C, f sacarose/37°C, g galactose/30°C, h galactose/37°C, i maltose/30°C, j maltose/37°C.....	9
Figura 2.2. Vias metabólicas de degradação dos substratos glicose, frutose, sacarose, maltose e galactose.....	14
Figura 2.3. Cinética de crescimento, formação de metabólitos e consumo de substratos com culturas de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em uma mistura binária de glicose e galactose (5 g×L ⁻¹ de cada substrato / 30 e 37°C).....	17
Figura 2.4. Cinética de crescimento, formação de metabólitos e consumo de substratos com culturas de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em uma mistura binária de glicose e frutose (5 g×L ⁻¹ de cada substrato / 30 e 37°C).....	18
Figura 2.5. Cinética de crescimento, formação de metabólitos e consumo de substratos com culturas de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em uma mistura binária de frutose e galactose (5 g×L ⁻¹ de cada substrato / 30 e 37°C).....	19
Figura 3.1. Cinética de crescimento de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 com glicose à 35°C.....	30
Figura 3.2. As vias metabólicas para a assimilação de glicerol por microorganismos e formação de PHA (adaptado a partir de RIVALDI et al., 2012).....	32

RESUMO

Diversos parâmetros podem interferir na eficiência dos processos biotecnológicos. Assim, o estudo fisiológico dos microrganismos é de fundamental importância para que esta eficiência seja alcançada. Este trabalho foi dividido em duas partes, na primeira realizou-se o estudo fisiológico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 utilizando-se cinco açúcares (avaliados como única fonte de carbono e em combinações binárias) a 30°C e 37°C. Frutose, sacarose e maltose apresentaram os maiores fatores de conversão de substrato a etanol ($0,40 \text{ g}_{\text{Eth}} \times \text{g}_{\text{S}}^{-1}$), em ambas as temperaturas, e a galactose foi o açúcar pelo qual a levedura apresentou menor afinidade dada a menor velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{max}}=0,28 \text{ h}^{-1}$). Em combinações de açúcares houve níveis de repressão entre os substratos e a levedura mostrou preferência pelos açúcares com menos reações metabólicas para sua degradação. Na segunda parte fez-se o estudo fisiológico da bactéria *Burkholderia sacchari* LFM 101 visando à produção de polihidroxialcanoatos (PHAs). Foram avaliados os efeitos de três diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol) sobre o seu crescimento e produção de PHA a 30°C e 35°C. Os resultados mostraram que *Burkholderia sacchari* cultivada com glicose a 35°C apresentou tanto uma maior produtividade ($0,054 \text{ g} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) quanto rendimento de polímero em massa celular seca (41%). Entre os ensaios com sacarose e glicose não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os limites de velocidade para o crescimento (μ_{max}), mas a mudança na temperatura influenciou o rendimento e o acúmulo de PHA. O cultivo com glicerol como a única fonte de carbono não foi expressivo pela necessidade de energia específica para a quebra da molécula.

Palavras-chave: Bioprocessos; Metabolismo; Cinética; Repressão catabólica.

ABSTRACT

Several parameters can interfere in the biotechnological processes efficiency. Thus, the physiological study of microorganisms is of fundamental importance for this efficiency to be achieved. This study was divided into two parts; the first held the physiological study of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 using five sugars (measured as the sole carbon source and binary combinations) at 30°C to 37°C. Fructose, sucrose and maltose ethanol showed higher substrate conversion factors ($g_{Eth} \times 0.40 g_s^{-1}$), at both temperatures, and galactose was the sugar in which yeast showed lower affinity given the lowest maximum specific growth rate ($\mu_{max} = 0.28 h^{-1}$). In combinations of sugars there were levels of repression among substrates and yeast showed preferably by sugar with less metabolic reactions for their degradation. In the second part it made the physiological study of the bacteria *Burkholderia sacchari* LFM 101 aiming at the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs). The effects of three different carbon sources (glucose, sucrose and glycerol) on the growth were evaluated and over the production of PHA at 30°C to 35°C. The results showed that *Burkholderia sacchari* cultivated with glucose at 35°C has showed much greater yield ($0.054 g \times L^{-1} \times h^{-1}$) and polymer yield of dry weight biomass (41%). Between the tests on sucrose and glucose there were no significant differences to be observed ($p > 0.05$) between the speed limits of growth (μ_{max}), but the change in the temperature affected the yield and the accumulation of PHA. The cultivation with glycerol as the sole carbon source was not meaningful over the necessity of specific energy to break the molecule.

Keywords: Bioprocess; Metabolism; Kinetics; Catabolic repression.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta dissertação apresenta as atividades realizadas pela aluna Valkirea Matos Nascimento durante o seu mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O mestrado ocorreu de março de 2014 a fevereiro de 2016. O texto foi estruturado de modo que cada capítulo venha corresponder a uma publicação, exceto esta introdução geral (Capítulo 1) e a conclusão geral (Capítulo 4). Assim, este trabalho foi organizado da seguinte forma:

- Capítulo 2. Fisiologia da *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em diferentes condições de cultivo;
- Capítulo 3. Crescimento de *Burkholderia sacchari* LFM 101 com substratos sacarose, glicose e glicerol em diferentes temperaturas.

1.1 Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o comportamento da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 através de seus parâmetros cinéticos obtidos a partir de cultivos em meio sintético, utilizando-se cinco açúcares (avaliados como única fonte de carbono e em combinações binárias) nas temperaturas de 30°C e 37°C; e, estudar os efeitos de três diferentes fontes de carbono em *Burkholderia sacchari* LFM 101, o seu crescimento e produção de polihidroxialcanoatos (PHA) a 30°C e 35°C.

2 FISILOGIA DA *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

RESUMO: *Saccharomyces cerevisiae* são microrganismos utilizados nos processos industriais de etanol, e durante o processo, isolados selvagens são capazes de persistir e até mesmo predominar nos fermentadores. *S. cerevisiae* CAT-1 é um destes isolados que se destaca por mostrar uma capacidade de fermentação muito eficiente, especialmente em altas concentrações de açúcar. O efeito da interação entre as fontes de carbono na eficiência fermentativa das leveduras pode ser um fator importante para melhorar os bioprocessos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 em diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, maltose e galactose), avaliados como única fonte de carbono e em combinações binárias, em duas temperaturas (30°C e 37°C). Os dados mostraram que os açúcares frutose, sacarose e maltose apresentaram os maiores fatores de conversão de substrato a etanol ($0,40 \text{ g}_{\text{Eth}} \times \text{g}_{\text{S}}^{-1}$), em ambas temperaturas, e a galactose foi o açúcar que a levedura apresentou menor afinidade dada a menor velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{max}}=0,28 \text{ h}^{-1}$). Em combinações de açúcares a levedura mostrou preferência pelos açúcares com menos reações metabólicas para sua degradação.

Palavras-chave: Bioprocesso; Repressão catabólica; Cinética.

2.1 Introdução

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são os principais agentes iniciadores do processo fermentativo para a produção de etanol, mas normalmente, durante o processo fermentativo, devido à falta de esterilização do mosto de fermentação e da forma não asséptica na qual o processo é conduzido, propicia a contaminação por linhagens de leveduras selvagens. Com o passar dos anos, foi revelado que alguns isolados selvagens são capazes de persistir e até mesmo predominar nos fermentadores, tornando-se mais adaptados para o processo de fermentação que a cultura inicial. Algumas destas linhagens selvagens são capazes de promover uma produção de álcool mais elevada (com alto rendimento de etanol e reduzida formação de glicerol), sem provocar problemas técnicos (tais como a formação de espuma ou floculação) (BASSO et al., 2011a; DELLA-BIANCA et al., 2013).

Após 12 anos estudando e isolando leveduras nos processos industriais, Basso et al. (2008) selecionaram 14 linhagens que apresentavam alto desempenho fermentativo em escala laboratorial, porém poucas linhagens apresentaram a capacidade de serem reintroduzidas no processo industrial. Neste estudo, duas linhagens de *S. cerevisiae* (CAT-1 e PE-2) apresentaram uma elevada capacidade de implantação industrial e maior competitividade em relação às cepas contaminantes do processo, podendo representar uma média de 45% a 54% da biomassa de leveduras, ou até mesmo, em algumas destilarias, representar a biomassa total ao final de uma temporada de fermentação.

Algumas linhagens selecionadas já se tornaram comercialmente disponíveis no final de 1990, e na atualidade, mais da metade das destilarias do país utilizam uma ou a mistura de duas linhagens como iniciadoras no processo de fermentação (BABRZADEH et al., 2012). As linhagens CAT-1 e PE-2 são as cepas selecionadas mais utilizadas como iniciadoras nas usinas no Brasil, correspondendo a cerca de 80% da levedura seca comercializada. São responsáveis por 60% do total de produção de etanol nacional (BASSO et al., 2011a). *S. cerevisiae* CAT-1 destaca-se por mostrar uma capacidade de fermentação muito eficiente, especialmente em altas concentrações de açúcar, e também por mostrar elevado potencial para a produção de destilados a partir de cereais, quando comparada a outras leveduras (BASSO et al., 2008; BABRZADEH et al., 2012).

A glicose é o açúcar preferido pelas células para a fermentação, porém alguns processos biotecnológicos utilizam matérias primas complexas e para que se tenha eficiência do processo e qualidade do produto exige-se uma fermentação completa de todos os açúcares disponíveis na matéria prima. Desta forma uma fermentação lenta e incompleta dos açúcares pela levedura representa perda econômica para indústria (DUVAL et al., 2010).

Para os processos biotecnológicos onde a *S. cerevisiae* atua, os meios de cultura devem conter necessariamente, além de uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, sais e vitaminas. Os principais compostos utilizados como fonte de carbono por levedura são os monossacarídeos (frutose, glicose e galactose) e os dissacarídeos (maltose e sacarose). Devido às diferentes rotas metabólicas utilizadas pelas leveduras, se faz necessário o estudo da interação entre as fontes de carbono para um melhor entendimento de seu metabolismo (SANTOS et al., 2013).

O efeito da interação entre as fontes de carbono na eficiência fermentativa das leveduras pode ser um fator importante para melhorar os bioprocessos que utilizam estes microrganismos. Uma mesma levedura pode apresentar diferentes comportamentos dependendo do tipo e da variedade de substrato utilizada durante um processo, que podem estar relacionadas a mecanismos de repressão (BATISTOTE et al., 2010; SANTOS et al., 2013).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho fisiológico da levedura *S. cerevisiae* CAT-1, cultivada em meio sintético, utilizando diferentes fontes de carbono (avaliados como única fonte e em combinações binárias) e duas temperaturas, bem como avaliar seus parâmetros cinéticos.

2.2 Metodologia

2.2.1 Microrganismo e manutenção

Neste estudo foi utilizada a levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1, gentilmente cedida pela Usina São Fernando Açúcar e Álcool de Dourados - MS. A levedura foi mantida em ágar YPD (ágar $15 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$, extrato de levedura, $10 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$; peptona, $20 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$; glicose, $20 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$).

2.2.2 Meio de cultura e condições de cultivo

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio mineral. O meio mineral continha por litro de água destilada: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,0 g; KH_2PO_4 , 3,0 g; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; 1 mL de elementos-traço (preparada em água desmineralizada, contendo por litro: EDTA, 15 g; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5 g; $\text{MnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,5 g; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g; H_3BO_3 , 1,0 g; KI, 0,1 g), com pH final de 6,0 e autoclavado (121°C , 15 min), posteriormente adicionou-se ao meio 1 mL de solução filtro-esterilizada de vitaminas (preparada em água desmineralizada, a uma contendo por litro: D-biotina, 0,05 g; pantotenato de cálcio, 1,0 g; ácido nicotínico, 1,0 g; mio-inositol, 25 g; cloreto de tiamina, 1,0 g; piridoxina, 1,0 g; e ácido para-aminobenzóico, 0,20 g) (VERDUYN et al., 1992). As fontes únicas de carbono utilizadas foram: glicose, frutose, sacarose, maltose e galactose ($10 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$), sendo autoclavadas separadamente e adicionadas assepticamente ao meio.

Para o pré-inoculo transferiu-se uma alçada da levedura contida na placa de Petri para um frasco tipo Erlenmeyer de 500 mL com 250 mL de meio mineral,

acrescido da fonte de carbono testada, e assim levados a incubador rotativo orbital a 200 rpm, a 30°C ou 37°C durante 12 h. Após este período, fez-se o inóculo em um novo frasco. A este novo frasco foi adicionado, a fonte de carbono testada e uma alíquota do pré-inóculo de modo que a densidade óptica inicial (OD_{600nm}) fosse 0,1. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

2.2.3 Cultivos em combinações binárias de substratos

Para cultivos em combinações binárias de substratos utilizou-se os mesmos procedimentos descritos no item 2.2.2, diferindo apenas nas fontes de carbono. Neste experimento fez-se combinações, dois a dois, apenas dos monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) em uma concentração final de $10 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ($5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ de cada substrato).

2.2.4 Amostragens e preparo das amostras

Amostragens foram realizadas a cada 30 minutos (retirando-se no máximo 4 mL por amostragem) e colocadas em banho de gelo. Destes, 2 mL foram utilizados para leitura da densidade óptica (OD_{600nm}), seguida de diluições adequadas (quando necessário) e os outros 2 mL restantes foram centrifugados (17.609 xg , 5 min., 5°C). O sobrenadante foi congelado a -80°C para posterior determinação das concentrações de açúcares e metabólitos extracelulares. A fração sedimentada foi utilizada para a determinação da concentração de biomassa.

2.2.5 Determinação da biomassa e pH

Para a análise da biomassa, o sedimento obtido após centrifugação da amostra foi seco em estufa (105°C) até peso constante. A massa celular seca ($\text{g}\times\text{L}^{-1}$) foi obtida pelo quociente entre a diferença de peso por volume de meio centrifugado. Biomassa (X) também foi determinada indiretamente através de medições de DO realizadas com um espectrofotômetro a 600 nm. Para este fim, os valores de absorbância medidos foram convertidos em valores de massa utilizando uma relação linear (unidades DO por grama de biomassa seca) determinada para cada experimento. O pH foi obtido através de aferições potenciométricas.

2.2.6 Determinação da concentração de açúcares e metabólitos extracelulares

Açúcares, etanol, glicerol e ácidos orgânicos foram determinados por UPLC Agilent 1290, equipado com coluna Rezex ROA – Organic Acid H⁺ (8%) (Phenomenex). A corrida foi realizada de forma isocrática com fase móvel ácido trifluoroacético (TFA) a 0,005 M, a uma vazão de 0,6 mL×min⁻¹, com temperatura de 55°C e o volume injetado foi de 20 µL. Estes compostos foram detectados por um detector refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados (adaptado de FONSECA et al., 2013).

Apenas para a o cultivo em combinação binária com frutose e galactose adaptou-se o procedimento para a separação dos picos cromatográficos referentes a estes dois açúcares. Neste caso, utilizou-se coluna Zorbax Carbohydrate (Agilent), com fase móvel composta de 75% de acetonitrila e 25% de ácido trifluoroacético (TFA) a 0,005 M a uma vazão de 0,3 mL×min⁻¹.

2.2.7 Determinação de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados conforme descrito por Fonseca et al. (2013). A fase exponencial de crescimento (FEC) foi identificada como a região linear da plotagem do ln (DO) em função do tempo para os dados de cultivo. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) foi determinada como a inclinação desta reta e o tempo de duplicação (TD) pelo quociente do ln(2) pelo μ_{max} . A concentração máxima de biomassa (X_{max}) foi obtida através de curva de calibração.

O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi determinado como a inclinação da linha obtida pela plotagem da concentração celular (X) em função da concentração de substrato (S). O fator de conversão de substrato a produto (etanol, glicerol ou ácido acético) ($Y_{Eth/S}$; $Y_{Gly/S}$; $Y_{Ace/S}$) foi determinado a partir da concentração do produto em relação concentração de substrato. As produtividades máxima em célula (P_{Cel}) e em etanol (P_{Eth}) foram obtidas segundo a Equação 1:

$$P_{Cel} \text{ ou } P_{Eth} = \frac{(X_t \times X_0)}{(t \times t_0)} \quad (1)$$

onde X_t é a concentração de biomassa ou etanol (g×L⁻¹) no tempo t (h), e X_0 a concentração de biomassa (g×L⁻¹) no tempo t_0 (h).

A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$\mu_S = \frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} \quad (2)$$

onde μ_{max} = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}); X = concentração celular no biorreator ($g_{MCS} \times L^{-1}$); μ_S = velocidade específica de consumo de substrato durante a FEC (h^{-1}); S = concentração de substrato no biorreator ($g \times L^{-1}$); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato a células durante a FEC ($g_{MCS} \times g^{-1}$); MCS = massa celular seca.

Para os cultivos binários, os níveis de repressão foram determinados de acordo com a concentração do primeiro substrato consumido quando o segundo substrato inicia sua curva de declínio, valores estes, obtidos através da visualização dos gráficos experimentais.

2.2.8 Análise estatística

O programa Microsoft Excel 2010 foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para determinar diferenças entre as variáveis temperatura e substrato, no intervalo de 95% de confiança.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Cultivos em diferentes substratos como única fonte de carbono

Os parâmetros cinéticos obtidos durante os cultivos com *S. cerevisiae* CAT-1 são apresentados na Tabela 2.1. Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas na metodologia com relação à variação da fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose, maltose ou galactose) e a temperatura (30°C ou 37°C). A Figura 2.1 mostra as cinéticas de crescimento, formação de metabólitos e consumo dos açúcares.

Tabela 2.1. Parâmetros cinéticos dos cultivos realizados com *S. cerevisiae* CAT-1 em diferentes fontes de carbonos e temperaturas.

S ₀	T (°C)	μ_{\max} (h ⁻¹)	X _{max} (g×L ⁻¹)	TD (h)	μ_s (h ⁻¹)	Y _{X/S} (g _{MCS} ×g _S ⁻¹)	Y _{Eth/S} (g _{Eth} ×g _S ⁻¹)	Y _{Gly/S} (g _{Gly} ×g _S ⁻¹)	Y _{Ac/S} (g _{Ac} ×g _S ⁻¹)	P _{Cel} (g _{MCS} ×L ⁻¹ ×h ⁻¹)	P _{Eth} (g _{Eth} ×L ⁻¹ ×h ⁻¹)
Gli	30	0,44±0,004 ^c	1,52±0,000 ^d	1,56±0,014 ^d	2,64±0,002 ^c	0,17±0,001 ^c	0,34±0,007 ^{bcd}	0,06±0,005 ^b	0,02±0,014 ^{ab}	0,15±0,005 ^{bc}	0,40±0,002 ^{abc}
	37	0,54±0,004 ^a	1,34±0,018 ^f	1,29±0,010 ^g	3,99±0,019 ^a	0,13±0,001 ^e	0,33±0,011 ^{de}	0,09±0,016 ^a	0,01±0,012 ^{ab}	0,14±0,010 ^{cde}	0,44±0,022 ^a
Fru	30	0,44±0,001 ^c	1,65±0,021 ^c	1,57±0,005 ^d	2,60±0,013 ^c	0,17±0,001 ^{bc}	0,41±0,006 ^a	0,06±0,003 ^b	0,01±0,008 ^{ab}	0,14±0,002 ^{cd}	0,35±0,010 ^c
	37	0,48±0,012 ^b	1,48±0,019 ^d	1,45±0,036 ^{ef}	3,11±0,059 ^b	0,15±0,001 ^{cd}	0,40±0,004 ^{ab}	0,12±0,002 ^a	0,03±0,004 ^a	0,16±0,000 ^{ab}	0,41±0,018 ^a
Sac	30	0,45±0,003 ^c	1,68±0,007 ^{bc}	1,54±0,011 ^{de}	2,86±0,149 ^{bc}	0,16±0,007 ^{cd}	0,40±0,030 ^a	0,06±0,004 ^b	0,02±0,001 ^{ab}	0,14±0,001 ^c	0,35±0,001 ^{bc}
	37	0,50±0,000 ^b	1,77±0,028 ^b	1,37±0,001 ^{fg}	2,69±0,115 ^c	0,19±0,008 ^{ab}	0,40±0,014 ^a	0,09±0,009 ^a	0,00±0,000 ^b	0,17±0,003 ^a	0,44±0,001 ^a
Mal	30	0,38±0,014 ^d	1,44±0,011 ^{de}	1,81±0,066 ^c	2,63±0,011 ^c	0,14±0,004 ^{de}	0,39±0,016 ^{abc}	0,02±0,004 ^c	0,01±0,004 ^{ab}	0,12±0,001 ^{def}	0,35±0,002 ^{bc}
	37	0,44±0,007 ^c	1,35±0,048 ^{ef}	1,59±0,024 ^d	3,11±0,121 ^b	0,14±0,008 ^{de}	0,42±0,017 ^a	0,03±0,002 ^c	0,01±0,002 ^{ab}	0,12±0,004 ^f	0,40±0,020 ^{ab}
Gal	30	0,28±0,001 ^f	2,02±0,029 ^a	2,50±0,012 ^a	1,36±0,011 ^e	0,20±0,001 ^a	0,34±0,001 ^{cd}	0,03±0,001 ^c	0,01±0,001 ^{ab}	0,12±0,002 ^{ef}	0,22±0,007 ^d
	37	0,35±0,000 ^e	1,99±0,004 ^a	1,99±0,002 ^b	1,80±0,023 ^d	0,19±0,002 ^a	0,28±0,005 ^e	0,01±0,002 ^c	0,00±0,001 ^{ab}	0,15±0,000 ^{bc}	0,26±0,021 ^d

Gli glicose, Fru frutose, Sac sacarose, Mal maltose, Gal galactose, S₀ substrato, T temperatura, μ_{\max} velocidade específica máxima de crescimento, X_{max} concentração máxima de células, TD tempo de duplicação, μ_s velocidade específica de consumo de substrato, Y_{X/S} fator de conversão de substrato em célula, Y_{Eth/S} fator de conversão de substrato em etanol, Y_{Gly/S} fator de conversão de substrato em glicerol, Y_{Ac/S} fator de conversão de substrato em acetato, P_{Cel} produtividade em células, P_{Eth} produtividade em etanol, MCS massa celular seca, letras iguais em uma mesma coluna não apresenta diferença significativa (p>0,05).

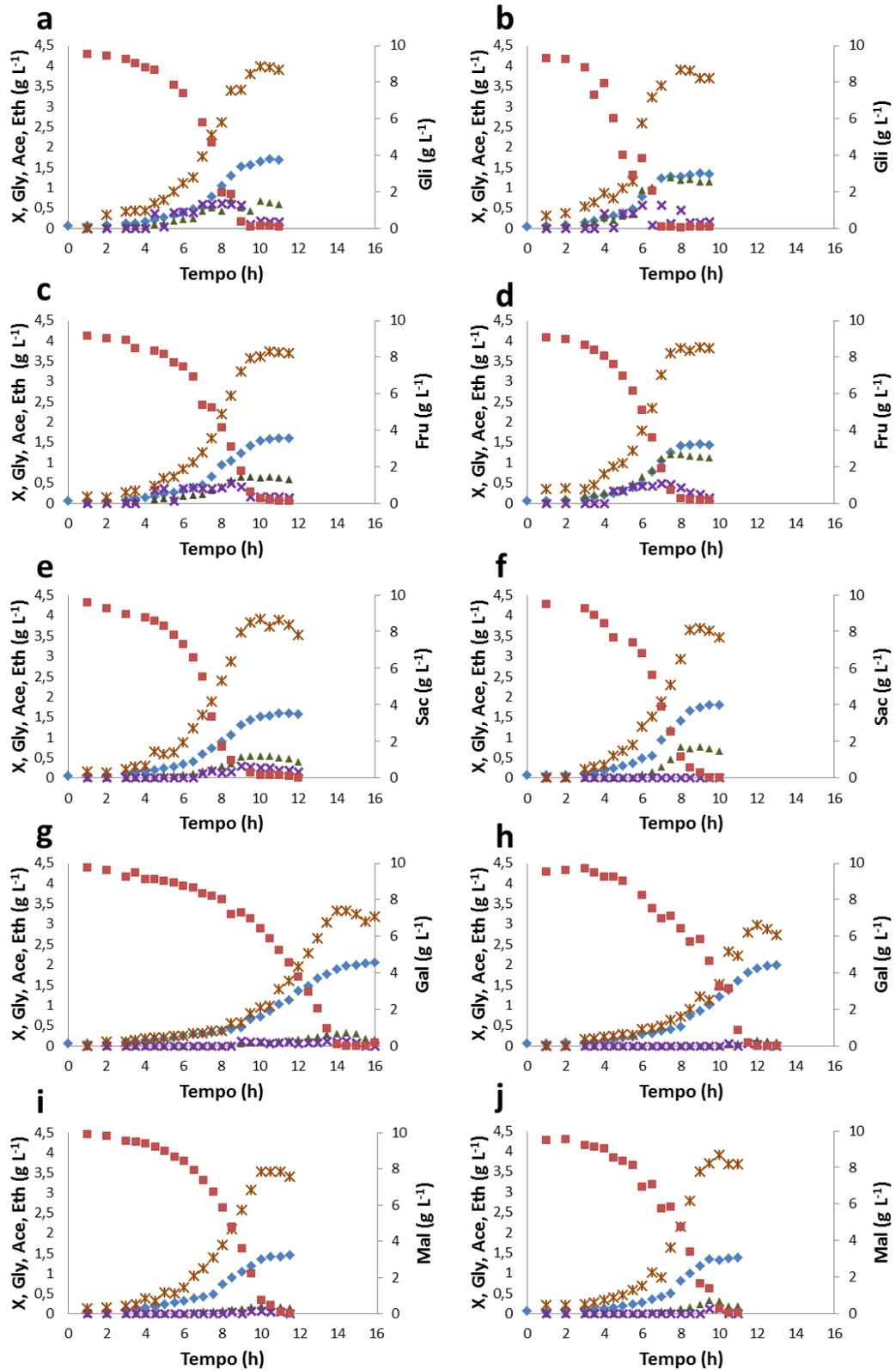


Figura 2.1. Cinética de crescimento, a formação de metabólito e o consumo de açúcar durante cultivos com **a** glicose/30°C, **b** glicose/37°C, **c** frutose/30°C, **d** frutose/37°C, **e** sacarose/30°C, **f** sacarose/37°C, **g** galactose/30°C, **h** galactose/37°C, **i** maltose/30°C, **j** maltose/37°C. (♦) X (biomassa, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (■) Gli (glicose, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$) / Fru (frutose, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$) / Sac (sacarose, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$) / Gal (galactose, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$) / Mal (maltose, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (▲) Gly (glicerol, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (×) Ace (ácido acético, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (✱) Eth (etanol, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$).

Comparando as velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{\max}), entre as temperaturas estudadas, pode-se observar que os cultivos à 37°C apresentaram maiores valores destacando-se, entre eles, o cultivo com glicose (0,54 h⁻¹) (Tabela 2.1). Outro estudo com esta mesma linhagem também revelou aumento nas velocidades de crescimento em cultivos à 37°C (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013). Isto mostra que o aumento de temperatura promoveu a aceleração do metabolismo. O substrato sacarose favoreceu o crescimento, revelando valores de μ_{\max} próximos aos obtidos com glicose (0,50 h⁻¹) (Tabela 2.1). O mesmo comportamento foi relatado por Orłowski e Barford (1991) quando avaliaram o crescimento da *S. cerevisiae* frente aos substratos frutose, glicose, sacarose e glicose + frutose.

S. cerevisiae CAT-1 tem menor afinidade pelo substrato galactose, pois em ambas temperaturas apresentaram os menores valores de μ_{\max} (Tabela 2.1). O catabolismo da galactose pela célula envolve mais reações metabólicas comparadas aos demais substratos utilizados, além de necessitar a presença de moléculas receptoras de elétrons para sua degradação (Figura 2.2), tornando assim o crescimento celular mais lento (FONSECA et al., 2013).

Com relação ao consumo de substrato (μ_S), percebe-se que estes foram influenciados pelo aumento da temperatura, onde em maior temperatura obteve-se maior velocidade, com exceção do substrato sacarose que não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) (2,86 e 2,69 h⁻¹) (Tabela 2.1). Possivelmente este fenômeno esteja relacionado ao sistema de transporte de sacarose utilizado pela levedura.

As membranas celulares não permitem a livre passagem de muitos solutos, entre eles os substratos fermentescíveis. Portanto, o transporte é o primeiro passo para o metabolismo de carboidratos, com exceção dos casos em que um di- ou trissacarídeo seja hidrolisado fora da célula. O transporte é realizado por transportadores de membrana denominados permeases. Para os monossacarídeos comuns (glicose, frutose ou manose) em *S. cerevisiae* se dá por processo de difusão facilitada (FLORES et al., 2000; STAMBUK et al., 2000).

Assim, *S. cerevisiae* pode utilizar duas maneiras para metabolizar a sacarose. No mecanismo predominante, a sacarose é hidrolisada por uma invertase extracelular. A hidrólise produz glicose e frutose, que entram na célula por difusão facilitada através de transportadores. No outro mecanismo a sacarose pode ser transportada ativamente para as células e hidrolisada intracelularmente. Ambas

invertases, extra e intracelular, são codificadas pelo mesmo gene (*SUC2*) (BASSO et al., 2011b). Stambuk et al. (2000) ainda descrevem outro mecanismo de entrada da sacarose na célula, mediado pela AGT1 permease (*MAL*). O sequenciamento da *S. cerevisiae* CAT-1 mostrou a presença destes genes (BABRZADEH et al., 2012). Ao que tudo indica estes transportadores não são influenciados pela temperatura.

Sobre a produtividade em etanol (P_{Eth}), apenas os substratos sacarose e frutose apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas. Ainda observando estes resultados, é possível notar que as maiores médias de produtividade atingidas foram a 37°C (Tabela 2.1).

Os produtos formados com concentrações mais expressivas durante os cultivos foram glicerol, etanol e acetato, destes, calcularam-se os fatores de conversão de substrato em produtos (Tabela 2.1). Os experimentos realizados neste trabalho com glicose a 30°C e 37°C apresentaram comportamento semelhante ao observado no estudo realizado por Della-Bianca e Gombert (2013) com o mesmo substrato e temperaturas.

Percebeu-se que o fator de conversão de substrato a glicerol ($Y_{Gly/S}$) aumenta significativamente ($p < 0,05$) com a elevação da temperatura apenas para os testes com glicose, frutose e sacarose (Tabela 2.1). O glicerol é conhecido por ter função protetora para as células, assim esta formação elevada de glicerol é uma resposta ao estresse térmico (FONSECA et al., 2013). O mesmo fenômeno não foi observado nos cultivos com maltose e galactose, onde os $Y_{Gly/S}$ não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) como a elevação da temperatura e foram muito baixos quando comparados aos demais substratos (média de $0,02 \text{ g}_{Gly} \times \text{g}_S^{-1}$).

Outro papel da formação do glicerol em *S. cerevisiae* é manter o equilíbrio redox citosólico (WANG et al., 2001). Para os substratos glicose, frutose e sacarose, por utilizarem o sistema de difusão facilitada para adentrar a célula, apresentam a necessidade de uma produção mais elevada de glicerol comparada aos demais substratos utilizados. A galactose já promove esse equilíbrio ao utilizar moléculas receptoras de elétrons em reações da sua via de degradação (Figura 2.2) e a maltose utiliza transporte ativo, e todos os sistemas α -glicosídeo de transporte da maltose até agora caracterizados em levedura são H^+ -simporte (DUVAL et al., 2010). Assim, em galactose e maltose, é provável que o equilíbrio redox foi alcançado sem a necessidade da produção de glicerol.

Estudos reportam que durante as fermentações industriais as células desviam cerca de 5 a 8% dos açúcares consumidos para a produção de glicerol, e esta produção esta relacionada ao estresse oferecido as células durante o processo, que podem ser osmótico, alcoólico, ácido, entre outros (BASSO et al., 2011a). Neste contexto os experimentos realizados com glicose, frutose e sacarose estão dentro do esperado (máximo 6% a 30°C e até 12% a 37°C). Já foi confirmado que *S. cerevisiae* CAT-1, juntamente com outras linhagens, apresentam esta característica de produzir menos glicerol por possuírem maior resistência às condições encontradas no processo (BASSO et al., 2008).

Os maiores fatores de conversão de substrato em etanol ($Y_{Eth/S}$) foram alcançados com frutose, sacarose e maltose em ambas as temperaturas (média de $0,40 \text{ g}_{Eth} \times \text{g}_S^{-1}$). Em outras palavras a *S. cerevisiae* CAT-1 mostrou-se mais eficiente na conversão em etanol com estes substratos (frutose, sacarose e maltose) do que com a glicose (Tabela 2.1). Estudos já tem mostrado o potencial da *S. cerevisiae* CAT-1 na fermentação de mosto de frutas (ricos em frutose), revelando alta concentração de etanol ao final dos cultivos comparada a outras linhagens de levedura (DUARTE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Os resultados deste trabalho indicam um elevado potencial de utilização desta levedura em processos que utilizem cereais como matéria prima, porém maiores estudos são necessários para elucidar o catabolismo da maltotriose (originada pela hidrólise do amido), pois quando a *S. cerevisiae* CAT-1 foi cultivada na presença de maltotriose por Duval et al. (2010) observou-se uma velocidade de crescimento muito lenta, com um longo período de latência (fase Lag).

A Figura 2.2 apresenta as possíveis vias de degradação dos substratos utilizados. Pode-se observar que para o catabolismo da frutose existem duas diferentes vias até o passo comum a todos os substratos (gliceraldeído-3-fosfato). Desta forma, para que a frutose apresente um resultado melhor que a glicose, é provável que a *S. cerevisiae* CAT-1 utilize das duas vias simultaneamente, já que estas vias são iniciadas por enzimas diferentes (frutoquinase e hexoquinase) e não compartilham nenhuma outra enzima ao longo delas.

2.3.2 Cultivos em combinações binárias de monossacarídeos

Para o melhor entendimento do metabolismo da *S. cerevisiae* CAT-1 frente as fontes de carbono, realizou-se testes com combinações binárias apenas entre os

monossacarídeos estudados (glicose, frutose e galactose) nas mesmas temperaturas. Os parâmetros obtidos estão expostos na Tabela 2.2.

Observou-se a diminuição dos valores de μ_{\max} comparado aos valores obtidos nos ensaios com uma única fonte de carbono (Tabela 2.1). A levedura teve seu crescimento mais lento devido a necessidade de preparação de um número maior de enzimas exigidas pelas vias metabólicas para cada substrato. (FONSECA et al., 2013).

Todos os ensaios apresentaram nível de repressão entre os substratos, com maior ou menor intensidade (Tabela 2.2). Neste estudo,, o nível de repressão variou entre 0 a $5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$, sendo que o menor concentração representa um maior nível de repressão. Desta forma, Gli+Fru e Fru+Gal não revelaram uma repressão metabólica alta, mantendo os níveis em 4 e $3 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ respectivamente, já o nível mais elevado foi entre Gli+Gal ($0,5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$).

Tabela 2.2. Parâmetros cinéticos dos cultivos realizados com *S. cerevisiae* CAT-1 com diferentes combinações de fontes de carbonos e temperaturas.

S ₀	T (°C)	Primeiro açúcar consumido	Nível de repressão (g×L ⁻¹)	Fase Lag	Tempo de adaptação (min)	μ _{max} (h ⁻¹)		μ _s (h ⁻¹)		Y _{X/S} (g _{MCS} ×g _S ⁻¹)	
Gli+Fru	30	Gli	4	Não	-	0,36±0,02		1,49±0,18		0,24(0,22/0,26)±0,03	
	37	Gli	4	Não	-	0,33±0,04		1,35±0,11		0,25(0,20/0,29)±0,07	
Gli+Gal	30	Gli	0,5	Sim	30	0,39±0,01	0,16±0,00	3,49±0,00	0,43±0,01	0,11±0,01	0,30±0,01
	37	Gli	0,5	Sim	30	0,39±0,01	0,23±0,02	3,16±0,11	0,99±0,16	0,16±0,02	0,29±0,01
Fru+Gal	30	Fru	3	Não	-	0,38±0,00		1,57±0,06		0,24(0,19/0,30)±0,08	
	37	Fru	3	Não	-	0,42±0,02		1,88±0,01		0,23(0,16/0,29)±0,09	

Gli glicose, Fru frutose, Gal galactose, S₀ substrato, T temperatura, μ_{max} velocidade máxima de crescimento, μ_s velocidade específica de consumo de substrato, Y_{X/S} fator de conversão de substrato em célula, MCS massa celular seca.

2.3.2.1 Glicose mais galactose

No estudo da combinação binária Gli+Gal (Figura 2.3), além do maior nível de repressão, pode-se observar a presença de duas fases de crescimento independentes, referentes a cada um dos substratos (evidenciada à 37°C), com tempo de adaptação de 30 minutos. Inicialmente, uma primeira fase de crescimento em glicose ocorreu até 8 h de cultivo, seguido por uma fase de crescimento em galactose (desde 8 até 14 h) à 37°C (nos ensaios a 30°C estes tempos foram acrescidos de aproximadamente 1 h). Apesar da presença de uma fase lag nestes experimentos, não se pode afirmar a ocorrência de diauxia, ou seja, repressão total, pois a galactose começou a ser consumida pela levedura antes que a glicose estivesse totalmente esgotada, sendo isto indicativo de que os genes necessários para a degradação da galactose já haviam sido expressos (FONSECA et al., 2013). Portanto, não houve consumo de galactose antes que a concentração de glicose atingisse $0,5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ em ambas as temperaturas.

Com a presença de duas fases distintas, calcularam-se alguns parâmetros cinéticos (Tabela 2.2). Quanto ao μ_{max} , verificou-se uma maior taxa de crescimento em glicose do que em galactose, como esperado (Tabela 2.1); e a temperatura não teve influência aparente sobre a velocidade de crescimento com glicose. Galactose atingiu um maior fator de conversão de substrato a célula comparada aos demais ensaios (Tabela 2.2).

O sistema de transporte de substrato é um passo bastante limitante para o metabolismo de carboidratos por leveduras. Ao que tudo indica neste ensaio (Gli+Gal), a repressão sobre a galactose é devida a glicose ter um forte efeito inibidor sobre a função da galactose permease codificada pelo gene *GAL2*. A alta concentração de glicose inibe a permease, impedindo a entrada de galactose suficiente para as células (MA; BOTSTEIN, 1986). Desta forma, a galactose somente passa a ser consumida quando a concentração de glicose no meio está quase exaurida ($0,5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$).

De acordo com Reifenberger et al., (1997), em *S. cerevisiae*, glicose além de servir como uma fonte de carbono, também atua como um regulador global do metabolismo e crescimento. Sua adição em cultivos de levedura

crecendo em outras fontes de carbono desencadeia uma ampla variedade de processos de regulação.

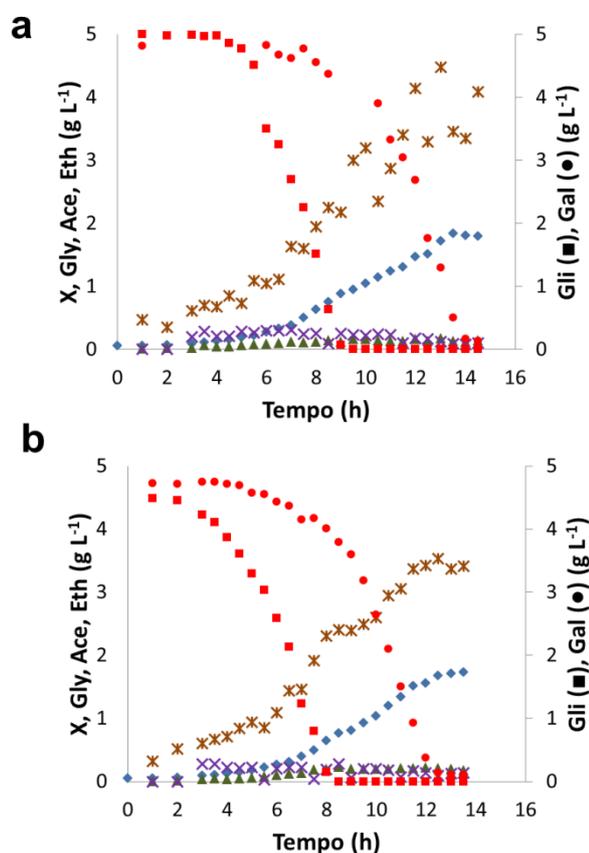


Figura 2.3. Cinética de crescimento, formação de metabólitos e consumo de substratos com culturas de *S. cerevisiae* CAT-1 em uma mistura binária de glicose e galactose ($5 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ de cada substrato). **a** 30°C ; **b** 37°C ; (♦) X (biomassa, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (■) Gli (glicose, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (●) Gal (galactose, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (▲) Gly (glicerol, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (×) Ace (ácido acético, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (✕) Eth (etanol, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$).

2.3.2.2 Glicose mais frutose

Os estudos das fontes de carbono Gli+Fru não apresentaram duas fases distintas de crescimento, a glicose foi ligeiramente preferida sobre frutose (Figura 2.4). O consumo da frutose se tornou mais evidente quando a concentração de glicose chegou a $4 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$, ponto onde a concentração de ambos os substratos diminuíram em paralelo. Os parâmetros cinéticos μ_{\max} , μ_S , e $Y_{X/S}$ calculados considerando cada substrato como a fonte de carbono apresentaram valores muito próximos e não foram influenciados pela alteração da temperatura (Tabela 2.2).

A utilização paralela dos dois substratos também foi observado nos resultados apresentados por de Fonseca et al. (2013), ou seja, embora a glicose e frutose façam parte de um sistema comum de baixa afinidade, existe uma elevada afinidade do transportador simporte para a frutose, o que permite a este o consumo da frutose em paralelo com o consumo de glicose. Neste caso, a repressão pela glicose exercida sobre o consumo de frutose é certamente mais fraca do que a repressão pela glicose exercida sobre o consumo de galactose (Item 2.3.2.1).

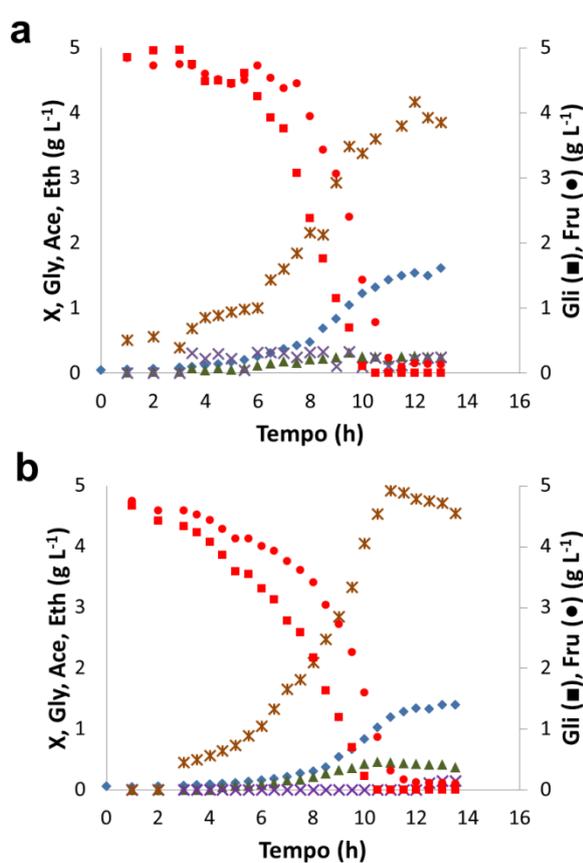


Figura 2.4. Cinética de crescimento, formação de metabólitos e consumo de substratos com culturas de *S. cerevisiae* CAT-1 em uma mistura binária de glicose e frutose ($5 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ de cada substrato). **a** 30°C; **b** 37°C; (♦) X (biomassa, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (■) Gli (glicose, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (●) Fru (frutose, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (▲) Gly (glicerol, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (×) Ace (ácido acético, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$); (✱) Eth (etanol, $\text{g} \times \text{L}^{-1}$).

2.3.2.3 Frutose mais galactose

Nos cultivos Fru+Gal, assim como em Gli+Fru, mais uma vez observou-se apenas uma fase de crescimento. A frutose foi a preferência inicial, até que sua concentração atingiu $3 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$, iniciando, então, um consumo paralelo dos substratos. Os parâmetros cinéticos μ_{\max} , μ_s , e $Y_{X/S}$ de cada substrato sofreram leve alteração com relação à mudança de temperatura (Tabela 2.2).

Assim como mostrado no Item 2.3.2.1, os transportadores de galactose não sofre o efeito inibidor pela presença de frutose. O nível de repressão deste experimento (Fru+Gal) é mais elevado em comparação ao Gli+Fru, pois a galactose necessita de algumas reações metabólicas adicionais, antes de ser encaminhado para a glicólise, diferentemente de glicose e frutose, que são diretamente incorporadas em glicólise (Figura 2.2).

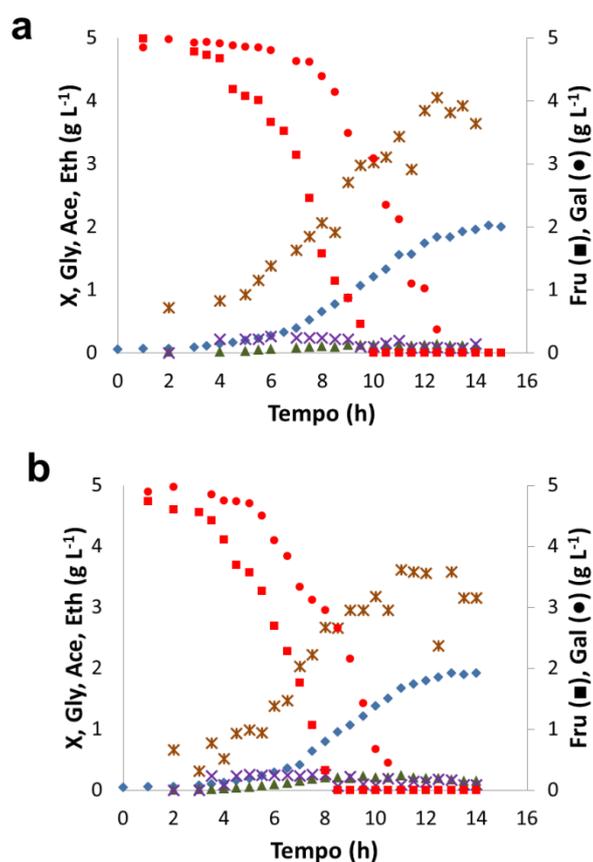


Figura 2.5. Cinética de crescimento, formação de metabólitos e consumo de substratos com culturas de *S. cerevisiae* CAT-1 em uma mistura binária de frutose e galactose ($5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ de cada substrato). **a** 30°C; **b** 37°C; (◆) X (biomassa, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (■) Fru (frutose, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (●) Gal (galactose, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (▲) Gly (glicerol, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (×) Ace (ácido acético, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$); (✕) Eth (etanol, $\text{g}\times\text{L}^{-1}$).

2.4 Conclusão

Este estudo contribuiu para uma melhor compreensão do metabolismo da *S. cerevisiae* CAT-1 frente as fontes de carbono glicose, frutose sacarose, maltose e galactose, em diferentes condições de cultivo. O desempenho da levedura durante o processo mostrou-se dependente da temperatura e da natureza e da combinação de substratos utilizados como fonte de carbono. Nos cultivos com fonte única de carbono a frutose apresentou maior fator de conversão de substrato a etanol que a glicose, juntamente com sacarose e maltose. Nos cultivos em combinações binárias de açúcares foi evidente a repressão metabólica de um substrato sobre o outro, através da ordem de preferência pelos açúcares: 1) glicose, 2) frutose e 3) galactose, o que levou a conclusão de a célula optou por consumir primeiro os substratos com menos reações metabólicas para o catabolismo.

2.5 Referências

- BABRZADEH, F., JALILI, R., WANG, C., SHOKRALLA, S., PIERCE, S., ROBINSON-MOSHER, A., NYREN, P., SHAFER, R.W., BASSO, L.C., AMORIM, H.V., OLIVEIRA, A.J., DAVIS, R.W., RONAGHI, M, GHARIZADEH, B., STAMBUK, B.U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics Genomics**, v. 287, p. 485–494, 2012.
- BASSO, L.C.; de AMORIM, H.V.; de OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. Biofuel Production-Recent Developments and Prospects. **Intech**. p. 85-100, 2011a.
- BASSO, T.O., KOK, S., DARIO, M., ESPÍRITO-SANTO, J.C.A., MULLER, G., SCHLONG, P.S., SILVA, C.P., TONSO, A., DARAN, J., GOMBERT, A.K., MARIS, A.J.A.V., PRONK, J.T., STAMBUK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 694-703, 2011b.
- BATISTOTE, M., CARDOSO, C.A.L.; RAMOS, D.D., ERNANDES, J. R. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar. **Ciência e Natura**, UFSM, v. 32, p. 83-95, 2010.
- DELLA-BIANCA, B.E.; BASSO, T.O.; STAMBUK, B.U.; BASSO, L.C.; GOMBERT, A.K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian

fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 979–991, 2013.

DELLA-BIANCA, B.E., GOMBERT, A.K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 1083–1095, 2013.

DUARTE, W.F., DRAGONE, G., DIAS, D.R., OLIVEIRA, J.M., TEIXEIRA, J.A., SILVA, J.B.A., SCHWAN, R.F. Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 173–182, 2010.

DUVAL, E.H.; ALVES Jr, S.L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G.; STAMBUK, B.U. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 248–259, 2010.

FLORES, C.L., RODRIGUEZ, C., PETIT, T., GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 507-529, 2000.

FONSECA, G.G., CARVALHO, N.M.B., GOMBERT, A.K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 5055–5067, 2013.

GANATSIOS, V., KOUTINAS, A.A., BEKATOROUA, A., KANELLAKI, M., NIGAMB, P. Promotion of maltose fermentation at extremely low temperatures using a cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain immobilized on porous cellulosic material. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 66, p. 56–59, 2014.

MA, H; BOTSTEIN, D. Effects of Null Mutations in the Hexokinase Genes of *Saccharomyces cerevisiae* on Catabolite Repression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, p. 4046-4052, 1986.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, M.E.S., PANTOJA, L., DUARTE, L.W.F., COLLELA, C.F., VALARELLI, L.T., SCHWAN, R.F., DIAS, D.R. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International**, v. 44, p. 2391–2400, 2011.

ORLOWSKI, J.H., BARFORD, J.P. Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 37, p. 215-218, 1991.

REIFENBERGER, E., BOLES, E., CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, p. 324-333, 1997.

SANTOS, E.F.S., SCHAUTZ, L.C.A., CARDOSO, C.A.L., ERNANDES, J.R., BATISTOTE, M. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. **Ciência e Natura**, v. 2, p. 009-014, 2013.

STAMBUK, B.U., BATISTA, A.S., ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 2, p. 212-214, 2000.

VERDUYN, C., POSTMA, E., SCHEFFERS, W.A., VAN DIJKEN, J.P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration an alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, p. 501-517, 1992.

WANG, Z., ZHUGE, J., FANG, H., PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201-223, 2001.

3 CRESCIMENTO DE *Burkholderia sacchari* LFM 101 COM SUBSTRATOS SACAROSE, GLICOSE E GLICEROL EM DIFERENTES TEMPERATURAS

RESUMO: Polihidroxicanoatos (PHAs) têm atraído grande interesse industrial como alternativa aos plásticos convencionais. A temperatura é uma condição importante em bioprocessos, sua alteração nos cultivos resulta em diferentes respostas do microrganismo. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de três diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol) em *Burkholderia sacchari* LFM 101, o seu crescimento e produção de PHA a 30 ou 35°C. Os resultados mostraram que *Burkholderia sacchari* cultivada com glicose a 35°C apresentou tanto uma maior produtividade ($0,054 \text{ g} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) quanto rendimento de polímero em massa celular seca (41%). Entre os ensaios com sacarose e glicose, não foram observadas diferenças entre os limites de velocidade para o crescimento (μ_{max}), mas a mudança na temperatura influenciou o rendimento e o acúmulo de PHA. O cultivo com glicerol como a única fonte de carbono não foi expressivo pela necessidade de energia específica para a quebra da molécula.

Palavras-Chave: Metabolismo; Cinética; Polihidroxicanoatos (PHAs)

3.1 Introdução

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros que podem ser acumulados sob a forma de inclusões citoplasmáticas por várias bactérias. As aplicações potenciais dos PHAs são variadas devido à diversidade de combinações monoméricas possíveis (MENDONÇA et al., 2013; RODRIGUEZ-CONTRERAS et al., 2015). Polihidroxibutirato (P3HB) é um dos representantes mais estudados da família de PHAs. Ele atraiu a atenção devido à sua biodegradabilidade, sustentabilidade, durabilidade e plasticidade. As suas propriedades são semelhantes aos do polipropileno (MOUSAVIAN et al., 2013).

Burkholderia sacchari foi relatada como uma bactéria Gram-negativa, com grande potencial para a produção industrial de bioplásticos (SILVA et al., 2000;. SQUIO; ARAGÃO, 2004). A linhagem *B. sacchari* LFM 101 foi isolada a

partir do solo de canavial brasileiro (BRAMER et al., 2001). A síntese de PHAs normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente, como nitrogênio, fósforo ou oxigênio, essencial à multiplicação das bactérias (SINGH; PARMAR, 2011). Uma vez que o polímero é produzido na forma de reserva energética, quando exaurida as fontes disponíveis, a bactéria passa consumir esse polímero para sua sobrevivência. Portanto, é de extrema importância o conhecimento do perfil fisiológico desempenhado por ela, visando incrementar a produção do polímero.

O custo de produção de PHA é altamente dependente do preço do substrato (LOPES et al., 2014). Como consequência, os PHAs são substancialmente mais caros que os plásticos sintéticos. A sacarose da cana de açúcar é uma alternativa de substrato de baixo custo, pois ainda é a fonte de carbono mais barata e a integração da produção de PHA a partir de sacarose em usinas de etanol pode constituir um ciclo verde para a produção de bioplástico (NONATO et al., 2000). Da mesma forma, o uso de glicerol residual, proveniente da produção de biodiesel, poderia fomentar a produção de PHA de baixo custo (SQUIO; ARAGÃO, 2004; ZHU et al., 2010).

Na literatura há trabalhos com *B. sacchari* e produção de PHA a partir de diferentes substratos, mas, na maior parte, as células são cultivadas a 30°C (SILVA et al., 2000; MENDONÇA et al., 2013; LOPES et al., 2014). A temperatura é uma condição importante em bioprocessos. Fonseca et al. (2013) mostraram que a alteração apenas da temperatura dos cultivos, resulta em diferentes respostas fisiológicas do microrganismo. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de três diferentes fontes de carbono em *Burkholderia sacchari* LFM 101, o seu crescimento e produção de PHA a 30 ou 35°C.

3.2 Metodologia

3.2.1 Microrganismo e preservação

Utilizou-se *Burkholderia sacchari* LFM 101, disponibilizada pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da

Universidade de São Paulo. As células foram reativadas pelo cultivo em frascos Erlenmeyer de 125 mL agitados com 50 mL de caldo nutriente ($3 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ de extrato de carne; $5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ de peptona) (24 horas, 30°C , 200 rpm) e mantidas por criopreservação pela adição de quantidades iguais de meio e solução de glicerol 20% resultando em uma solução final de 10% glicerol $\text{v}\times\text{v}^{-1}$. Esta solução contendo as células, foi distribuída em microtubos esterilizados de 2 mL. Na sequência os microtubos foram mantidos em congelador (-18°C , 40 min.) antes de serem armazenados em ultrafreezer à -80°C .

Pré-inóculos foram preparados através da transferência de uma alçada do microtubo do estoque congelado para uma placa de Petri contendo ágar caldo nutriente (48 horas, 30°C). Foi transferida uma colônia da placa para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio mineral (como descrito abaixo) adicionado de cada fonte de carbono. Após 16-18 h de crescimento num agitador orbital (250 rpm) a 30 ou 35°C (dependendo da temperatura do cultivo subsequente, o qual foi a mesma), uma alíquota (calculada $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,1$) foi utilizada como inóculo para o cultivo principal no mesmo meio sintético, como descrito abaixo.

3.2.2 Meio de cultivo

Para os cultivos foi utilizado meio mineral, quimicamente definido, sendo os componentes (1 L de água destilada): KH_2PO_4 , 6,67 g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 4 g; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,8 g; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,8 g; tiamina, 0,01 g e solução de elementos traço, 0,5 mL. A composição da solução de elementos traço é (em 1 L de 5 M HCl): $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g; CaCl_2 , 2 g; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,2 g; $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g (LEE; CHOI, 2001). Todos os componentes do meio, com exceção da fonte de carbono e tiamina, foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. A solução contendo a fonte de carbono (glicose, sacarose ou glicerol, $10 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$) foi autoclavada separadamente e a tiamina esterilizada por filtração, sendo todos os componentes misturados após atingida a temperatura ambiente.

3.2.3 Cultivos em incubador rotativo

Os cultivos foram realizados em triplicata em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL, com 250 mL de volume de trabalho, e iniciada na concentração inicial de células no frasco de 0,1 unidades de absorvância a 600 nm (DO_{600nm}). Condições de cultivo foram de 30 ou 35°C, o pH inicial de 6,0, em um agitador orbital a 250 rpm.

As amostras foram realizadas a cada 1 hora (retirando-se no máximo 4 mL) e colocadas em um banho de gelo; 2 mL foram usados para medição de DO_{600nm} , após diluição adequada (quando necessário). Os 2 mL restantes foram centrifugados (17.609 xg, 5 min., 5°C). O sobrenadante foi congelado a -80°C e depois utilizado para a determinação da concentração dos açúcares e de metabólitos extracelulares. O sedimento foi utilizado para determinar a concentração de biomassa, por diferença de massa, em termos de gramas de peso seco de biomassa por volume centrifugado. O pH foi obtido por meio de medições potenciométricas.

3.2.4 Determinação da biomassa

O sedimento de biomassa obtida após centrifugação da amostra foi seco em estufa (105°C) até peso constante. A massa celular seca ($g \times L^{-1}$) foi obtido pelo quociente entre a diferença de peso por volume de meio centrifugado. Concentração Biomassa (X) também foi determinada indiretamente através de medições de DO_{600nm} realizadas com um espectrofotômetro a 600 nm. Para este fim, os valores de absorvância medidos foram convertidos em valores de massa utilizando uma relação linear (DO_{600nm} unidades por grama de massa de célula seca) determinada para cada experimento.

3.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

A fase de crescimento exponencial (FCE) foi identificada como a região linear da plotagem do $\ln(DO_{600nm})$ em função do tempo para os dados do cultivo. A velocidade específica de crescimento máximo (μ_{max}) foi determinada como a inclinação desta reta. O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi determinado como a inclinação da linha obtida pela plotagem da

concentração celular (X) em função da concentração de substrato (S). A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) foi calculada pelo quociente entre μ_{\max} por $Y_{X/S}$. A concentração máxima de biomassa (X_{\max}) foi indicada pela concentração máxima de massa celular seca ou DO_{600nm} observada em cada experimento. A biomassa remanescente $X(R)$ foi obtida por diferença a partir da biomassa total e de polímero acumulado.

3.2.6 Extração do polímero

Ao atingir a fase estacionária, os cultivos foram interrompidos, centrifugados (202,9 xg, 40 min.), e o sedimento celular foi seco em estufa (40°C, 24 h). A extração foi efetuada utilizando um extrator Soxhlet com clorofórmio como solvente, mantendo o fluxo por 12 horas. Em seguida, a solução foi concentrada e o polímero precipitado com etanol a 95%.

3.2.7 Determinações da concentração de metabólitos extracelulares

Glicose, sacarose, glicerol, etanol e os ácidos orgânicos foram determinados por UPLC Agilent 1290, equipado com coluna Rezex ROA – Organic Acid H⁺ (8%) (Phenomenex). A corrida foi realizada de forma isocrática com fase móvel ácido trifluoroacético (TFA) a 0,005 M, a uma vazão de 0,6 mLxmin⁻¹, com temperatura de 55°C e o volume injetado foi de 20 μ L. Estes compostos foram detectados por um detector refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados (adaptado de FONSECA et al., 2013).

3.2.8 Determinações de PHA por cromatografia gasosa

A composição de PHA foi determinada através de cromatografia gasosa de propil-ésteres, conforme descrito por Mendonça et al. (2013). Um volume de 1 μ L da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (*split* 1:25) em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metil-siloxane, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μ m). A análise foi conduzida nas seguintes condições: gás de arraste utilizado foi o hélio (0,8 mLxmin⁻¹); temperatura do injetador de

250°C, e a temperatura do detector de 300°C; o sistema de detecção por ionização de chama (FID) e forno programado a 100°C por um minuto, com elevação da temperatura até 185°C a 8°C×min⁻¹ e 185°C por 15 minutos. Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno.

3.2.9 Análise estatística

O programa Statistica[®] 8.0 (Stat Soft, USA) foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para determinar diferenças entre as variáveis temperatura e substrato, no intervalo de 95% de confiança.

3.3 Resultados e discussão

A Tabela 3.1 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos experimentos com a glicose, sacarose e glicerol como únicas fontes de carbono, a 30°C e 35°C (glicerol apenas a 30°C, uma vez que não houve crescimento expressivo nas condições oferecidas).

Comparando as velocidades máximas de crescimento específico (μ_{\max}), para os valores obtidos com glicose e sacarose, observou-se que não houve nenhuma diferença significativa entre eles (média de 0,539 h⁻¹). A diferença aparece apenas com relação ao glicerol, cuja μ_{\max} foi 0,408 h⁻¹. Os valores μ_{\max} foram maiores (exceto para glicerol) do que foi previamente reportado para *Burkholderia sacchari* IPT 101 com a glicose como substrato ($\mu_{\max} = 0,45$ h⁻¹) (GOMEZ et al., 1996).

No entanto, a maior produtividade de PHA (0,054 g×L⁻¹×h⁻¹) foi observada com glicose a 35°C. Os experimentos com glicose e sacarose atingiram a fase estacionária após cerca de 19,5 h, mas com glicerol foi alcançado depois de apenas 6 horas.

A literatura mostra que *Burkholderia* sp. foi capaz de crescer entre 25 e 37°C, com uma temperatura ótima entre 28 a 30°C (LOPES et al., 2014). Neste estudo, observou-se que 35°C foi a temperatura mais favorável para os parâmetros máximos X_{\max} e P_x para a estirpe *Burkholderia sacchari*.

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos dos cultivos com *Burkholderia sacchari* LFM 101, a partir de glicose, sacarose e glicerol nas temperaturas de 30°C e 35°C.

S ₀	T (°C)	FC	μ_{\max} (h ⁻¹)	X _{max} (g×L ⁻¹)	TD (h)	P _X (g×L ⁻¹ ×h ⁻¹)	P _{PHA} (g×L ⁻¹ ×h ⁻¹)	μ_s (h ⁻¹)	Y _{X/S} (g _{MSC} ×g ⁻¹)	PHA (% MSC)	3HB (mol%)	3HB (g×L ⁻¹)	X (R) (g×L ⁻¹)
Gli	30	0,2	0,526 ^a ±0,007	1,874 ^b ±0,004	1,397 ^b ±0,129	0,103 ^b ±0,005	0,041 ^b ±0,002	2,701 ^a ±0,089	0,194 ^c ±0,003	39,58 ^a ±1,266	100	0,742	1,132
	35	0,2	0,539 ^a ±0,036	2,878 ^a ±0,001	1,288 ^b ±0,086	0,130 ^a ±0,005	0,054 ^a ±0,002	1,780 ^b ±0,019	0,303 ^a ±0,013	41,20 ^a ±0,898	100	1,186	1,692
Sac	30	0,2	0,544 ^a ±0,005	1,892 ^b ±0,116	1,274 ^b ±0,012	0,104 ^b ±0,006	0,027 ^c ±0,001	2,614 ^a ±0,131	0,208 ^{bc} ±0,008	25,93 ^b ±2,496	100	0,490	1,401
	35	0,2	0,546 ^a ±0,003	2,654 ^a ±0,076	1,269 ^b ±0,007	0,131 ^a ±0,004	0,044 ^b ±0,001	1,957 ^b ±0,197	0,281 ^{ab} ±0,037	33,12 ^{ab} ±5,989	100	0,879	1,775
Gn	30	0,5	0,408 ^b ±0,010	0,457 ^c ±0,026	1,698 ^a ±0,041	0,041 ^c ±0,003	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Gli: glicose; Sac: sacarose; Gn: glicerol; T: temperatura; S₀: substrato; TD: tempo de duplicação; μ_{\max} : velocidade específica de crescimento máxima; X_{max}: concentração máxima de biomassa; % MSC: porcentagem de polímero em massa seca celular; μ_s : velocidade de consumo de substrato; Y_{X/S}: taxa de conversão de substrato em células; 3HB: 3-hidroxibutirato; FC: fator de conversão de densidade óptica para gramas por litro; ND: não determinado; letras iguais em uma mesma coluna não apresenta diferença significativa (p>0,05).

O rendimento em polímero mais elevado foi obtido com glicose a 35°C (41%), um valor maior do que os resultados obtidos por Mendonça et al. (2013) com a mesma estirpe após 24 horas de cultivo (32% de PHA no seu peso seco de células), utilizando glicose ($10 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$) como fonte de carbono. Notou-se também que, até 24 horas de cultivo, as bactérias utilizaram as fontes de carbono e de nitrogênio para o crescimento, e que, após 24 horas, quando o nitrogênio foi todo consumido, o excesso de carbono presente foi usado para o acúmulo de PHA.

Neste trabalho, os cultivos foram interrompidos no início da fase estacionária de crescimento, porque este coincide com o esgotamento da fonte de carbono, não havendo mais carbono em excesso para o acúmulo do polímero (Figura 3.1).

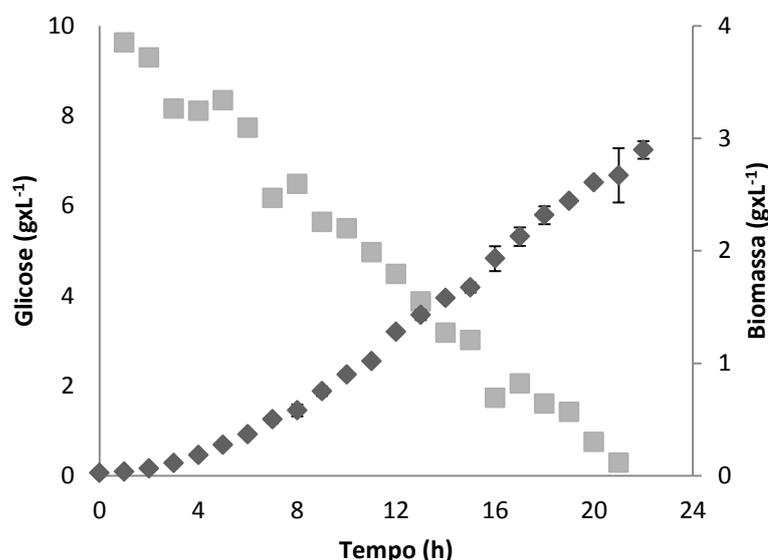


Figura 3.1. Cinética de crescimento de *Burkholderia sacchari* LFM 101 com glicose à 35°C. (■) Consumo de glicose; (◆) Crescimento celular.

Observou-se que a produtividade de PHA em sacarose a 35°C foi equivalente à obtida em glicose a 30°C (Tabela 3.1). Conforme relatado por Squio e Aragão (2004), *Burkholderia sacchari* tem um grande potencial para a produção industrial, principalmente pela capacidade de consumir sacarose. Este potencial foi confirmado por Gomez et al. (1996) em seu estudo onde *Burkholderia sacchari* IPT 101 (= LFM 101) foi capaz de acumular 75% do seu peso seco em P3HB a partir de glicose mais frutose e 69% a partir de

sacarose, com uma eficiência superior a 80% do rendimento máximo teórico, em cultivos de 48 horas. Assim, pode-se considerar que, embora sacarose tenha apresentado um rendimento ligeiramente menor do que em glicose, a sacarose é ainda uma fonte de carbono muito atrativa para a produção de polímeros.

O tipo de polímero sintetizado pela bactéria depende do substrato utilizado, pois este define qual via metabólica fará uso para a produção. Aqui para os substratos sacarose e glicose, P3HB foi o único monômero de PHA acumulado por *Burkholderia sacchari* LFM 101. Quanto a outros produtos, não houve produção expressiva ($> 0,1 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$) de nenhum dos metabólitos avaliados.

Os parâmetros relativos ao consumo de substrato não foram calculados para o substrato glicerol. Considerou-se inviável continuar com a análise, uma vez que não houve consumo expressivo do mesmo pela bactéria e a concentração máxima celular (X_{max}) obtida foi extremamente baixa ($0,46 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$) (Tabela 3.1). Trabalhos anteriores, utilizando meio sintético com glicerol como a única fonte de carbono, também não obtiveram o crescimento celular em cultivos de levedura, mesmo quando utilizada estirpes que eram capazes de consumir glicerol. No entanto, o crescimento foi observado quando adicionado extrato de levedura para o meio de cultivo, onde se considerou que compostos vestigiais, contidos no extrato de levedura, seriam essenciais para uma assimilação efetiva do glicerol pelas leveduras (RIVALDI et al., 2012).

Quando o glicerol é utilizado como única fonte de carbono, é inicialmente metabolizado em di-hidroxiacetona fosfato (Figura 3.2). Para isso, existem dois caminhos possíveis: um de desidrogenação e outro de fosforilação. O primeiro é NAD^+ e ATP dependente, o segundo é ATP e FAD dependente (RIVALDI et al., 2012). Em seguida, a di-hidroxiacetona fosfato é direcionada para a produção de energia e/ou biossíntese de PHA. A assimilação de glicerol é dependente de receptores de elétrons externos. A fonte de carbono deve assegurar o equilíbrio redox global dentro da célula. Portanto, a escolha da fonte de carbono é determinante para a obtenção de rendimentos de produto satisfatória (CLOMBURG; GONZALEZ, 2013).

Assim, no ensaio conduzido com *Burkholderia sacchari* LFM 101 com glicerol como a única fonte de carbono, não houve crescimento expressivo pela falta de energia (NAD^+ ; FAD; ATP) para quebrar a molécula de glicerol. A pequena produção de biomassa é, provavelmente, devido ao consumo de outros nutrientes presentes no meio mineral, por exemplo, o ácido cítrico.

Foi publicado em outro estudo um rendimento de 10% de PHA para *Burkholderia sacchari* em glicerol (RODRIGUEZ-CONTRERAS et al., 2015). No entanto, a glicose foi utilizada nas fases iniciais do cultivo, e o glicerol como única fonte de carbono apenas na fase de acúmulo de PHA. Assim, pode considerar-se que é possível produzir polímeros e células a partir de glicerol se os cultivos forem suplementados com outro substrato que garanta a energia necessária para quebrar as moléculas de glicerol, porém maiores estudos devem ser realizados devido a crescente oferta deste substrato e o valor agregado desta produção de PHA.

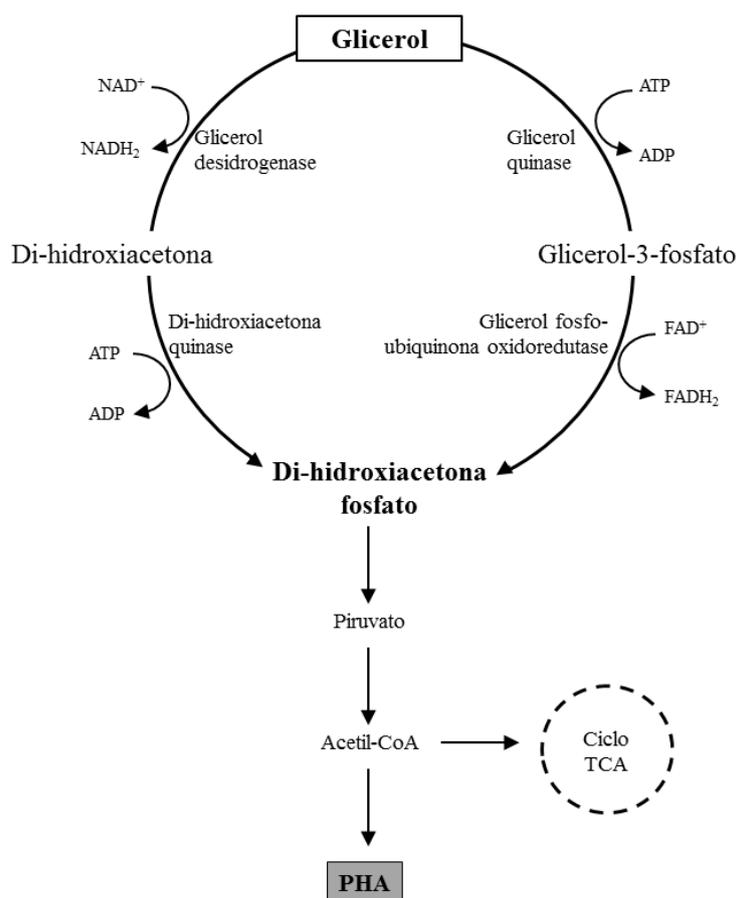


Figura 3.2. As vias metabólicas para a assimilação de glicerol por microorganismos e formação de PHA (adaptado a partir de RIVALDI et al., 2012).

3.4 Conclusão

Verificou-se que a *Burkholderia sacchari* LFM 101 apresentou os melhores resultados em cultivos contendo glicose a 35°C. Embora a produtividade mais elevada foi observada com a glicose, a sacarose revelou um grande potencial para o acúmulo de polímero pela bactéria sob temperaturas mais elevadas. A temperatura não influenciou a velocidade de crescimento específica máxima (μ_{\max}), mantendo-se em torno de 0,54 h⁻¹, para os substratos glicose e sacarose, mas a temperatura de 35°C para *B. sacchari* mostrou um maior acúmulo de polímero, confirmando que o ajuste de temperatura em produção de biopolímero por *B. sacchari* pode otimizar o processo. As condições de crescimento analisados não eram favoráveis para o consumo de glicerol, provavelmente por causa da limitação no fornecimento de energia a partir de glicerol.

3.5 Referências

- BRÄMER, C.O.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; VANDAMME, P.; STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1709-1713, 2001.
- CLOMBURG, J.M.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, p. 20-28, 2013.
- FONSECA, G.G.; CARVALHO, N.M.B.; GOMBERT, A.K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 5055-5067, 2013.
- FONSECA, G.G.; GOMBERT, A.K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 422-435, 2007.
- GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 785-791, 1996.
- LEE, S.Y.; CHOI, J.L. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 71, p. 183-207, 2001.

LOPES, M.S.G.; GOMEZ, J.G.C.; TACIRO, M.K.; MENDONÇA, T.T.; SILVA, L.F. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous removal of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 1353-1363, 2014.

MENDONÇA, T.T.; GOMEZ, J.G.C.; BUFFONI, E.; SANCHEZ RODRIGUEZ, R.J.; SCHRIPSEMA, J.; LOPES, M.S.G.; SILVA, L.F. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v.116, p. 815-829, 2013.

MOUSAVIOUN, P.; HALLEY, P.J.; DOHERTY, W.O.S. Thermophysical properties and rheology of PHB/lignin blends. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 270-275, 2013.

NONATO, R.V.; MANTELATTO, P.E.; ROSSELL, C.E.V.. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology**, v. 57, p. 1-5, 2001.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; BRANCO, R.F.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Biotechnological utilization of biodiesel-derived glycerol for the production of ribonucleotides and microbial biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.167, p. 2054-2067, 2012.

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A.; KOLLER, M.; DIAS, M.M.S.; CALAFELL-MONFORTE, M.; BRAUNEGG, G.; MARQUÉS-CALVO, M.S. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 50-57, 2015.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; TORRES, B.B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 165-174, 2000.

SINGH, P.; PARMAR, N. Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 4907-4919, 2011.

SQUIO, C.R.; ARAGÃO, G.M.F. Cultivation strategies for production of the biodegradable plastics poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacteria. **Química Nova**, v. 27, p. 615-622, 2004.

ZHU, C.; NOMURA, C.T.; PERROTTA, J.A.; STIPANOVIC, A.J.; NAKAS, J.P. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. **Biotechnology Progress**, v. 26, p. 424-430, 2010.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Através da avaliação fisiológica da *S. cerevisiae* CAT-1 e da *B. sacchari* LFM 101 pode-se confirmar que a temperatura apresentou grande influência nos processos biotecnológicos, principalmente no crescimento celular e na formação de produtos.

Quanto a *S. cerevisiae* CAT-1, percebeu-se alto potencial de utilização da maltose, que juntamente com sacarose e frutose, apresentou resultados em produção de etanol melhores do que os obtidos com glicose. Este estudo ainda permitiu observar que o microrganismo dá preferência à utilização de substratos que exigem menos reações metabólicas e, conseqüentemente, menos gasto de energia.

Burkholderia sacchari LFM 101 revelou um grande potencial para o acúmulo de polímero a 35°C utilizando-se sacarose como substrato. As condições de crescimento analisadas não foram favoráveis para o consumo de glicerol, provavelmente por causa da limitação no fornecimento de energia a partir de glicerol.

5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

5.1 Artigo completo publicado em anais de congressos

NASCIMENTO, V. M.; FONSECA, G. G. Avaliação fisiológica do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em diferentes fontes de carbono à 30 e 37°C. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2015, Fortaleza. Anais do XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2015. p. 1-6.

5.2 Resumos expandidos publicados em anais de congressos

NASCIMENTO, V. M.; ANDRADE, C. S. ; FONSECA, G. G. Avaliação do crescimento de *Burkholderia sacchari* (LFM 101) com os substratos sacarose e glicose em diferentes temperaturas. In: IV Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 2015, Rio de Janeiro. Anais do IV Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 2015. p. 1-4.

NASCIMENTO, V. M.; ANDRADE, C. S.; FONSECA, G. G. Efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos com *Burkholderia sacchari* LFM 101 e *Ralstonia eutropha* LFM 026. In: IV Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 2015, Rio de Janeiro. Anais do IV Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 2015. p. 1-4.

5.3 Artigo aceito para publicação

NASCIMENTO, V. M.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; FONSECA, G. G. Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. **Scientia Agricola** (USP, Impresso), 2016.

APÊNDICES

Apêndice 1 Dados experimentais referentes às cinéticas de crescimento com *S. cerevisiae* CAT-1 em fonte única de carbono.

Glicose / 30°C

Tempo (h)	X (gxL ⁻¹)	Gli (gxL ⁻¹)	Eth (gxL ⁻¹)	Gly (gxL ⁻¹)	Ace (gxL ⁻¹)
1,0	0,055	9,470	0,174	0,036	0,000
2,0	0,076	9,381	0,347	0,046	0,000
3,0	0,116	9,188	0,443	0,065	0,000
3,5	0,132	9,035	0,447	0,072	0,000
4,0	0,165	6,460	0,461	0,065	0,000
4,5	0,207	8,523	0,649	0,219	0,352
5,0	0,257	8,108	0,774	0,138	0,391
5,5	0,320	5,664	0,745	0,132	0,384
6,0	0,386	7,281	1,157	0,228	0,414
6,5	0,468	6,530	1,465	0,284	0,412
7,0	0,543	3,959	1,415	0,247	0,067
7,5	0,773	2,719	1,441	0,251	0,066
8,0	1,056	3,121	2,900	0,619	0,629
8,5	1,302	1,725	3,555	0,683	0,600
9,0	1,509	0,309	2,656	0,413	0,097
9,5	1,551	0,051	2,600	0,419	0,103
10,0	1,649	0,122	3,955	0,650	0,179
10,5	1,700	0,122	3,910	0,625	0,182
11,0	1,688	0,122	3,912	0,588	0,178

Glicose / 37°C

Tempo (h)	X (gxL ⁻¹)	Gli (gxL ⁻¹)	Eth (gxL ⁻¹)	Gly (gxL ⁻¹)	Ace (gxL ⁻¹)
1,0	0,055	9,311	0,316	0,066	0,000
2,0	0,087	9,253	0,375	0,089	0,000
3,0	0,139	8,777	0,524	0,144	0,000
3,5	0,187	7,312	0,641	0,174	0,000
4,0	0,240	7,921	0,855	0,264	0,376
4,5	0,306	4,026	0,731	0,204	0,026
5,0	0,376	4,032	0,982	0,316	0,379
5,5	0,467	2,903	1,146	0,349	0,369
6,0	0,780	3,808	2,586	0,937	0,578
6,5	0,965	2,034	3,223	1,015	0,090
7,0	1,195	0,103	2,425	0,726	0,576
7,5	1,270	0,115	4,082	1,244	0,121
8,0	1,300	0,064	2,364	0,779	0,457
8,5	1,325	0,111	3,874	1,213	0,152
9,0	1,330	0,106	3,689	1,141	0,151
9,5	1,295	0,109	3,700	1,140	0,165

Frutose / 30°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Fru (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,048	9,178	0,156	0,450	0,000
2,0	0,063	9,018	0,147	0,453	0,000
3,0	0,094	8,954	0,263	0,063	0,000
3,5	0,108	8,479	0,302	0,069	0,000
4,0	0,136				
4,5	0,172	8,337	0,431	0,098	0,328
5,0	0,209	8,164	0,622	0,114	0,372
5,5	0,254	7,715	0,661	0,142	0,057
6,0	0,314	7,459	0,833	0,177	0,377
6,5	0,381	6,911	1,016	0,216	0,386
7,0	0,448	5,394	1,260	0,232	0,373
7,5	0,640	5,226	1,610	0,320	0,375
8,0	0,928	4,140	2,203	0,418	0,394
8,5	1,050	3,119	2,649	0,578	0,496
9,0	1,230	1,767	3,236	0,665	0,406
9,5	1,408	0,659	3,572	0,656	0,162
10,0	1,535	0,279	3,613	0,631	0,164
10,5	1,553	0,174	3,740	0,658	0,168
11,0	1,583	0,149	3,703	0,628	0,161
11,5	1,635	0,144	3,701	0,601	0,148

Frutose / 37°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Fru (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,055	9,084	0,321	0,120	0,000
2,0	0,076	9,009	0,383	0,116	0,000
3,0	0,120	8,624	0,334	0,175	0,000
3,5	0,158	8,444	0,434	0,218	0,000
4,0	0,202	8,107	0,719	0,261	0,000
4,5	0,257	7,674	0,878	0,330	0,307
5,0	0,321	7,017	0,971	0,340	0,327
5,5	0,394	6,236	1,282	0,458	0,319
6,0	0,484	5,126	1,746	0,657	0,413
6,5	0,780	3,695	2,154	0,826	0,432
7,0	1,043	1,972	3,163	1,091	0,478
7,5	1,265	0,751	3,658	1,201	0,476
8,0	1,408	0,294	3,747	1,193	0,360
8,5	1,490	0,184	3,705	1,169	0,145
9,0	1,463	0,160	3,734	1,136	0,136
9,5	1,450	0,154	3,812	1,099	0,149

Sacarose / 30°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Sac (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,052	9,577	0,136	0,000	0,000
2,0	0,068	9,243	0,134	0,000	0,000
3,0	0,091	8,025	0,207	0,000	0,000
3,5	0,110		0,265	0,000	0,000
4,0	0,137	8,739	0,286	0,000	0,000
4,5	0,177	8,582	0,629	0,000	0,000
5,0	0,212	8,302	0,576	0,053	0,000
5,5	0,266	7,783	0,622	0,060	0,000
6,0	0,319	7,274	0,853	0,082	0,000
6,5	0,380	6,553	1,213	0,112	0,000
7,0	0,580	5,503	1,544	0,172	0,111
7,5	0,764	2,307	1,876	0,229	0,165
8,0	0,862	1,707	2,371	0,293	0,124
8,5	1,067	0,973	2,855	0,354	0,146
9,0	1,253	1,970	3,577	0,508	0,284
9,5	1,448	0,275	3,812	0,529	0,258
10,0	1,471	0,144	3,899	0,542	0,251
10,5	1,511	0,122	3,711	0,524	0,239
11,0	1,589	0,129	3,875	0,502	0,179
11,5	1,567	0,100	3,759	0,471	0,182
12,0	1,509	0,023	3,500	0,399	0,143

Sacarose / 37°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Sac (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,056	9,853	0,000	0,000	0,000
2,0	0,071		0,000	0,000	0,000
3,0	0,108	9,050	0,227	0,000	0,000
3,5	0,136		0,286	0,000	0,000
4,0	0,174	8,455	0,385	0,000	0,000
4,5	0,227	7,893	0,462	0,000	0,000
5,0	0,283	7,481	0,606	0,000	0,000
5,5	0,363	6,819	0,828	0,000	0,000
6,0	0,455	7,170	1,422	0,000	0,000
6,5	0,545	5,195	1,588	0,173	0,000
7,0	0,943	4,286	2,150	0,347	0,000
7,5	1,146	1,861	1,871	0,525	0,000
8,0	1,431	0,841	2,499	0,796	0,000
8,5	1,630	0,967	3,766	1,204	0,000
9,0	1,667	0,341	3,110	0,596	0,000
9,5	1,696	0,597	3,645	0,715	0,000
10,0	1,747	0,788	3,543	0,701	0,000

Maltose / 30°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Mal (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,057	9,871	0,123	0,000	0,000
2,0	0,071	9,787	0,146	0,000	0,000
3,0	0,108	9,505	0,188	0,000	0,000
3,5	0,125	9,479	0,236	0,000	0,000
4,0	0,153	9,402	0,375	0,000	0,000
4,5	0,176	9,179	0,307	0,000	0,000
5,0	0,221	8,983	0,529	0,000	0,000
5,5	0,269	8,626	0,507	0,000	0,000
6,0	0,305	8,394	0,644	0,000	0,000
6,5	0,373	7,891	0,937	0,052	0,000
7,0	0,416	7,353	1,124	0,058	0,000
7,5	0,471	6,735	1,387	0,070	0,000
8,0	0,727	5,857	1,693	0,081	0,000
8,5	0,893	4,801	2,089	0,100	0,000
9,0	1,030	3,570	2,574	0,151	0,052
9,5	1,173	2,216	3,057	0,185	0,053
10,0	1,349	0,723	3,521	0,236	0,106
10,5	1,418	0,469	3,509	0,191	0,058
11,0	1,415	0,086	3,513	0,247	0,115
11,5	1,459	0,011	3,387	0,214	0,096

Maltose / 37°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Mal (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,054	9,533	0,202	0,000	0,000
2,0	0,063	9,482	0,205	0,000	0,000
3,0	0,081	9,604	0,220	0,000	0,000
3,5	0,104	9,459	0,267	0,000	0,000
4,0	0,124	9,120	0,321	0,000	0,000
4,5	0,146	9,021	0,389	0,000	0,000
5,0	0,187	8,768	0,448	0,000	0,000
5,5	0,233	8,516	0,585	0,000	0,000
6,0	0,288	7,483	0,685	0,000	0,000
6,5	0,359	7,514	1,008	0,050	0,000
7,0	0,419	4,367	0,882		0,000
7,5	0,490	6,088	1,626	0,091	0,000
8,0	0,748	5,020	2,126	0,132	0,000
8,5	0,953	3,666	2,773	0,189	0,000
9,0	1,103	1,966	3,495	0,242	0,000
9,5	1,260	0,512	3,687	0,308	0,121
10,0	1,308	0,604	3,901	0,327	0,123
10,5	1,290	0,528	3,672	0,319	0,118
11,0	1,315	0,048	2,257	0,138	0,000

Galactose / 30°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Gal (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,071	9,743	0,000	0,000	0,000
2,0	0,073	9,614	0,094	0,000	0,000
3,0	0,104	9,235	0,113	0,000	0,000
3,5	0,121	9,491	0,136	0,000	0,000
4,0	0,140	9,125	0,177	0,000	0,000
4,5	0,165	9,093	0,196	0,000	0,000
5,0	0,189	9,034	0,202	0,000	0,000
5,5	0,212	8,913	0,247	0,000	0,000
6,0	0,242	8,743	0,253	0,000	0,000
6,5	0,278	8,664	0,305	0,000	0,000
7,0	0,303	8,319	0,309	0,000	0,000
7,5	0,334	8,194	0,367	0,000	0,000
8,0	0,377	8,038	0,379	0,000	0,000
8,5	0,408	7,195	0,557	0,049	0,000
9,0	0,447	7,298	0,576	0,066	0,119
9,5	0,654	6,978	0,803	0,084	0,108
10,0	0,728	6,421	0,939	0,095	0,104
10,5	0,865	5,881	0,981	0,113	0,065
11,0	1,027	5,250	1,405	0,133	0,085
11,5	1,122	4,557	1,599	0,147	0,106
12,0	1,355	3,799	1,946	0,162	0,055
12,5	1,475	2,944	2,280	0,197	0,083
13,0	1,664	2,049	2,640	0,234	0,088
13,5	1,764	0,969	3,035	0,287	0,133
14,0	1,882	0,080	3,328	0,312	0,097
14,5	1,970	0,016	3,329	0,327	0,126
15,0	1,994	0,014	3,243	0,298	0,088
15,5	2,034	0,015	3,054	0,188	0,000
16,0	2,043	0,168	3,175	0,164	0,000

Galactose / 37°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Gal (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,061	9,508	0,000	0,000	0,000
2,0	0,073	9,629	0,000	0,000	0,000
3,0	0,098	9,692	0,167	0,000	0,000
3,5	0,115	9,489	0,188	0,000	0,000
4,0	0,142	9,236	0,234	0,000	0,000
4,5	0,165	9,248	0,242	0,000	0,000
5,0	0,196	9,018	0,295	0,000	0,000
5,5	0,233	6,914	0,272	0,000	0,000
6,0	0,274	8,240	0,407	0,000	0,000
6,5	0,311	7,525	0,434	0,000	0,000
7,0	0,357	6,980	0,502	0,000	0,000
7,5	0,413	7,107	0,638	0,000	0,000
8,0	0,473	6,437	0,727	0,000	0,000
8,5	0,718	5,696	0,910	0,000	0,000
9,0	0,858	5,855	1,210	0,000	0,000
9,5	0,996	4,650	1,132	0,000	0,000
10,0	1,178	3,242	1,523	0,000	0,000
10,5	1,362	3,153	2,315	0,044	0,064
11,0	1,583	0,882	2,222	0,053	0,000
11,5	1,763	0,194	2,796	0,110	0,057
12,0	1,924	0,000	2,970	0,135	0,046
12,5	1,945	0,000	2,874	0,133	0,000
13,0	1,989	0,000	2,728	0,103	0,000

Apêndice 2 Dados experimentais referentes às cinéticas de crescimento com *S. cerevisiae* CAT-1 em combinações binárias de fonte de carbono.

Glicose mais Galactose / 30°C

Tempo (h)	X (g×L ⁻¹)	Gli (g×L ⁻¹)	Gal (g×L ⁻¹)	Eth (g×L ⁻¹)	Gly (g×L ⁻¹)	Ace (g×L ⁻¹)
1,0	0,052	5,127	4,808	0,468	0,012	0,000
2,0	0,069	5,127		0,353	0,023	0,000
3,0	0,090	5,020	4,982	0,607	0,028	0,202
3,5	0,097	5,026		0,701	0,065	0,284
4,0	0,121	5,063		0,671	0,042	0,211
4,5	0,145			0,848	0,045	0,208
5,0	0,180	4,370	5,001	0,733	0,072	0,280
5,5	0,220	4,507		1,086	0,079	0,261
6,0	0,270	3,498	4,523	1,042	0,088	0,297
6,5	0,313	3,248	4,672	1,113	0,100	0,296
7,0	0,379	2,695	4,612	1,635	0,127	0,307
7,5	0,428	2,250	4,767	1,595	0,107	0,240
8,0	0,489	1,508	4,551	1,950	0,124	0,249
8,5	0,753	0,636	4,369	2,247	0,142	0,091
9,0	0,895	0,063		2,169	0,117	0,249
9,5	0,938	0,000		3,001	0,161	0,229
10,0	1,040	0,000		3,199	0,164	0,216
10,5	1,130	0,000	4,097	2,344	0,144	0,239
11,0	1,253	0,000	3,325	2,871	0,137	0,227
11,5	1,318	0,000	3,038	3,406	0,137	0,100
12,0	1,443	0,000	2,687	4,144	0,161	0,171
12,5	1,470	0,000	1,766	3,291	0,138	0,165
13,0	1,685	0,000	1,294	4,476	0,180	0,122
13,5	1,823	0,000	0,505	3,454	0,133	0,088
14,0	1,800	0,000	0,166	3,346	0,123	0,084
14,5	1,825	0,000	0,130	4,084	0,142	0,104

Glicose mais Galactose / 37°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Gli (g×L⁻¹)	Gal (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,054	4,484	4,728	0,318	0,011	0,000
2,0	0,069	4,452	4,717	0,520	0,017	0,000
3,0	0,088	4,226	4,748	0,601	0,044	0,279
3,5	0,102	4,104	4,743	0,668	0,054	0,282
4,0	0,119	3,872	4,718	0,715	0,042	0,228
4,5	0,147	3,613	4,690	0,844	0,054	0,217
5,0	0,185	3,292	4,570	0,944	0,066	0,227
5,5	0,219	3,036	4,547	0,853	0,082	0,032
6,0	0,273	2,588	4,428	1,092	0,109	0,208
6,5	0,321	2,134	4,367	1,443	0,129	0,225
7,0	0,398	1,228	4,155	1,462	0,138	0,222
7,5	0,500	0,800	4,177	1,919	0,187	0,041
8,0	0,668	0,148	4,010	2,306	0,205	0,197
8,5	0,733	0,000	3,794	2,407	0,239	0,278
9,0	0,810	0,000	3,597	2,389	0,205	0,060
9,5	0,983	0,000	3,183	2,487	0,205	0,201
10,0	1,090	0,000	2,640	2,604	0,205	0,203
10,5	1,228	0,000	2,102	2,943	0,207	0,181
11,0	1,250	0,000	1,509	3,053	0,214	0,068
11,5	1,410	0,000	0,926	3,366	0,218	0,170
12,0	1,613	0,000	0,377	3,428	0,220	0,143
12,5	1,665	0,000	0,142	3,535	0,214	0,090
13,0	1,700	0,000	0,110	3,371	0,203	0,122
13,5	1,708	0,000	0,102	3,412	0,186	0,133

Glicose mais Frutose / 30°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Gli (g×L⁻¹)	Fru (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,050	4,847	4,840	0,509	0,015	0,000
2,0	0,063	4,950	4,720	0,556	0,024	0,000
3,0	0,092	4,966	4,749	0,390	0,023	0,000
3,5	0,104	4,749	4,723	0,685	0,074	0,303
4,0	0,120	4,483	4,594	0,851	0,045	0,226
4,5	0,140	4,494	4,515	0,883	0,080	0,294
5,0	0,173	4,451	4,436	0,940	0,060	0,226
5,5	0,217	4,603	4,505	0,984	0,081	0,042
6,0	0,260	4,250	4,725	0,999	0,115	0,317
6,5	0,305	3,920	4,535	1,431	0,154	0,322
7,0	0,360	3,757	4,378	1,599	0,180	0,312
7,5	0,417	3,077	4,452	1,840	0,164	0,250
8,0	0,475	2,375	3,944	2,163	0,217	0,321
8,5	0,683	1,762	3,430	2,125	0,222	0,330
9,0	0,845	1,152	3,061	2,924	0,246	0,101
9,5	1,105	0,703	2,904	3,478	0,321	0,330
10,0	1,280	0,110	1,436	3,382	0,256	0,098
10,5	1,333	0,000	0,783	3,604	0,253	0,232
11,0	1,393	0,000	0,234	3,090	0,218	0,105
11,5	1,553	0,000	0,097	3,802	0,254	0,121
12,0	1,618	0,000	0,156	4,161	0,264	0,216
12,5	1,520	0,000	0,138	3,930	0,252	0,232
13,0	1,553	0,000	0,132	3,847	0,243	0,248

Glicose mais Frutose / 37°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Gli (g×L⁻¹)	Fru (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,053	4,675	4,751	0,000	0,000	0,000
2,0	0,064	4,420	4,597	0,000	0,000	0,000
3,0	0,069	4,334	4,594	0,453	0,000	0,000
3,5	0,079	4,237	4,529	0,498	0,000	0,000
4,0	0,085	4,080	4,430	0,569	0,000	0,000
4,5	0,099	3,860	4,288	0,641	0,048	0,000
5,0	0,116	3,595	4,130	0,731	0,068	0,000
5,5	0,137	3,543	4,126	0,896	0,074	0,000
6,0	0,165	3,312	4,009	1,047	0,098	0,000
6,5	0,195	3,135	3,929	1,325	0,116	0,000
7,0	0,243	2,778	3,764	1,653	0,159	0,000
7,5	0,284	2,587	3,608	1,817	0,176	0,000
8,0	0,344	2,179	3,406	2,096	0,215	0,000
8,5	0,407	1,636	3,041	2,479	0,278	0,000
9,0	0,568	1,199	2,726	2,845	0,327	0,000
9,5	0,748	0,698	2,263	3,334	0,367	0,000
10,0	0,963	0,229	1,599	4,049	0,428	0,000
10,5	1,108	0,000	0,866	4,534	0,463	0,000
11,0	1,280	0,000	0,320	4,919	0,449	0,000
11,5	1,278	0,000	0,174	4,887	0,444	0,000
12,0	1,320	0,000	0,122	4,777	0,434	0,000
12,5	1,355	0,000	0,113	4,749	0,420	0,119
13,0	1,430	0,000	0,113	4,716	0,414	0,147
13,5	1,423	0,000	0,110	4,551	0,378	0,153

Frutose mais Galactose / 30°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Fru (g×L⁻¹)	Gal (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,054	4,984	4,849			
2,0	0,068	5,045	4,970	0,717	0,018	0,000
3,0	0,092	4,778	4,923			
3,5	0,104	4,721	4,937			
4,0	0,127	4,676	4,909	0,828	0,026	0,213
4,5	0,155	4,184	4,877			
5,0	0,194	4,069	4,856	0,924	0,030	0,215
5,5	0,231	4,008	4,843	1,146	0,048	0,212
6,0	0,273	3,666	4,804	1,381	0,060	0,256
6,5	0,327	3,522				
7,0	0,380	3,135	4,623	1,630	0,083	0,241
7,5	0,525	2,456	4,612	1,849	0,093	0,242
8,0	0,628	1,573	4,384	2,063	0,109	0,241
8,5	0,715	1,140	4,141	1,913	0,099	0,213
9,0	0,898	0,871	3,486	2,702	0,133	0,215
9,5	1,025	0,457		2,978	0,134	0,097
10,0	1,143	0,000	3,084	3,018	0,131	0,099
10,5	1,263	0,000	2,346	3,110	0,125	0,151
11,0	1,415	0,000	2,113	3,435	0,121	0,194
11,5	1,565	0,000	1,102	2,907	0,114	0,076
12,0	1,650	0,000	1,016	3,840	0,134	0,086
12,5	1,765	0,000	0,370	4,049	0,137	0,084
13,0	1,863	0,000	0,000	3,811	0,118	0,074
13,5	1,890	0,000	0,000	3,926	0,118	0,080
14,0	1,890	0,000	0,000	3,639	0,095	0,144
14,5	1,928	0,000	0,000			
15,0	1,958	0,000	0,000			

Frutose mais Galactose / 37°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Fru (g×L⁻¹)	Gal (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gly (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,058	4,742	4,900			
2,0	0,064	4,600	4,976	0,659	0,014	0,000
3,0	0,087	4,557	5,048	0,316	0,022	0,000
3,5	0,099	4,424	4,849	0,778	0,028	0,241
4,0	0,120	4,112	4,744	0,518	0,038	0,086
4,5	0,154	3,695	4,738	0,933	0,045	0,237
5,0	0,193	3,566	4,700	0,992	0,058	0,255
5,5	0,233	3,267	4,504	0,939	0,077	0,253
6,0	0,286	2,698	4,097	1,380	0,099	0,247
6,5	0,341	2,278	3,842	1,477	0,130	0,247
7,0	0,412	1,759	3,334	2,032	0,159	0,233
7,5	0,555	1,064	3,122	2,229	0,192	0,260
8,0	0,725	0,323	2,950	2,672	0,216	0,255
8,5	0,855	0,000	2,664	2,661	0,218	0,071
9,0	0,960	0,000	2,156	2,951	0,201	0,222
9,5	1,153	0,000	1,428	2,958	0,237	0,105
10,0	1,250	0,000	0,677	3,179	0,211	0,079
10,5	1,470	0,000	0,445	2,953	0,216	0,187
11,0	1,515	0,000	0,000	3,620	0,244	0,092
11,5	1,665	0,000	0,000	3,579	0,212	0,151
12,0	1,690	0,000	0,000	3,564	0,201	0,140
12,5	1,733	0,000	0,000	2,371	0,207	0,185
13,0	1,788	0,000	0,000	3,579	0,184	0,166
13,5	1,853	0,000	0,000	3,153	0,157	0,095
14,0	1,875	0,000	0,000	3,153	0,157	0,095

Apêndice 3 Dados experimentais referentes às cinéticas de crescimento com *B sacchari* LFM 101.

Glicose / 30°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Gli (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gn (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,032	9,559	0,000	0,000	0,000
2,0	0,058	8,746	0,000	0,000	0,000
3,0	0,101	8,638	0,000	0,000	0,000
4,0	0,158	9,592	0,000	0,000	0,000
5,0	0,275	9,595	0,000	0,000	0,000
6,0	0,347	8,615	0,000	0,000	0,000
7,0	0,468	9,409	0,000	0,000	0,000
8,0	0,605	7,177	0,000	0,000	0,000
9,0	0,720	6,522	0,000	0,000	0,000
10,0	0,877	6,642	0,000	0,000	0,000
11,0	1,204	5,699	0,000	0,000	0,000
12,0	1,144	5,143	0,251	0,000	0,000
13,0	1,240	4,488	0,000	0,000	0,000
14,0	1,494	3,854	0,000	0,000	0,000
15,0	1,616	2,587	0,000	0,000	0,000
16,0	1,766	1,188	0,232	0,000	0,000
17,0	1,654	0,751	0,000	0,000	0,000
18,0	1,816	0,000	0,238	0,000	0,000

Glicose / 35°C

Tempo (h)	X (gxL⁻¹)	Gli (gxL⁻¹)	Eth (gxL⁻¹)	Gn (gxL⁻¹)	Ace (gxL⁻¹)
1,0	0,034	9,296	0,000	0,000	0,000
2,0	0,065	8,635	0,000	0,000	0,000
3,0	0,113	8,048	0,000	0,000	0,000
4,0	0,188	8,055	0,000	0,000	0,000
5,0	0,264	8,017	0,000	0,000	0,000
6,0	0,384	7,748	0,000	0,000	0,000
7,0	0,525	6,608	0,000	0,000	0,000
8,0	0,618	6,969	0,000	0,000	0,000
9,0	0,779	5,683	0,000	0,000	0,000
10,0	0,910	6,133	0,000	0,000	0,000
11,0	1,020	4,994	0,000	0,000	0,000
12,0	1,270	4,207	0,000	0,000	0,000
13,0	1,398	3,816	0,000	0,000	0,000
14,0	1,574	3,185	0,000	0,000	0,000
15,0	1,642	3,087	0,000	0,000	0,000
16,0	1,852	1,010	0,000	0,000	0,000
17,0	2,184	1,913	0,000	0,000	0,000
18,0	2,260	1,348	0,000	0,000	0,000
19,0	2,460	1,446	0,000	0,000	0,000
20,0	2,604	0,561	0,000	0,000	0,000
21,0	2,840	0,139	0,000	0,000	0,000

Sacarose / 30°C

Tempo (h)	X (gxL⁻¹)	Sac (gxL⁻¹)	Eth (gxL⁻¹)	Gn (gxL⁻¹)	Ace (gxL⁻¹)
1,0	0,041	9,408	0,000	0,000	0,000
2,0	0,067		0,000	0,000	0,000
3,0	0,115	9,066	0,000	0,000	0,000
4,0	0,184		0,000	0,000	0,000
5,0	0,389	7,539	0,000	0,000	0,000
6,0	0,570	6,917	0,000	0,000	0,000
7,0	0,699	6,860	0,000	0,000	0,000
8,0	0,817		0,000	0,000	0,000
9,0	0,969	6,593	0,144	0,000	0,129
10,0	1,230		0,000	0,000	0,000
11,0	1,374	3,940	0,000	0,000	0,000
12,0	1,420	3,309	0,000	0,000	0,000
13,0	1,452	3,992	0,000	0,000	0,000
14,0	1,560	1,741	0,000	0,000	0,305
15,0	1,592	2,366	0,000	0,000	0,057
16,0	1,610		0,000	0,000	0,000
17,0	1,716	1,634	0,000	0,000	0,000
18,0	1,810	0,000	0,000	0,000	0,000

Sacarose / 35°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Sac (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Gn (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,038	9,036	0,000	0,000	0,000
2,0	0,068	9,036	0,000	0,000	0,000
3,0	0,127	7,001	0,000	0,000	0,000
4,0	0,204	7,681	0,000	0,000	0,000
5,0	0,387	7,036	0,000	0,000	0,000
6,0	0,560		0,000	0,000	0,000
7,0	0,672	6,075	0,000	0,000	0,000
8,0	0,854	5,410	0,000	0,000	0,000
9,0	0,921		0,000	0,000	0,000
10,0	1,114	3,712	0,000	0,000	0,000
11,0	1,284	3,929	0,000	0,000	0,000
12,0	1,596	3,676	0,000	0,000	0,000
13,0	1,612	3,692	0,000	0,000	0,000
14,0	1,880	2,624	0,000	0,000	0,000
15,0	1,960	2,260	0,000	0,000	0,000
16,0	1,976		0,000	0,000	0,000
17,0	2,320		0,000	0,000	0,000
18,0	2,084	1,246	0,000	0,000	0,000
19,0	2,384		0,000	0,000	0,000
20,0	2,708	0,197	0,000	0,000	0,000
21,0	2,708	0,448	0,000	0,000	0,000

Glicerol / 30°C

Tempo (h)	X (g×L⁻¹)	Gn (g×L⁻¹)	Eth (g×L⁻¹)	Ace (g×L⁻¹)
1,0	0,034	10,300	0,000	0,000
2,0	0,060	10,300	0,000	0,000
3,0	0,097	9,810	0,000	0,000
4,0	0,161	9,537	0,000	0,000
5,0	0,280	9,830	0,000	0,000
6,0	0,374	8,624	0,000	0,000
7,0	0,546	8,856	0,000	0,000
8,0	0,633	9,486	0,000	0,000
9,0	0,758	9,481	0,000	0,000
10,0	0,922	9,554	0,000	0,000