

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL**

GUILHERME TONIAL NEVES

**ESTUDO METABÓLICO DA LEVEDURA INDUSTRIAL  
*Saccharomyces cerevisiae* PE-2 E DOIS ISOLADOS de cama de frango  
denominados AVE-I E AVE-II**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL

Dourados/MS  
Agosto/2018

**ESTUDO METABÓLICO DA LEVEDURA INDUSTRIAL  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PE-2 E DOIS ISOLADOS  
SELVAGENS AVE-I E AVE-II**

**GUILHERME TONIAL NEVES**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO FOSSA DA PAZ  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO GRACIANO FONSECA**

Dissertação submetido à banca avaliadora do programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração Tecnologia Ambiental.

Dourados/MS

Agosto/2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

N513e Neves, Guilherme Tonial

Estudo Metabólico da levedura Industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e dois isolados de cama de frango denominados AVE-I E AVE-II / Guilherme Tonial Neves -- Dourados: UFGD, 2018.

53f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. levedura. 2. fisiologia. 3. fermentação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

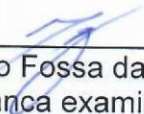
**©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.**

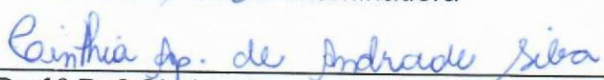


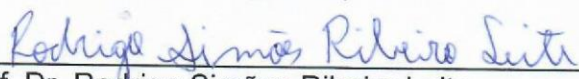
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

## Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Estudo metabólico da levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e dois isolados selvagens AVE-I e AVE-II**”, de autoria de **Guilherme Tonial Neves**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz  
Presidente da banca examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Cinthia Aparecida de Andrade Silva  
Membro Examinador (UEMS)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 22 de agosto de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente á Deus, pois sem Ele nada é possível.

A minha mãe Sara, mulher batalhadora que sempre me ensinou o verdadeiro valor das coisas, sempre mostrando que o melhor caminho é a educação e por ter me ajudado a me tornar oque sou hoje.

Ao meu grande Pai, Hamilton, no qual sempre mostrou que ser gentil com as pessoas pode ser o melhor presente que se pode dar a elas, e pela parceria e incentivo em tudo que ia fazer.

A minha namorada Glaucia e sua família por me fazer sentir parte de outra família em Dourados, sempre me ajudando nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, sejam eles brasileiros, portugueses, alemães, israelenses ou de outros lugares do mundo, que me acompanharam durante dessa jornada, dividindo momentos bons e ruins, e sempre me apoiando.

A todos do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos, pelos ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais.

Ao Grupo de Pesquisa em Bioengenharia, no qual me acolheu tão bem durante esse tempo, sempre me ajudando.

Ao meu Orientador Professor Dr. Marcelo Fossa da Paz, por toda ajuda e ensinamentos, e sua grande paciência durante todos esses anos de orientações.

Ao meu Co-Orientador Professor Dr. Gustavo Graciano Fonseca, sempre me incetivando na busca por novos conhecimentos e pela sua orientação.

A CAPES por financiar a bolsa de mestrado e o projeto de pesquisa.

Á todos, meu muito obrigado.

## LISTA DE ABREVIÇÕES E NOMENCLATURAS

PE-2.....	Levedura industrial isolada na Usina Pedra (SP)
AVE-I.....	Levedura selvagem isolada de cama de frango na região de Dourados (MS)
AVE-II.....	Levedura selvagem isolada de cama de frango na região de Dourados (MS)
GLC.....	Glicose
FRU.....	Frutose
SAC.....	Sacarose
GAL.....	Galactose
GLC/FRU.....	Cultivo misto de Glicose e Frutose
TD.....	Tempo de duplicação
$\mu_{\max}$ .....	Velocidade específica de crescimento máximo
X.....	Concentração celular
$X_{\max}$ .....	Concentração celular máxima
YPD.....	Extrato de levedura, peptona, dextrose
$P_X$ .....	Produtividade de biomassa
$P_{\text{cel}}$ .....	Produtividade celular
$X_f$ .....	Concentração celular final
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	Sulfato de Amônio
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	Fosfato de potássio monobásico
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	Sulfato de Magnésio
EDTA.....	Ácido etilenodiamino tetra-acético
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	Sulfato de zinco heptahidratado
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	Cloreto de Manganês dihidratado
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	Cloreto de cobalto hexahidratado
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	Sulfato de cobre pentahidratado
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	Molibdato de sódio dihidratado
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	Cloreto de cálcio dihidratado
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	Sulfato ferroso heptahidratado
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	Ácido bórico
KI.....	Iodeto de potássio
NaOH.....	Hidróxido de sódio
HCl.....	Ácido clorídrico
DNS.....	Ácido 3,5 dinitrosalicílico

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises morfológica das linhagens de leveduras estudadas.....	31
Tabela 2. Cultivos realizados com as linhagens PE-2, AVE-I e AVE-II em diferentes fontes de carbono na temperatura de 30°C.....	33

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Série histórica da produção de etanol hidratado e anidro .....	20
Figura 2. Produção de etanol total por região.....	20
Figura 3. Produção de etanol total por Unidade da Federação .....	20
Figura 4. Esquema da produção de etanol na usina.....	21
Figura 5. Produção de etanol pela célula de levedura .....	22
Figura 6. Fluxograma mostrando a versatilidade da molécula de glicose.....	23
Figura 7. Representação esquemática de diferentes estratégias para a absorção e hidrólise da sacarose.....	24
Figura 8. Curva de crescimento do microrganismo cultivado em cultivo descontínuo .....	25

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de crescimento das leveduras em diferentes substratos .....	35
Gráfico 2. Curva de crescimento e consumo do substrato glicose da levedura PE-2.....	36
Gráfico 3. Curva de crescimento e consumo do substrato glicose da levedura AVE-I.....	36
Gráfico 4. Curva de crescimento e consumo do substrato frutose da levedura PE-2.....	37
Gráfico 5. Curva de crescimento e consumo do substrato frutose da levedura AVE-I.....	38
Gráfico 6. Curva de crescimento e consumo do substrato frutose da levedura AVE-II.....	39
Gráfico 7. Curva de crescimento e consumo do substrato sacarose da levedura PE-2 .....	39
Gráfico 8. Curva de crescimento e consumo do substrato sacarose da levedura AVE-I .....	40
Gráfico 9. Curva de crescimento e consumo do substrato sacarose da levedura AVE-II .....	41
Gráfico 10. Curva de crescimento e consumo dos substratos glicose e frutose da levedura PE-2 .....	42
Gráfico 11. Curva de crescimento e consumo dos substratos glicose e frutose da levedura AVE-I.....	43
Gráfico 12. Curva de crescimento e consumo dos substratos glicose e frutose da levedura AVE-II.....	43



## ESTUDO METABÓLICO DA LEVEDURA INDUSTRIAL *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 E DOIS ISOLADOS SELVAGENS AVE-I E AVE-II

### Resumo

No Brasil a produção de etanol é feita pelas leveduras através da fermentação utilizando como substrato o mosto de cana de açúcar. Algumas leveduras são amplamente utilizadas nas indústrias, mas a bioprospecção de novas linhagens é necessária afim de se obter linhagens que produzam mais etanol. Este trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo através dos parâmetros cinéticos da linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, e dois isolados selvagens isolado de cama de frango AVE-I e AVE-II, comparando 4 açúcares (glicose, frutose, sacarose, galactose) ( $10\text{g}\times\text{L}^{-1}$ ) como fontes únicas de carbono e um mix (glicose e frutose) ( $5\text{g}\times\text{L}^{-1}$ ) na temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  no cultivo em aerobiose. As leveduras foram mantidas em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose) sendo cultivadas em aerobiose em meio mineral. A cada 30 minutos amostras foram retiradas, para construir uma curva de crescimento e avaliação dos parâmetros cinéticos. Os parâmetros estudados foram velocidade específica de crescimento máximo ( $\mu_{\text{max}}$ ), tempo de duplicação (TD), concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{max}}$ ) e produtividade de biomassa ( $P_{\text{cel}}$ ), além disso, análises micro e macro morfológicas foram feitas. Para analisar o consumo de substratos, foi utilizado a metodologia de quantificação de açúcares redutores pelo método ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) e para diferenciar a glicose o método de glicose-oxidase. Os resultados demonstraram que o isolado AVE-I obteve o maior  $\mu_{\text{max}}$  em três açúcares estudados (glicose  $0,50\pm 0,01\text{ h}^{-1}$ , frutose  $0,47\pm 0,00\text{ h}^{-1}$ , sacarose  $0,49\pm 0,01\text{ h}^{-1}$ ) e no cultivo misto (Glicose|Frutose  $0,47\pm 0,03\text{ h}^{-1}$ ) e menor taxa de  $X_{\text{max}}$  em sacarose ( $1,37\pm 0,48\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) quando comparado a linhagem PE-2 ( $2,12\pm 0,02\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) e o isolado AVE-II ( $2,67\pm 0,22\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ). O isolado AVE-II demonstrou maior produção de biomassa ( $2,69\pm 0,03\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) e maior tempo de adaptação (7 – 10 horas) em todos substratos, a linhagem PE-2 apresentou menor produção de biomassa ( $1,11\pm 0,02\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) e  $\mu_{\text{max}}$  médio ( $0,41\pm 0,00\text{ h}^{-1}$ ) quando comparada ao isolado AVE-I ( $0,50\text{ h}^{-1}$ ) e AVE-II ( $0,36\text{ h}^{-1}$ ). Em relação ao consumo de substratos a levedura PE-2 e AVE-I apresentaram consumo preferencial de frutose, o isolado AVE-II teve a menor taxa de consumo dos substratos. Ao se comparar a morfologia dos dois isolados com a linhagem PE-2, percebeu-se que os isolados possuem micro e macro morfologias diferentes indicando espécies diferentes.

**Palavras-chave:** levedura, fisiologia, fermentação.

## Abstract

In Brazil, the production of ethanol is made by yeast through fermentation using sugar cane as substrate. Some yeasts are widely used in industries, but the bioprospecting of new lineages is necessary in order to obtain lines that produce more ethanol. The objective of this work was to study the metabolism through the kinetic parameters of *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 industrial strain and two wild isolates isolated from chicken bed AVE-I and AVE-II, comparing 4 sugars (glucose, fructose, saccharose, galactose) ( $10 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) as single carbon sources and a mix (glucose and fructose) ( $5 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) at  $30^\circ \text{C}$  in aerobiosis culture. Yeasts were maintained in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) and were grown in aerobiosis in mineral medium. Every 30 minutes samples were taken to construct a growth curve and evaluate the kinetic parameters. The parameters studied were specific maximum growth velocity ( $\mu_{\text{max}}$ ), doubling time (TD), maximum biomass concentration ( $X_{\text{max}}$ ) and biomass productivity ( $P_{\text{cel}}$ ), in addition, micro and macro morphological analyzes were performed. To analyze the consumption of substrates, the methodology of quantification of reducing sugars by the 3,5 dinitrosalicylic acid method (DNS) was used to differentiate the glucose and the glucose oxidase method. The results showed that the AVE-I isolate obtained the highest  $\mu_{\text{max}}$  in three sugars studied (glucose  $0,50 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ , fructose  $0,47 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ , sucrose  $0,49 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) and the lowest  $X_{\text{max}}$  sucrose ( $1,37 \pm 0,48 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) in the mixed cultivation (glucose  $0,67 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ ) when compared to the PE-2 ( $2,12 \pm 0,02 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) and the AVE-II isolate ( $2,67 \pm 0,22 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ). The AVE-II isolate showed higher biomass production ( $2,69 \pm 0,03 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) and longer adaptation time (7-10 hours) in all substrates, the PE-2 line presented lower biomass production ( $1,11 \pm 0,02 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) and medium  $\mu_{\text{max}}$  ( $0,41 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ ) when compared to the isolated AVE-I ( $0,50 \text{ h}^{-1}$ ) and AVE-II ( $0,36 \text{ h}^{-1}$ ). In relation to the consumption of substrates, PE-2 yeast and AVE-I presented preferential consumption of fructose, the AVE-II isolate had the lowest rate of consumption of the substrates. When comparing the performance of the two isolates with the PE-2 lineage, it was observed that the isolates had different micro and macro morphologies indicating different species.

**Keywords:** yeast, physiology, fermentation.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	2
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES .....	3
Resumo .....	4
Abstract.....	5
CAPÍTULO 1 .....	8
1.1 APRESENTAÇÃO .....	9
1.2 ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS NO PRIMEIRO ANO DE MESTRADO.....	10
1.2.1 DISCIPLINAS CURSADAS NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2016 .....	10
1.2.2 DISCIPLINAS CURSADAS NO SEGUNDO SEMESTRE 2016.....	12
1.2.3 DISCIPLINAS CURSADAS NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2017 .....	13
1.3. ATIVIDADES DE PESQUISA DESENVOLVIDAS .....	14
1.3.1 DESCRIÇÃO .....	14
1.4. ATIVIDADES REALIZADAS.....	15
1.5. REFERÊNCIAS .....	15
CAPÍTULO 2 .....	17
2.1 Introdução.....	18
2.2 Revisão de Literatura.....	19
2.2.1 Etanol .....	19
2.2.2 Modelo de produção de etanol no Brasil.....	21
2.2.3. Leveduras .....	22
2.2.4. Metabolismo de leveduras.....	23
2.2.5. Parâmetros cinéticos.....	24
2.3. OBJETIVOS.....	26
2.3.1 Objetivo geral .....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
2.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.4.1 Micro e Macro morfologia .....	27
2.4.2 Microrganismos e manutenção.....	27
2.4.3 Meio de cultura e condições de cultivo .....	27
2.4.4 Amostragens e preparo das amostras .....	28
2.4.5 Determinação da biomassa.....	28
2.4.6 Determinação de parâmetros cinéticos.....	28
2.4.7 Determinação do consumo de açúcares .....	29
2.4.7.1 Método Glicose Oxidase .....	29
2.4.7.2 Hidrólise da sacarose.....	29
2.4.8 Análise estatística.....	30
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
2.5.1 Análise Micro e Macro Morfológica.....	31

2.5.2 Parâmetros cinéticos.....	33
2.5.3 Estudo de consumo de substratos.....	35
2.5.3.1 Glicose.....	35
2.5.3.2 Frutose.....	37
2.5.3.3 Sacarose.....	39
2.5.3.4 Cultivo com Glicose e Frutose.....	41
2.6. CONCLUSÃO.....	44
2.7 REFERÊNCIAS.....	45

**CAPÍTULO 1**  
**MEMORIAL**

## 1.1 APRESENTAÇÃO

Graduado em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD – MS), foi bolsista de Iniciação Científica (CNPq - 2012/2013), desenvolvendo projetos de microbiologia e fermentação. Durante a graduação teve como foco de estudo a seleção de leveduras selvagens para otimização da produção de etanol.

Durante a graduação foi bolsista do programa Ciência Sem Fronteiras na Universidade da Beira Interior em Portugal realizou estágio no Laboratório de ciência e tecnologia de materiais lignocelulósicos, além de estágio de verão no Instituto de Investigação Científico Tropical em Lisboa.

Realizou estágio obrigatório no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário de Greifswald (Alemanha) pelo programa IAESTE (Associação Internacional de estágios profissionais).

Trabalhou na produção de embriões bovinos na empresa Origens BRA na cidade de Dourados – MS durante 1 e 3 meses.

Atualmente é aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados (PPGCTA-UFGD), atuando na linha de pesquisa: Estudo do metabolismo de leveduras, onde desenvolveu projeto que visa o estudo metabólico da levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e dois isolados selvagens AVE-I e AVE-II.

Durante o mestrado participou do programa de Inovação Transdisciplinar na Universidade Hebraica de Jerusalém.

É membro do Grupo de Pesquisa em Bioengenharia e Biotecnologia e Microrganismos.

## 1.2 ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS NO PRIMEIRO ANO DE MESTRADO

Neste tópico, detalham-se as atividades realizadas durante o período de mestrado até a presente data.

### 1.2.1 DISCIPLINAS CURSADAS NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2016

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente
1. Ciência dos Materiais I	2016.1	60 h/a	A	Optativa	Dr <sup>a</sup> .Seila Rojas de Souza

Ementa: Ligações e estruturas. Estrutura da rede cristalina. Propriedades térmicas da rede. Dinâmica dos elétrons na rede. Ligações químicas. Bandas de energia em sólidos, cristalinos. Cristais semicondutores. Defeitos.

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente
2. Introdução as técnicas Instrumentais aplicadas ao Monitoramento ambiental	2016.1	60 h/a	A	Optativa	Dr. Heberth Juliano Vieira

Ementa: Introdução aos princípios da separação, da absorção e da emissão de átomos; introdução as técnicas cromatográficas; cromatografia gasosa (CG); cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (EC), espectrometria de absorção atômica em chama e forno de grafite; espectrometria de emissão ótica com plasma de argônio induzido; espectrometria de massas com plasma de argônio induzido, geração de hidretos e especiação química. Aplicação das técnicas cromatográficas e espectrométricas à amostras ambientais.

Ementa: Conceitos ecológicos básicos, ciclos biogeoquímicos, fluxo de energia nos ecossistemas, variações no ambiente físico, ecologia de populações, interações ecológicas, ecologia de comunidades, conservação e biodiversidade, desenvolvimento econômico e poluição ambiental.

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente
3. Aplicação ambiental e industrial de enzimas microbianas	2016.1	60 h/a	A	Optativa	Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Ementa: Estrutura e propriedades das enzimas. Cinética enzimática. Caracterização físico-química de enzimas. Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas com potencial biotecnológico. Processos fermentativos para produção de enzimas microbianas. Extração e purificação de enzimas. Imobilização de enzimas em suportes insolúveis.

Aplicação de enzimas em processos biotecnológicos.

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente
4. Ecologia de ecossistemas	2016.1	60 h/a	A	Obrigatória	Dr <sup>a</sup> . Zefa Valdivina Pereira

Ementa: Conceitos ecológicos básicos, ciclos biogeoquímicos, fluxo de energia nos ecossistemas, variações no ambiente físico, ecologia de populações, interações ecológicas, ecologia de comunidades, conservação e biodiversidade, desenvolvimento econômico e poluição ambiental

DISCIPLINA	Ano	Carga	Conceito	Categoria	Docente
5. Meio Ambiente e Tecnologia	2016.1	30 h/a	B	Obrigatória	Dr. Eduardo J. Arruda

Ementa: Degradação do meio ambiente. Legislação ambiental brasileira. Desenvolvimento sustentável. Processos limpos.



### 1.2.2 DISCIPLINAS CURSADAS NO SEGUNDO SEMESTRE 2016

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente
1. Estatística Ambiental	2016.2	60 h/a	A	Optativa	Dr. Heberth Juliano Vieira

Ementa: Correlação e Regressão. Procedimentos para comparações múltiplas: teste de t-student, análise de variância, teste de Tukey, teste de Duncan. Experimentos fatoriais.

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente
2. Inovação Biotecnológica	2016.2	30 h/a	A	Obrigatória	Dr. Marcelo Fossa da Paz

Ementa: Promover as capacidades regionais com base na aplicação da Biotecnologia de processos fermentativos, a fim de renovar fontes de energia e desenvolver novos produtos e processos menos danosos ao ambiente. Estudo de enzimas e fermentações, salientando a importância da microbiologia industrial, da bioquímica e da fisiologia microbiana, para o desenvolvimento de tecnologias e produtos, com aproveitamento de subprodutos da indústria local, tendo como perspectiva a melhoria da qualidade de vida, da região da Grande Dourados, e desenvolvimento tecnológico.

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente
3. Tópicos especiais II Bioengenharia Ambiental	2016.2	30 h/a	A	Optativa	Dr. Gustavo Graciano Fonseca

Ementa: Fundamentos da Bioquímica Carboidratos; ácidos graxos; lipídios; aminoácidos; proteínas; vitaminas. Nutrição dos microrganismos: fontes de energia, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, fontes de minerais e fatores de crescimento. Matérias primas glicídicas Metabolismo celular. Nutrientes. Anabolismo (biossíntese). Catabolismo (degradação). Fonte de energia.

### 1.2.3 DISCIPLINAS CURSADAS NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2017

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente	
1. Seminários I	2017.1	30 h/a	B	Obrigatória	Dr. Isaiás Cabrini	

Ementa: Metodologia da apresentação de trabalhos científicos sob forma de seminários, uso de recursos audiovisuais, habilidades técnicas de apresentação de trabalhos científicos em seminários, auxílio (organização do conteúdo e abordagem didática) no preparo e apresentação de aulas e dos projetos de dissertação.

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente	
2. Biologia Molecular Aplicadas ao monitoramento Ambiental	2017.1	60 h/a	A	Optativa	Dra. Alexéia Barufatti Grisolia	

Ementa: Introdução à Biologia Molecular: os marcadores moleculares e suas classes. Técnicas Moleculares, Sequenciamento e Microarray, vantagens e desvantagens, Análise dos dados obtidos pelos marcadores na determinação da variabilidade genética. Análise genética evolutiva baseada em polimorfismo de fragmentos e de segmentos de DNA amplificados pela técnica de PCR e aplicabilidade em taxonomia. Estimativa de coeficiente de similaridade e distância genética. Aplicação de marcadores moleculares ao estudo da Biodiversidade: conservação de espécies

DISCIPLINA	Ano	Carga Horária	Conceito	Categoria	Docente	
3. Estágio à Docência	2017.1	30 h/a	A	Obrigatória	Dr. Marcelo Fossa da Paz	

Ementa: Disciplina especial destinada aos mestrandos e doutorandos. Atividades de docência junto aos cursos da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET), da Faculdade de Engenharias (FAEN) ou Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da UFGD.

Carga Horária Exigida: 360      Número de créditos exigidos: 24

Carga Horária Cursada: 510      Número de créditos cursados: 26

### 1.3. ATIVIDADES DE PESQUISA DESENVOLVIDAS

#### ESTUDO METABÓLICO DA LEVEDURA INDUSTRIAL *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PE-2 E DOIS ISOLADOS SELVAGENS AVE-I E AVE-II

##### 1.3.1 DESCRIÇÃO

No Brasil a produção de etanol é feita pelas leveduras através da fermentação utilizando como substrato o mosto de cana de açúcar. Algumas leveduras são amplamente utilizadas nas indústrias, mas a bioprospecção de novas linhagens é necessária afim de se obter linhagens que produzam mais etanol. Este trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo através dos parâmetros cinéticos da linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, e dois isolados selvagens isolado de cama de frango AVE-I e AVE-II, comparando 4 açúcares (glicose, frutose, sacarose, galactose) ( $10\text{g}\times\text{L}^{-1}$ ) como fontes únicas de carbono e um mix (glicose e frutose) ( $5\text{g}\times\text{L}^{-1}$ ) na temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  no cultivo em aerobiose. As leveduras foram mantidas em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose) sendo cultivadas em aerobiose em meio mineral. A cada 30 minutos amostras foram retiradas, para construir uma curva de crescimento e avaliação dos parâmetros cinéticos. Os parâmetros estudados foram velocidade específica de crescimento máximo ( $\mu_{\text{max}}$ ), tempo de duplicação (TD), concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{max}}$ ) e produtividade de biomassa ( $P_{\text{cel}}$ ), além disso, análises micro e macro morfológicos foram feitas. Para analisar o consumo de substratos, foi utilizado a metodologia de quantificação de açúcares redutores pelo método ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) e para diferenciar a glicose o método de glicose-oxidase. Os resultados demonstraram que o isolado AVE-I obteve o maior  $\mu_{\text{max}}$  em três açúcares estudados (glicose  $0,50\pm 0,01\text{ h}^{-1}$ , frutose  $0,47\pm 0,00\text{ h}^{-1}$ , sacarose  $0,49\pm 0,01\text{ h}^{-1}$ ) e no cultivo misto (Glicose|Frutose  $0,47\pm 0,03\text{ h}^{-1}$ ) e menor taxa de  $X_{\text{max}}$  em sacarose ( $1,37\pm 0,48\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) quando comparado a linhagem PE-2 ( $2,12\pm 0,02\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) e o isolado AVE-II ( $2,67\pm 0,22\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ). O isolado AVE-II demonstrou maior produção de biomassa ( $2,69\pm 0,03\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) e maior tempo de adaptação (7 – 10 horas) em todos substratos, a linhagem PE-2 apresentou menor produção de biomassa ( $1,11\pm 0,02\text{ g}\times\text{L}^{-1}$ ) e  $\mu_{\text{max}}$  médio ( $0,41\pm 0,00\text{ h}^{-1}$ ) quando comparada ao isolado AVE-I ( $0,50\text{ h}^{-1}$ ) e AVE-II ( $0,36\text{ h}^{-1}$ ). Em relação ao consumo de substratos a levedura PE-2 e AVE-I apresentaram consumo preferencial de frutose, o isolado AVE-II teve a menor taxa de consumo dos substratos. Ao se comparar a morfologia dos dois isolados com a linhagem PE-2, percebeu-se que os isolados possuem micro e macro morfologias diferentes indicando espécies diferentes.

#### 1.4. ATIVIDADES REALIZADAS

- Cultivo e manutenção dos microrganismos
- Cultivos em shakers
- Cinéticas do processo fermentativo
- Análise dos parâmetros cinéticos
- Análise de consumo de substratos pelo método DNS
- Caracterização micro e macro morfológicas dos microrganismos

#### 1.5. REFERÊNCIAS

AMORIM, Henrique V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267, 2011.

BASSO, L.C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast Research**, v.8, n.7, p.1155-1163, 2008.

BASSO, T.O. et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic engineering**, v.13, n.6, p.694-703, 2011.

BATISTOTE, M. et al. 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**, v.32, n.2, p.83, 2010.

BERTHELIS, N. J. et al. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS yeast research**, v.4, n.7, p.683-689, 2004.

BRASIL, MME. Balanço Energético Nacional. MME, Empresa de Pesquisa Energética (EPE), Brasília, DF. Disponível em, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. – v. 1 – Brasília:2017.

COSTA, R.C.; PRATES, C.C.; PIMENTEL P.T. O Papel das Fontes Renováveis de Energia no Desenvolvimento do Setor Energético e Barreiras à sua Penetração no Mercado. **BNDES Setorial**, v.21, p.5-30, 2005.



**CAPÍTULO 2**  
**ESTUDO METABÓLICO DA LEVEDURA INDUSTRIAL *Saccharomyces***  
***cerevisiae* PE-2 E DOIS ISOLADOS SELVAGENS AVE-I E AVE-II**

## 2.1 Introdução

Após a crise do petróleo que iniciou na década de 1970, o interesse por combustíveis renováveis vem aumentando cada vez mais, influenciando o setor energético (COSTA, 2005). Uma alternativa para diminuir a dependência de combustíveis derivados do petróleo foi a utilização do etanol. O Brasil foi um dos países pioneiros na utilização em larga escala, devido ao fomento do programa Proálcool, estimulando a produção de carros que podem utilizar gasolina e álcool (PALOMINO, 2009). O aumento no consumo possibilitou a criação de usinas em diversos estados do país e o estado do Mato Grosso do Sul se beneficiou com esse programa.

A produção de etanol no Brasil utiliza o mosto proveniente da cana de açúcar, sendo que este caldo provém a fonte de açúcares necessário para fermentação através das leveduras (RIBEIRO; HORII, 1999). As leveduras utilizadas nesse processo em sua maioria são isoladas nas próprias usinas de açúcar e álcool, e desde 1990 duas linhagens encontradas no estado de São Paulo, são elas, *Saccharomyces cerevisiae* Pedra 2 (PE-2) e *Saccharomyces cerevisiae* Catanduva 1 (CAT-1) que dominam os processos na maioria das usinas brasileiras (BASSO et al., 2011). Contudo cada região possui suas características do solo próprias, afetando o processo e surge a necessidade de buscar novas linhagens de leveduras provenientes das regiões que possuem usinas. Logo a bioprospecção de linhagens selvagens torna-se uma alternativa na busca por leveduras mais adaptadas às condições do local (PACHECO, 2011). Para análise das linhagens pode-se utilizar parâmetros cinéticos, para caracterizar o metabolismo, determinando o consumo do substrato do cultivo e como ocorre seu crescimento (FREIRE; ISHII., 2011).

Pesquisas com a levedura PE-2 demonstraram sua robustez frente aos processos fermentativos e alta produtividade de etanol (BASSO et al., 2008; PEREIRA et al., 2012; LOPES et al., 2016).

Portanto o objetivo deste trabalho foi estudar metabolismo através dos parâmetros cinéticos da linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, e dois isolados selvagens isolado de cama de frango, denominados AVE-I e AVE-II, comparando 4 açúcares (glicose, frutose, sacarose, galactose) ( $10\text{gxL}^{-1}$ ) como fontes únicas de carbono e um mix (glicose e frutose) ( $5\text{gxL}^{-1}$ ) na temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  em aerobiose.

## **2.2 Revisão de Literatura**

### **2.2.1 Etanol**

O interesse por fontes alternativas de combustíveis vem aumentando cada vez mais devido ao aumento dos preços dos combustíveis fósseis e a alta carga de poluição que os mesmos geram, especialmente após as crises do petróleo, nos anos 1970, a busca por fontes alternativas de energia se tornou centro do cenário mundial (COSTA et al., 2005).

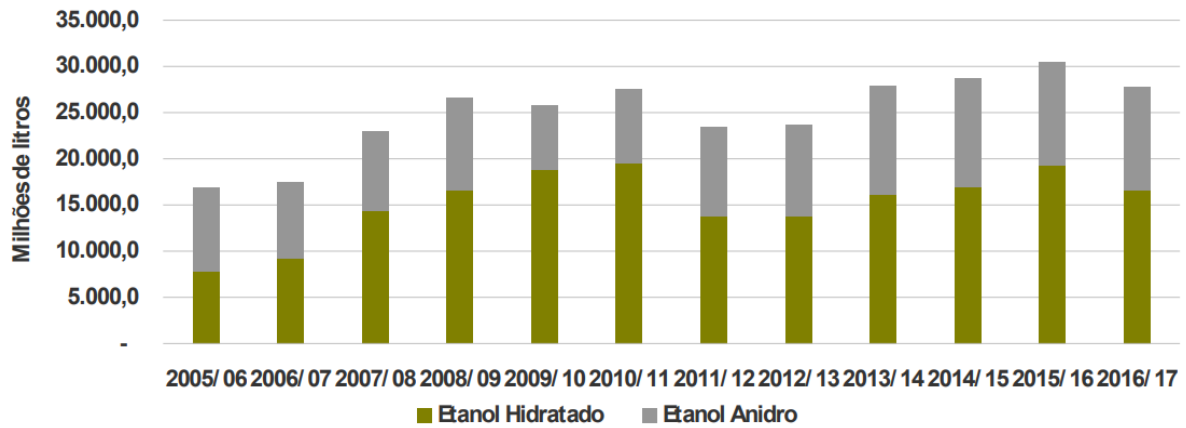
No Brasil, o principal movimento foi a implantação do Programa Proálcool, embora fosse iniciativa do governo, acabou por realizar graças à iniciativa privada e foi responsável pelo surgimento de grande parte das usinas do setor sucroenergético existentes no país (PALOMINO, 2009). A fim de reduzir sua dependência do petróleo importado, este programa tornou compulsória a mistura de 20% do álcool anidro à gasolina. O álcool hidratado foi usado como substituto à gasolina, sendo utilizado em veículos com motor a álcool. O Proálcool propiciou o rápido crescimento da produção de cana-de-açúcar e a venda de álcool combustível em todo o país, graças a pesados subsídios nesta primeira fase do programa (GIMENEZ et al, 2018).

Portanto o etanol possui extrema importância para o desenvolvimento do Brasil, pois diminui o preço do combustível, aumentando sua octanagem e reduzindo sua emissão de poluentes (CONAB, 2017).

Na safra 2016/2017 a produção total de etanol no Brasil foi de aproximadamente 27 milhões de litros, sendo 16 milhões de litros de etanol hidratado (95,1% e 96% de etanol, utilizado como combustível) e 11,07 de etanol anidro (99,6% etanol misturado a gasolina), 1,2% inferior à safra passada (Figura 1). Mesmo com o aumento do consumo de gasolina em 2016, o ótimo preço do açúcar incentivou a produção do mesmo, sendo o etanol anidro mais interessante devido a oferta de preços. A região Centro-Oeste foi a segunda maior produtora com 29,6% da produção total, atrás da região Sudeste que produziu 59,5% do total de etanol na safra 2016/2017 (Figura 2). Na região Centro-Oeste o estado do Mato Grosso do Sul é o segundo maior em produção total de etanol (Figura 3) (CONAB, 2017).

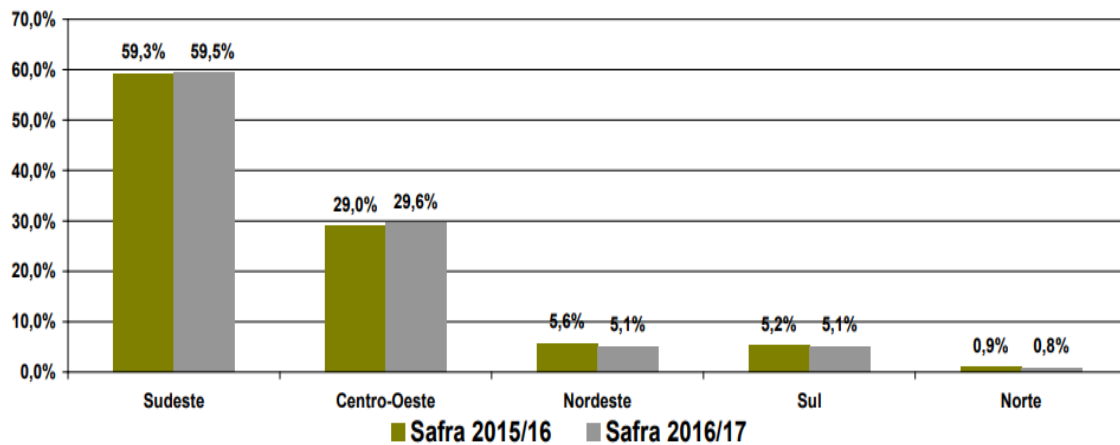


**Figura 1. Série histórica da produção de etanol hidratado e anidro**



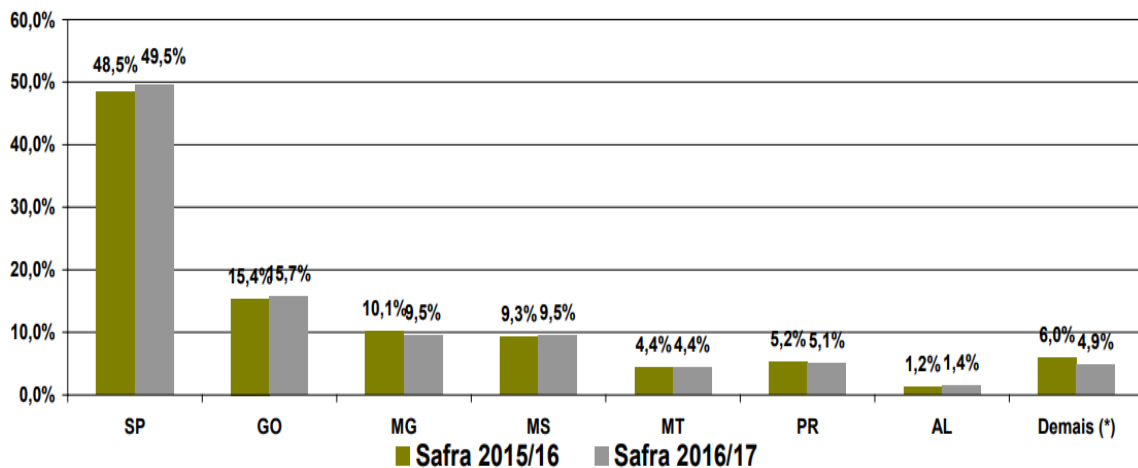
Fonte: Conab (2017).

**Figura 2. Produção de etanol total por região**



Fonte: Conab (2017).

**Figura 3. Produção de etanol total por Unidade da Federação**



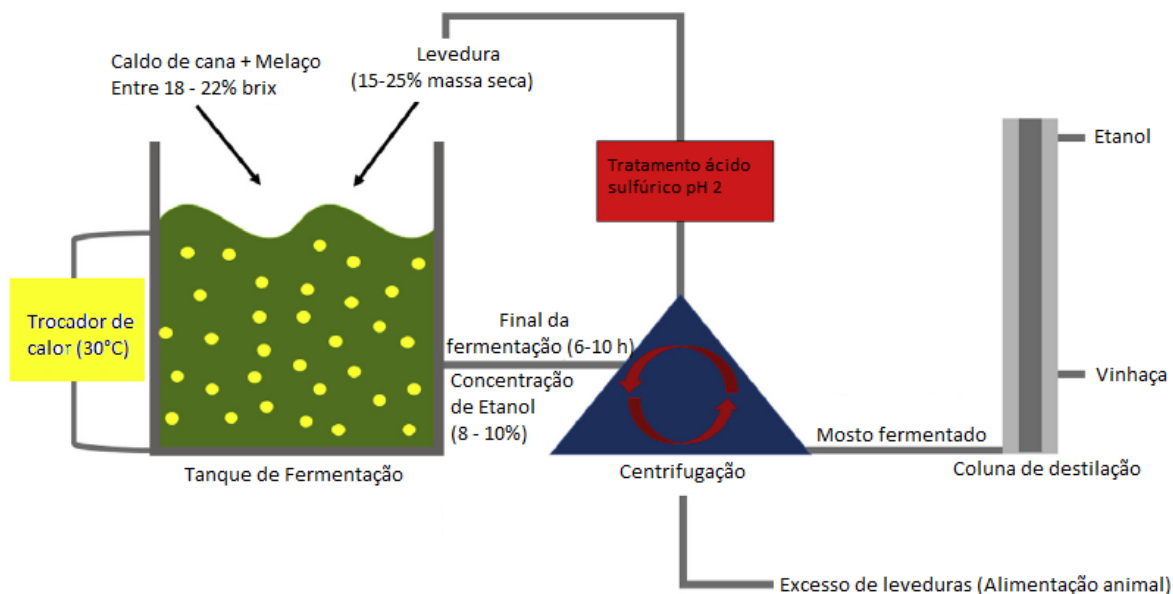
Fonte: Conab (2017).

## 2.2.2 Modelo de produção de etanol no Brasil

O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), também chamado álcool etílico, pode ser produzido por meio de duas vias, na primeira via, denominada química ou petroquímica, o etanol é obtido a partir da hidratação do eteno. Na segunda, a via bioquímica, o etanol (também denominado bioetanol) é obtido via fermentativa de biomassa agrícola (cana de açúcar), utilizando leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. As destilarias alcoólicas brasileiras operam com o sistema de fermentação denominado "Melle-Boinot", nos quais as leveduras são recicladas por fermentações consecutivas (LIMA. et al., 2001).. Depois cada ciclo da fermentação, o caldo fermentado é centrifugado e separado das células de leveduras no qual são concentradas em creme enquanto o caldo é levado para destilação. Após o tratamento com água diluída em ácido sulfúrico (pH 2.0-2.5 por 1-2 h), as células de leveduras retornam para os tanques (250-3000 L) para um novo ciclo de fermentação (AMORIM, et al., 2011).

O modelo de produção de etanol utilizado no Brasil segue as operações unitárias demonstradas na figura 4.

Figura 4. Esquema da produção de etanol na usina

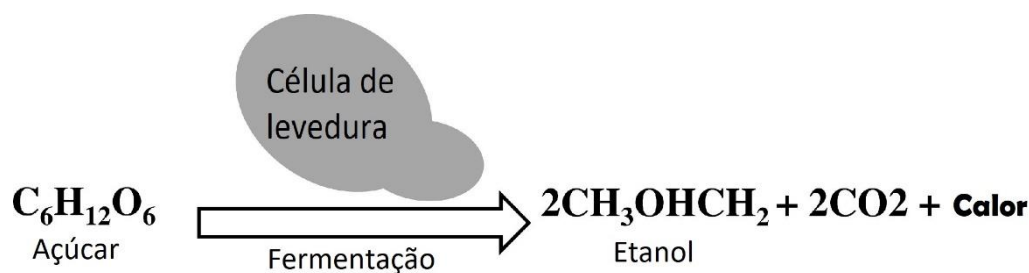


Fonte: Ferreira (2008).

O mosto da cana de açúcar é o substrato mais utilizado na indústria, sua composição apresenta alta concentração de sacarose, a levedura inicia o processo com a hidrólise dessa sacarose pela enzima invertase, uma proteína de membrana codificada pelo gene *SUC2* (BASSO et al., 2011). Essa reação produz os monossacarídeos glicose e frutose, a molécula de glicose, que contém 6 carbonos é hidrolizada, produzindo duas moléculas de piruvato, duas moléculas de NADH e duas de ATP, o piruvato perde o grupo carboxila, através da enzima piruvato

descarboxilase, gerando acetaldeído e CO<sub>2</sub> logo após o acetaldeído é reduzido a etanol (NELSON; LEHNINGER; COX, 2014) (Figura 5).

**Figura 5. Produção de etanol pela célula de levedura**



Legenda: Esquema ilustrado para mostrar a produção de etanol através da fermentação quando a glicose é usada como substrato.

**Fonte:** Nandy e Srivastava (2018).

### 2.2.3. Leveduras

A linhagem de microrganismo mais utilizada nos processos fermentativos é *Saccharomyces cerevisiae*, cultura pioneira na indústria de etanol, porém devido à alta pressão e difícil controle da assepsia, são encontradas diferentes linhagens de microrganismos no final do processo (BASSO et al., 2011). As leveduras utilizadas na fermentação fazem diferença no rendimento final, devido à características como: rápida capacidade de fermentação, estabilidade genética, tolerância osmótica, alta tolerância a etanol e alta produtividade de etanol, viabilidade celular. Linhagens selvagens presentes no caldo de cana, se mantêm no processo e se tornam resistentes as pressões do processo (ZABED et al., 2014).

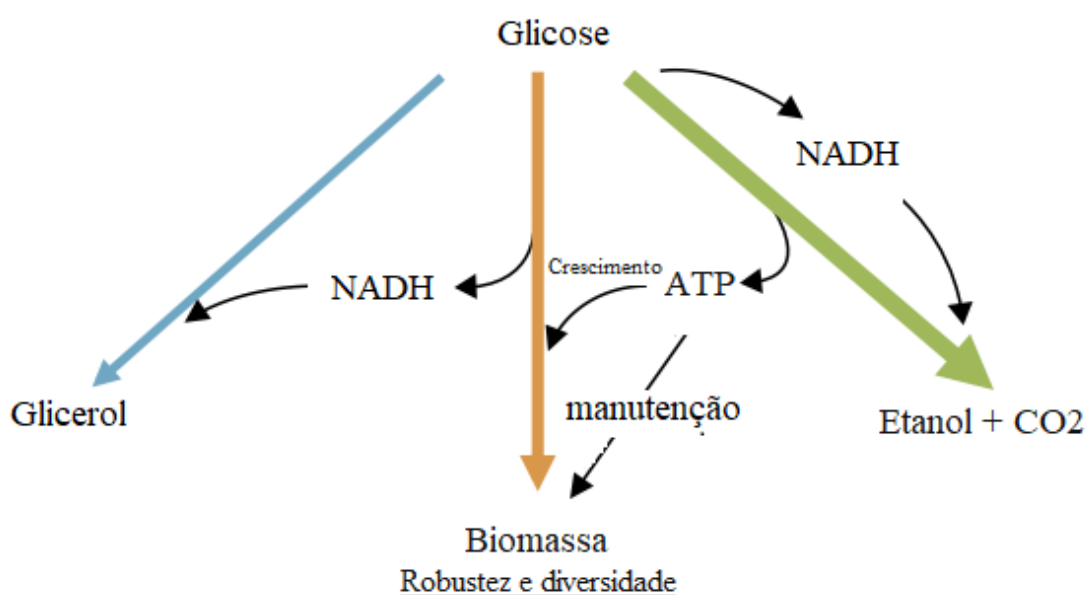
No Brasil seis linhagens de leveduras industriais predominam no cenário de produção de etanol, são as linhagens Pedra (PE-2), Catanduva (CAT1), FT858L e Fermel®(Fermentec), BG1 e SAT1 (CTC). Juntas elas são responsáveis por 70% da produção de etanol no país (LOPES et al., 2016). As linhagens CAT-1 e PE-2 foram isoladas no final da década de 1990 e se destacam, devido sua elevada capacidade fermentativa, suportando as altas concentrações de açúcares e alta produtividade de etanol (BASSO et al., 2011).

Como essas leveduras foram selecionadas no estado de São Paulo, são adaptadas as condições climáticas da região favorecendo o processo. No estado do Mato Grosso do Sul as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mais utilizadas são, CAT-1, PE-2 e Fleishmann em aproximadamente 70% das usinas (BATISTOTE et al., 2010). Porém visto que cada estado possui suas condições climáticas específicas, a utilização de linhagens de leveduras isoladas na região pode favorecer a produção de etanol, logo o investimento na bioprospecção de linhagens selvagens regionais é necessário (PACHECO, 2011). Para selecionar e testar linhagens selvagens é necessário conhecer o metabolismo dessas linhagens frente à diferentes açúcares e condições de cultivo (OKPOKWASILI; NWEKE, 2005).

#### 2.2.4. Metabolismo de leveduras

Na busca por linhagens selvagens com objetivo de produzir etanol, os principais substratos que esses microrganismos utilizam são os monossacarídeos glicose, frutose e o dissacarídeo sacarose (NELSON; LEHNINGER; COX, 2014). Em aerobiose a célula utiliza todo substrato disponível para produção de energia e conseqüentemente. A glicose é a molécula mais utilizada para produção de energia, pois fornece variedades de intermediários metabólicos em reações biosintéticas e seu consumo é prioritário para obtenção de energia e produção de metabólitos (Figura 6) (GOMBERT; VAN MARIS, 2015).

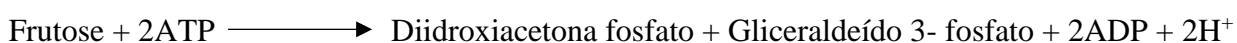
Figura 6. Fluxograma mostrando a versatilidade da molécula de glicose.



Legenda: Representação esquemática da distribuição de açúcar para produção de etanol, formação de biomassa de levedura e formação de glicerol como subproduto.

Fonte: Gombert; Van Maris (2015)

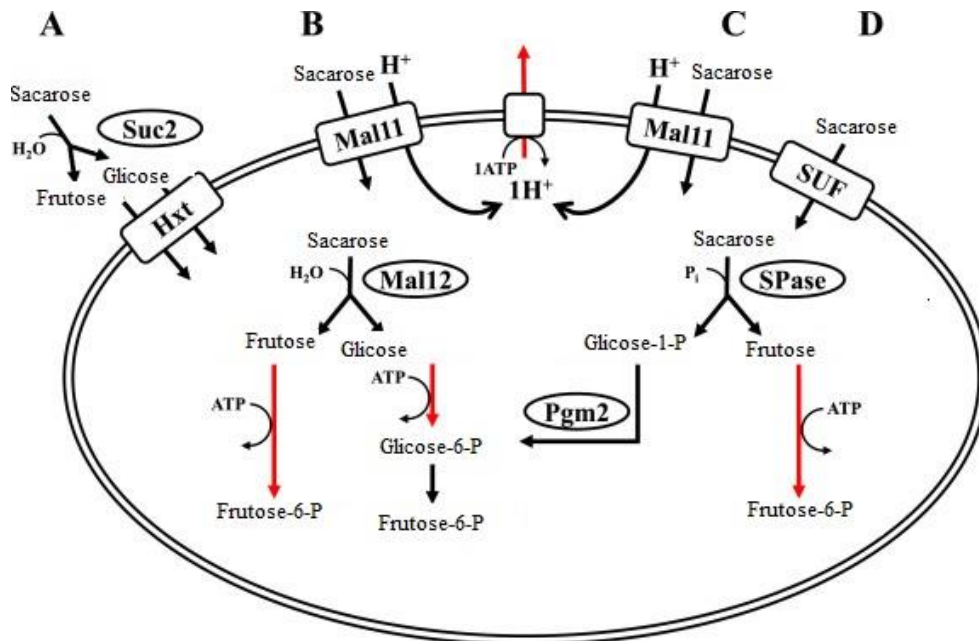
Tanto a frutose quanto a glicose são metabolizadas pela via glicolítica, a frutose é convertida, entrando na via glicolítica como uma molécula intermediária, como é mostrado abaixo (MARZZOCO; TORRES, 2007.)



A sacarose é um dissacarídeo e necessita ser hidrolisada para ser consumida pela célula, esse processo pode ocorrer intra ou extra celularmente (Figura 7). Algumas leveduras possuem a capacidade de transportar a molécula de sacarose para dentro da célula através de uma proteína transportadora (co-transporte com prótons  $\text{H}^+$ ) (STAMBUK et al., 2000). Em condições

favoráveis ao microrganismo a sacarose é hidrolisada fora da célula e tem a passagem da glicose e frutose por difusão facilitada (STAMBUK et al., 2000).

**Figura 7. Representação esquemática de diferentes estratégias para a absorção e hidrólise da sacarose.**



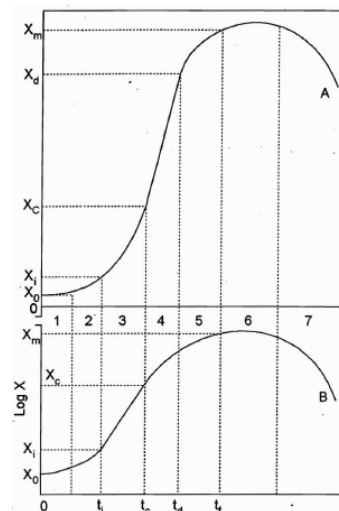
Legenda: A) Hidrólise extracelular da sacarose, facilitada pela invertase externa Suc2, seguida de difusão facilitada dos monossacarídeos. B) Captação de sacarose através do simulador de prótons Mal11, seguido da exportação do próton e da hidrólise intracelular da sacarose catalisada por Mal12 pelo ATP. C) Captação de sacarose através do simulador de prótons Mal11, seguido da exportação do próton e da fosforilase intracelular da sacarose catalisada pela sacarose fosforilase (SPase). D) Captação de sacarose via difusão facilitada usando um facilitador de sacarose (SUF), seguido por fosforilase intracelular de sacarose catalisada por SPase. Em vermelho: etapas metabólicas que requerem hidrólise de ATP  
 Fonte: MARQUES et al., (2018)

### 2.2.5. Parâmetros cinéticos

Para entender como as leveduras se comportam durante a fermentação nas usinas de álcool, alguns estudos são utilizados para compreender seu metabolismo. Um desses estudos é o estudo dos parâmetros cinéticos. A palavra cinética significa o estudo da velocidade, mecanismos e fatores que determinam e influenciam as reações bioquímicas (MICHAELIS, 2018). É uma ferramenta matemática, que possibilita a análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação (LIMA et al, 2001).

Os parâmetros cinéticos são realizados baseados no crescimento microbiano observando suas fases de crescimento, exponencial, estacionária e morte (Figura 8).

**Figura 8. Curva de crescimento do microrganismo cultivado em processo descontínuo**



Fonte: Lima et al (2001). Legenda: Representação em ordenadas lineares (a) e semilogarítmica (b). 1 – Fase *lag*. 2 – Fase de transição. 3 – Fase *log*. 4 – Fase linear do crescimento. 5 – Fase de desaceleração. 6 – Fase estacionária. 7 – Fase de declínio ou morte.

A partir do crescimento microbiano são calculados parâmetros como produtividade de etanol, consumo do substrato, velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), produção de biomassa ao final do processo, produtividade celular ( $P_{\text{cel}}$ ) que são imprescindíveis para caracterizar o metabolismo dos microrganismos em estudo.

## **2.3. OBJETIVOS**

### **2.3.1 Objetivo geral**

Estudar o metabolismo via parâmetros cinéticos e consumo de açúcares das leveduras, sendo uma linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e dois isolados selvagens denominados AVE-I e AVE-II.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Analisar o metabolismo da linhagem industrial PE-2;
- Estudar o metabolismo da isolado selvagem AVE-I e AVE-II;
- Comparar o desempenho dos isolados selvagens em comparação a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, em relação a micro e macro morfologia, parâmetros cinéticos e consumo de substrato.

## 2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.4.1 Análise Micro e Macro morfologia

As leveduras foram cultivadas em meio líquido contendo meio YPD (extrato de levedura, 10 g×L<sup>-1</sup>; peptona, 20 g×L<sup>-1</sup>; glicose, 20 g×L<sup>-1</sup>) a 30°C por 24 h, então foram realizadas 5 diluições seriadas (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>) e estriadas em placas contendo meio YPD e incubadas placas por 72h. Após foram submetidas e visualizadas em microscópio óptico com aumento de 1000x, sendo analisadas seu formato, presença de brotamento e tamanho de células. As análises macro morfológicas foram realizadas a partir das placas de diluição 10<sup>-5</sup> e observadas com lupa considerando parâmetros como pigmentação, borda, textura.

### 2.4.2 Microrganismos e manutenção

Utilizou-se como padrão a levedura industrial *S. cerevisiae* Pedra-2 (PE-2), cedida pelo Usina São Fernando (Dourados – MS), outras duas leveduras selvagens foram utilizadas, a levedura AVE-I e AVE-II isoladas em cama de frango na região de Dourados-MS. Os isolados foram escolhidos baseados na sua alta produtividade em etanol durante o cultivo em caldo de cana observados em estudos prévios (NEVES., 2014).

. As leveduras foram mantidas em meio YPD (ágar 15 g×L<sup>-1</sup>, extrato de levedura, 10 g×L<sup>-1</sup>; peptona, 20 g×L<sup>-1</sup>; glicose, 20 g×L<sup>-1</sup>) e óleo mineral na temperatura de 4°C.

### 2.4.3 Meio de cultura e condições de cultivo

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio mineral (VERDUYN et al., 1992). O meio mineral continha por litro de água destilada: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5,0g); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,0g); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5g); foi adicionado 200 mL.

Além da adição de 1 mL de elementos-traço de EDTA (15mg); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (4,5mg); MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, (0,84mg); CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, (0,3mg); CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, (0,3mg); Na<sub>2</sub>.MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, (0,4mg); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, (4,5mg); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (3,0mg); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, (1,0mg); KI, (0,1mg). O pH do meio foi ajustado para 6,0 com NaOH antes de ser autoclavado (121°C/20 min) e resfriado a temperatura ambiente. Uma solução-estoque filtrada de vitaminas foi preparada a uma concentração final por litro de água desmineralizada de: D-biotina (0,05mg); pantotenato de cálcio (1,0mg); ácido nicotínico (1,0mg); mio-inositol (25mg); cloreto de tiamina(1,0mg); cloreto de piridoxol (1,0mg); e ácido para-aminobenzóico, (0,20mg) sendo adicionada 1 mL ao meio mineral.

As fontes de carbono utilizadas foram: glicose, frutose, sacarose, e galactose (10 g×L<sup>-1</sup>), e um mix de glicose e frutose (5g×L<sup>-1</sup> de cada) sendo autoclavadas separadamente e adicionadas assepticamente ao meio.



Para o pré-inóculo 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, adicionado a fonte de carbono testada e vitamina, levados a incubador rotativo orbital a 200 rpm, a 30°C em aerobiose entre 12 a 24 horas dependendo do tempo em que cada microrganismo atingisse a densidade óptica de  $\pm 4$  no comprimento de onda 600 nm, valor mínimo para iniciar o experimento.

Após este período, fez-se o inóculo em um novo frasco. Sendo adicionado este novo frasco meio mineral, a fonte de carbono testada, a vitamina e uma alíquota do pré-inóculo para que a densidade óptica inicial ( $OD_{600nm}$ ) fosse 0,1. Os cultivos principais foram realizados em condições idênticas ao pré cultivo com  $DO_{600nm}$  inicial de 0,1. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

#### **2.4.4 Amostragens e preparo das amostras**

Amostragem foram realizadas a cada 30 minutos (retirando-se 4 mL por amostragem). Destes, 2 mL foram utilizados para leitura da densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ), seguida de diluições (quando necessário) e os outros 2 mL restantes foram centrifugados (17,609 xg, 5 min., 4°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.

#### **2.4.5 Determinação da biomassa**

O sedimento de biomassa obtido após centrifugação da amostra foi seco em estufa (75°C) até peso constante. A massa celular seca ( $g \times L^{-1}$ ) 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. Os valores de absorvância medidos foram convertidos em valores de massa utilizando uma relação linear (unidades DO por grama de biomassa seca) determinada para cada experimento.

#### **2.4.6 Determinação de parâmetros cinéticos**

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 ( $\mu_{max}$ ) foi determinada como a inclinação desta reta e o tempo de duplicação (TD) pelo quociente do  $\ln(2)$  pelo  $\mu_{max}$ . A concentração máxima de biomassa ( $X_{max}$ ) foi obtida através de curva de calibração. A produtividade celular foi obtida através equação 1:

$$P_{cel} = \frac{X_f - X_i}{t} \quad \text{Equação 1}$$

$P_{cel}$ = produtividade celular  $X_f$ = biomassa final  $X_i$ = biomassa inicial  $t$ =tempo total

### 2.4.7 Determinação do consumo de açúcares

Para determinação dos açúcares foram realizados 3 procedimentos:

Para determinação de glicose foi utilizado o método de glicose-oxidase com sensor eletrônico para glicemia, com leitura em mgxdL. Frutose foi determinada pela quantificação de açúcares redutores pelo método DNS e descontado o valor de glicose. Para o dissacarídeo sacarose foi necessário realizar uma digestão ácida para determinação dos açúcares redutores totais (glicose e frutose gerados a partir da digestão da sacarose) descontada a quantidade de glicose e frutose iniciais.

Segue abaixo a equação para exemplificar a metodologia:

Glicose = Glicose Oxidase;

Frutose = DNS\* – Glicose

Sacarose = DNS do Hidrolisado\*\* – DNS\*

\*DNS = Glicose + Frutose

\*\*DNS do Hidrolisado = Glicose + Frutose + (Glicose + Frutose provenientes da sacarose).

#### 2.4.7.1 Método Glicose Oxidase

Foi utilizado o método glicose oxidase a partir de um aparelho medidor de glicemia da marca ACCU-CHEK Active® (ROCHE DIAGNOSTICA BRASIL, 2003) para quantificar o nível de glicose no meio. Utilizando tiras que eram introduzidas no aparelho e posteriormente adicionadas 5µL de amostra e inseridas no leitor no qual mostrava o valor de glicose em mgxdL.

#### 2.4.7.2 Hidrólise da sacarose

A hidrólise da sacarose foi feita utilizando a metodologia proposta por Vasconcelos et al. (2013). Foram pipetados 100 µL de cada amostra e diluídos em 900 µL de água destilada, adicionado 1 mL de HCl (ácido clorídrico 2N) com reação em banho de ebulição por 10 minutos, logo após, os tubos foram resfriados em banho com gelo durante 10 minutos e em seguida adicionados 1 mL de NaOH (2N). Foi retirado 1 mL dessa solução de hidrólise e separado para reação de DNS. A quantidade de sacarose presente no meio foi calculada considerando os fatores de diluição.

### **2.4.7.3 Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS**

Para quantificar o consumo do substrato foi utilizado a metodologia para determinação de açúcares redutores por DNS adaptada de Miller (1959), por Vasconcelos et al. (2013).

Primeiro a curva padrão de açúcar foi realizada utilizando uma solução padrão de frutose  $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  diluída para atingir uma concentração de  $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  até  $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Foram retirados  $100 \mu\text{L}$  de cada amostra e diluídos em  $900 \mu\text{L}$  de água destilada, posteriormente foi adicionado  $1 \text{ mL}$  de DNS, agitado e colocado em banho de ebulição por 5 minutos, e resfriado por 5 minutos em banho de gelo, depois foram adicionados  $16 \text{ mL}$  de tartarato duplo de sódio e potássio  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Para leitura dos resultados foi utilizado espectrofotômetro a  $540 \text{ nm}$  utilizando como branco uma solução de água e DNS. Para o cálculo da concentração da amostra foi utilizada a curva padrão. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

### **2.4.8 Análise estatística**

Os resultados dos testes fermentativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% utilizando o programa Assistat (SILVA; AZEVEDO,2002).

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.5.1 Análise Micro e Macro Morfológica

As três linhagens foram analisadas quanto suas características micro e macro morfológicas, conforme Tabela 1.

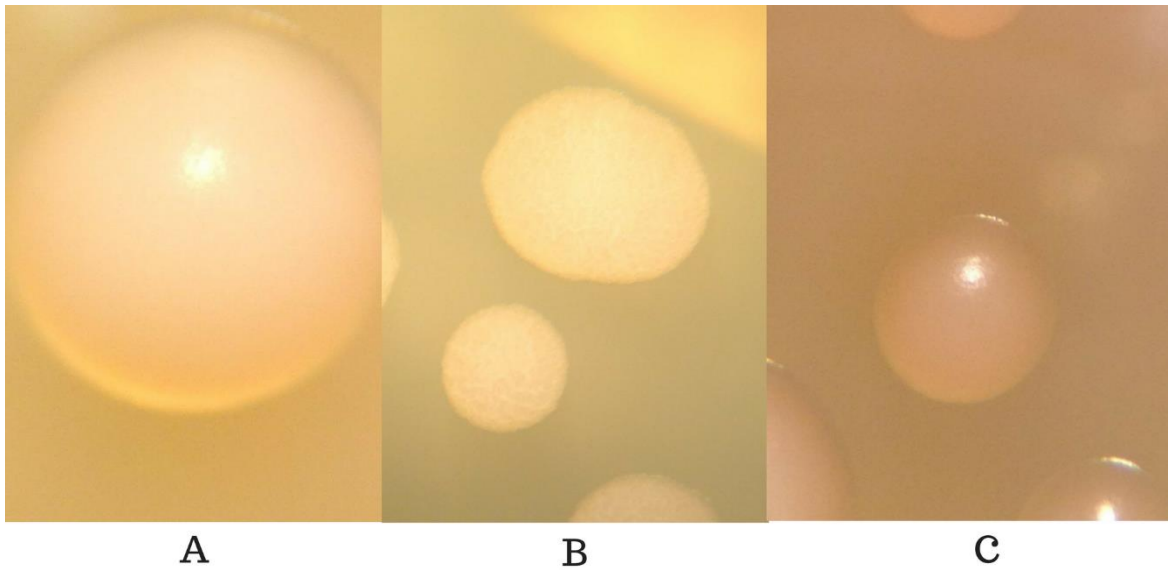
**Tabela 1. Análises morfológica das linhagens de leveduras estudadas.**

Levedura	Micromorfologia			Macromorfologia		
	Formato	Tamanho	Brotamento	Pigmentação	Borda	Textura
PE-2	Oval	Media	Sim	Creme	Regular	Lisa/brilhante
AVE-I	Alongada	Grande	Sim	Branca	Irregular	Rugosa/opaca
AVE-II	Oval	Grande	Sim	Creme	regular	Lisa/opaca

Fonte: O autor.

A linhagem PE-2 conhecida por ser uma *Saccharomyces cerevisiae*, apresentou formato oval, tamanho médio e presença de brotamento, diferentemente do isolado selvagem AVE-I que apresentou características morfológicas como formato alongado, pigmentação branca e borda irregular com textura rugosa.

**Fotografia 1. Macromorfologia das leveduras**



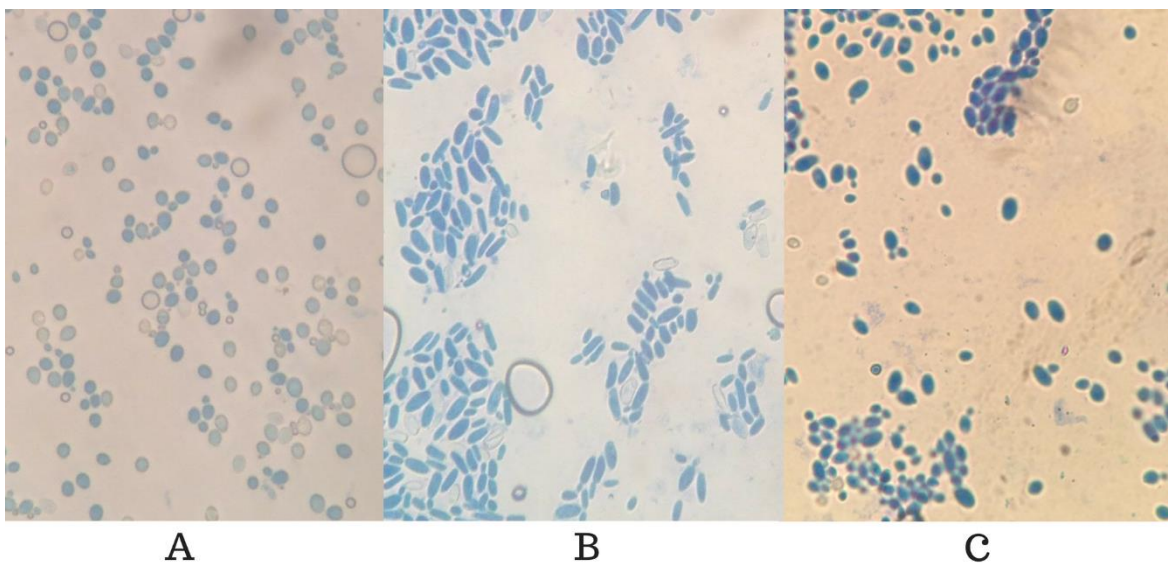
Legenda: A – PE-2 B – AVE-I C- AVE-II

Fonte: o autor (2018).

Devido a micromorfologia (Fotografia 2) alongada e macromorfologia rugosa do isolado AVE I, indica uma levedura do gênero não *Saccharomyces*.

A linhagem PE-2 apresentou micromorfologia oval tipo “*lemon shaped*” típica de *S. cerevisiae* e o isolado AVE-II micromorfologia elíptica. Ambas apresentaram aspecto de colônia lisa. (Fotografia 1).

**Fotografia 2. Micromorfologia das leveduras**



Legenda: A – PE-2 B – AVE-I C- AVE-II

Fonte: o autor

## 2.5.2 Parâmetros cinéticos

A tabela 2 apresenta todos os parâmetros cinéticos para as linhagens estudadas.

**Tabela 2. Cultivos realizados com as linhagens PE-2, AVE-I e AVE-II em diferentes fontes de carbono na temperatura de 30°C.**

Parâmetro	Substrato	Leveduras		
		PE-2	AVE-I	AVE-II
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Glc	0,41 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>a</sup>
	Frut	0,36 ± 0,12 <sup>bc</sup>	0,47 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>bc</sup>
	Sac	0,37 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,34 ± 0,00 <sup>ab</sup>
	Gal	0,27 ± 0,00 <sup>d</sup>	-	0,27 ± 0,00 <sup>d</sup>
	Glc Fru	0,35 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,47 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,00 <sup>c</sup>
TD (H)	Glc	1,68 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,38 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,09 <sup>d</sup>
	Fru	1,89 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,08 <sup>bc</sup>
	Sac	1,83 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,39 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,99 ± 0,00 <sup>cd</sup>
	Gal	2,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	-	2,56 ± 0,00 <sup>a</sup>
	Glc Fru	1,93 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,01 <sup>b</sup>
P <sub>cel</sub> (gMCS×L <sup>-1</sup> ×h <sup>-1</sup> )	Glc	0,11 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>a</sup>
	Fru	0,10 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>b</sup>
	Sac	0,15 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>
	Gal	0,11 ± 0,02 <sup>b</sup>	-	0,144 ± 0,00 <sup>b</sup>
	Glc Fru	0,08 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,21 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>c</sup>
X <sub>max</sub> (g×L <sup>-1</sup> )	Glc	1,61 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,39 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,02 <sup>a</sup>
	Frut	1,44 ± 0,01 <sup>bc</sup>	2,19 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,11 <sup>b</sup>
	Sac	2,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,48 <sup>b</sup>	2,67 ± 0,22 <sup>a</sup>
	Gal	2,03 ± 0,04 <sup>a</sup>	-	2,69 ± 0,03 <sup>a</sup>
	Glc Fru	1,11 ± 0,02 <sup>c</sup>	2,48 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,03 <sup>b</sup>

Fonte: o autor

Legenda: Glc glicose, Fru frutose, Sac sacarose, Gal galactose, X<sub>max</sub> concentração máxima de células,  $\mu_{\max}$  velocidade específica máxima de crescimento, TD tempo de duplicação, P<sub>cel</sub> produtividade em células, MCS massa celular seca. (-) levedura não apresentou capacidade de crescimento. Letras iguais em uma mesma coluna não apresentam diferença significativa (p>0,05).

O isolado AVE-I apresentou maior  $\mu_{\max}$  em todos os substratos, menos em galactose que não obteve crescimento mínimo para realizar o experimento, nos açúcares glicose, frutose e sacarose foram 0,50, 0,47 e 0,49 h<sup>-1</sup> respectivamente sendo estatisticamente iguais, indicando boa adaptação e possível alta produção de etanol, comparando com a linhagem indústria PE-2

que obteve 0,41  $\mu_{\max}$  no substrato glicose. Além disso apresentou tempo de duplicação estatisticamente igual em todos substratos.

A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 apresentou maior produção de biomassa no substrato sacarose quando comparado aos outros substratos, o que indica que a via da respiração é principal rota indicando, provavelmente, que o efeito *Kluyver* (utilização aeróbia obrigatória de dissacarídeos) esteja presente nas condições de cultivo. Isso é notado observando a curva de crescimento apresentado no (Gráfico 1 - A), que demonstra um menor tempo para atingir na fase exponencial de crescimento quando comparado ao substrato glicose e frutose, explicado pelo fato que a levedura necessita hidrolizar a sacarose antes de consumi-la.

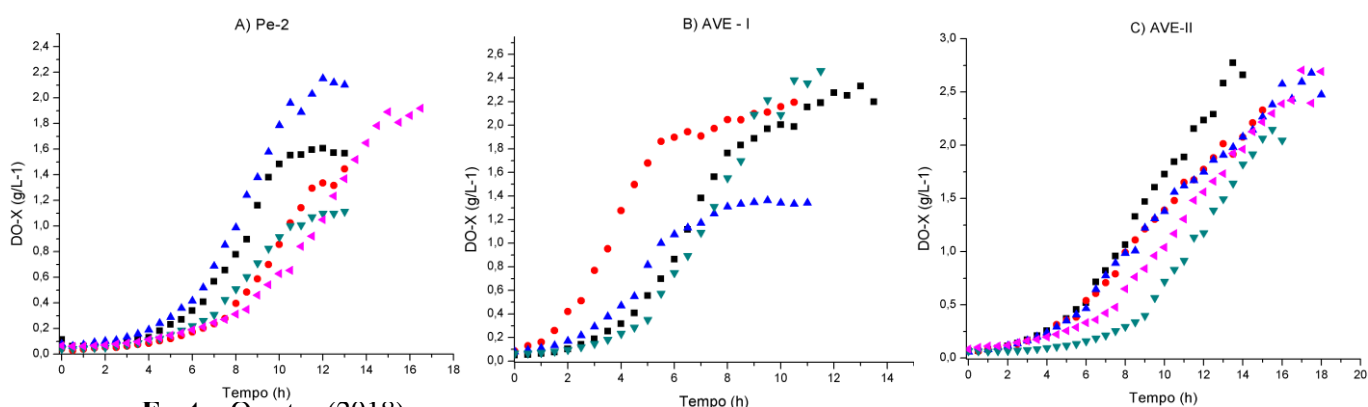
A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, outra levedura que é amplamente utilizado nas indústrias, não apresentou diferença estatisticamente significativa de crescimento entre os substratos glicose (0,44), frutose (0,44) e sacarose (0,45) (NASCIMENTO, 2016), indicando ausência do efeito kluyver para a mesma (VENTURINI-FILHO et al., 2013).

De acordo com Fonseca et al (2013), a glicose e frutose fazem parte do mesmo sistema simporte (vão para a mesma direção) sendo consumidos em paralelo.

Analisando os dados de  $\mu_{\max}$  do isolado AVE-I (Tabela 2), notou-se uma menor taxa de produção de biomassa durante o crescimento no substrato sacarose, para as condições estudadas, indicando uma deficiência na quebra da sacarose ou preferência da via fermentativa com acúmulo de metabólitos como etanol. Nota-se que a fase de adaptação para a frutose é menor (Gráfico 1 – B), o que é notável para a espécie, pois o esperado é que a glicose seja substrato preferencial (NASCIMENTO, 2016).

Durante o crescimento do isolado AVE-II em todos substratos foi observado o maior tempo de adaptação (fase *lag*), essa fase é caracterizada por um período de intensa atividade bioquímica (síntese de enzimas) e termina com a primeira divisão celular (RUSSELL, 2003). A maior produção de biomassa e produtividade de biomassa, indica menor produção de etanol e preferência pela via respiratória (Gráfico 1 - C).

**Gráfico 1. Curva de crescimento das leveduras em diferentes substratos**



Fonte: O autor (2018).

**Legenda:** A) Linhagem PE-2; B) Isolado AVE-I; C) Isolado AVE-II. (▪) Glicose; (●) Frutose; (▲) Sacarose; (▼) Glicose|Frutose; (◄) Galactose

No cultivo utilizando glicose como única fonte de carbono a linhagem PE-2 apresentou menor produção de biomassa e  $\mu_{\max}$   $0,41 \text{ h}^{-1}$  intermediário quando comparada ao isolado AVE-I ( $0,50 \mu_{\max}$ ) e AVE-II ( $0,36 \mu_{\max}$ ), o que corrobora sua preferência pela via fermentativa demonstrado por Basso et al. (2008).

O açúcar galactose foi utilizado na primeira etapa do trabalho com a intenção de diferenciar minimamente as linhagens. Verificou-se que na linhagem AVE-I que apresenta estrutura micromorfológica diferente da PE-2 e AVE-II, o consumo deste açúcar ainda na fase de preparo de inóculo foi tão baixo que não chegou a atingir a quantidade de biomassa necessária para a inoculação no experimento final, assim não foram mais realizadas nenhuma análise com este açúcar.

## 2.5.3 Estudo de consumo de substratos

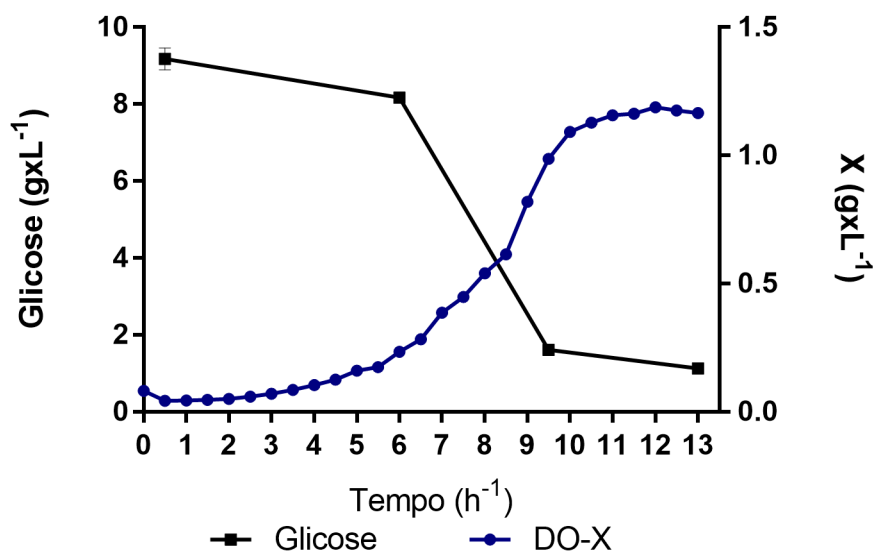
### 2.5.3.1 Glicose

Em relação ao consumo do substrato glicose, com a levedura PE-2, é perceptível que durante a fase *lag* de crescimento que vai até 6 horas de cultivo há pouco consumo do substrato, haja visto que a levedura está se adaptando ao meio e preparando seu maquinário enzimático para fase *log* de crescimento (Gráfico 2).

Durante a fase *log* entre 6 e 10 horas de cultivo ocorre o consumo de 87% do substrato.



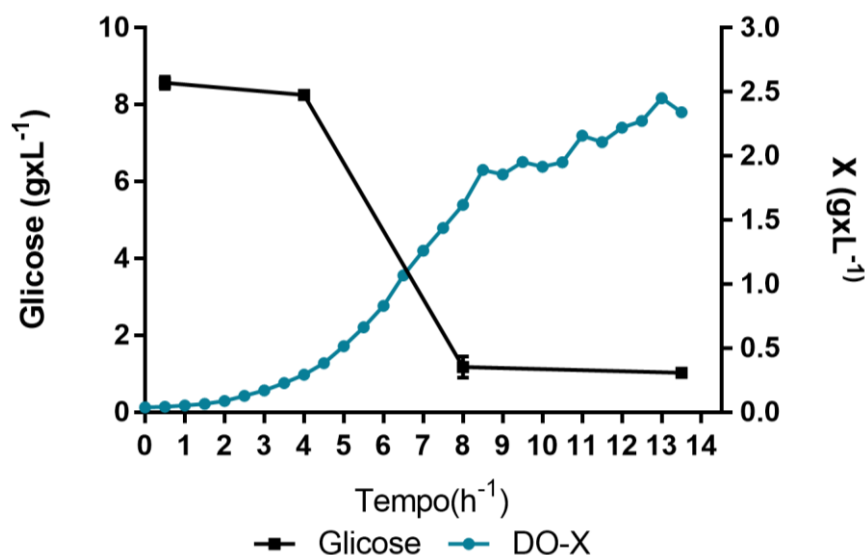
Gráfico 2. Curva de crescimento e consumo do substrato glicose da levedura PE-2



Fonte: o autor (2018).

Ao observarmos a linhagem AVE-I durante o crescimento com substrato único de glicose (Gráfico 3), é perceptível que sua fase exponencial começa com 4 horas e ao chegar a 8 horas de crescimento seu consumo do substrato de 88% que com um residual de aproximadamente 1,05 gxL<sup>-1</sup>.

Gráfico 3. Curva de crescimento e consumo do substrato glicose da levedura AVE-I



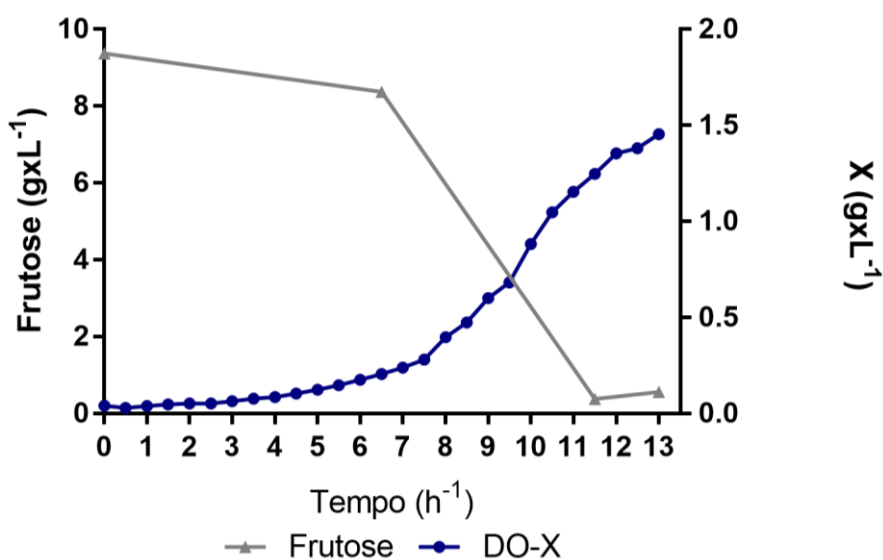
Fonte: o autor (2018).

Para as análises do isolado AVE-II não foi possível realizar os testes de consumo de glicose, pois as amostras foram perdidas durante o processo.

### 2.5.3.2 Frutose

Durante o crescimento utilizando o substrato frutose (Gráfico 4) a levedura PE-2 gera maior acúmulo de biomassa quando comparado à glicose com consumo total de 94%, indicando maior aproveitamento desse substrato em relação à glicose, provavelmente esse fenômeno se explica pela rota dupla de consumo de frutose via frutoquinase e via hexoquinase (NELSON; LEHNINGER; COX, 2014). Outros estudos correlacionam essa alta afinidade para frutose em outras leveduras industriais como a *S. cerevisiae* CAT-1, que demonstrou alta concentração de etanol quando cultivada em mosto de frutas (substratos ricos em frutose) (DUARTE et al., 2010; BATISTOTE et al., 2010).

Gráfico 4. Curva de crescimento e consumo do substrato frutose da levedura PE-2

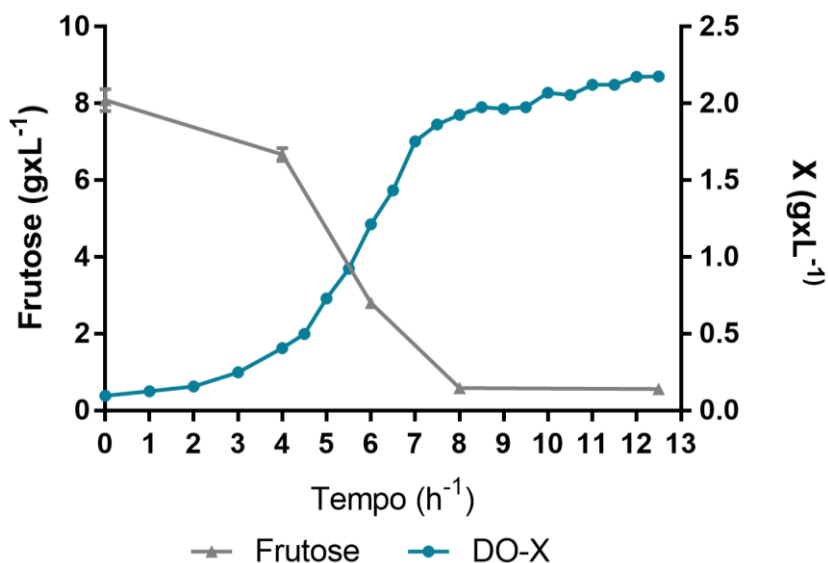


Fonte: o autor (2018).

No cultivo com frutose como única fonte de substrato (Gráfico 5) com o isolado AVE-I, o início da fase exponencial ocorre com 4 horas de cultivo e, com 8 horas, 93% do substrato foi consumido gerando uma maior produção de biomassa quando comparada a linhagem PE-2, a hipótese de consumo preferencial formulada para PE-2 vale também para esta linhagem.

Na fase exponencial as leveduras PE-2 e AVE-I apresentam curvas acentuadas de crescimento e consumo do substrato, tendo uma condição favorável ao seu metabolismo, sua formação de metabólitos celulares é máxima (SCHMIDELL; FACCIOTI, 2001).

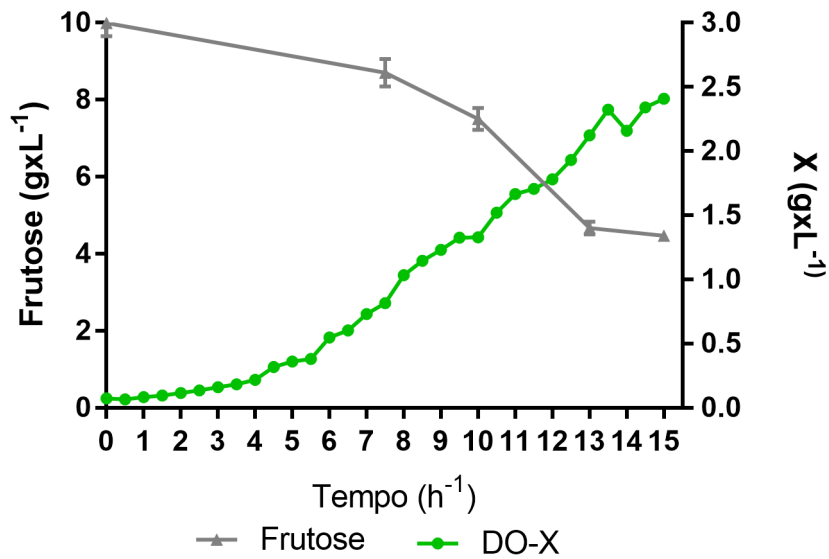
Gráfico 5. Curva de crescimento e consumo do substrato frutose da levedura AVE-I



Fonte: o autor (2018).

O isolado AVE-II durante o cultivo de utilizando frutose apresentou uma curva de crescimento mais longa, observada pela quantidade de horas de cultivo e mesmo com 15 horas de cultivo o substrato não foi totalmente metabolizado perceptível após 13 horas de consumo, pois restou  $4,45 \text{ gL}^{-1}$  no meio de cultivo, assim só consumiu 54% do total de açúcar (Gráfico 6). A baixa velocidade de crescimento explica o baixo consumo de frutose, mas a alta biomassa mostra uma capacidade de conversão de biomassa muito superior às outras duas linhagens, sendo essa mais interessante para essa finalidade. Isso também pode ser um indicativo indireto de que a linhagem não é muito eficiente para a produção de álcool (THATIPAMALA; ROHANI., 1992).

Gráfico 6. Curva de crescimento e consumo do substrato frutose da levedura AVE-II

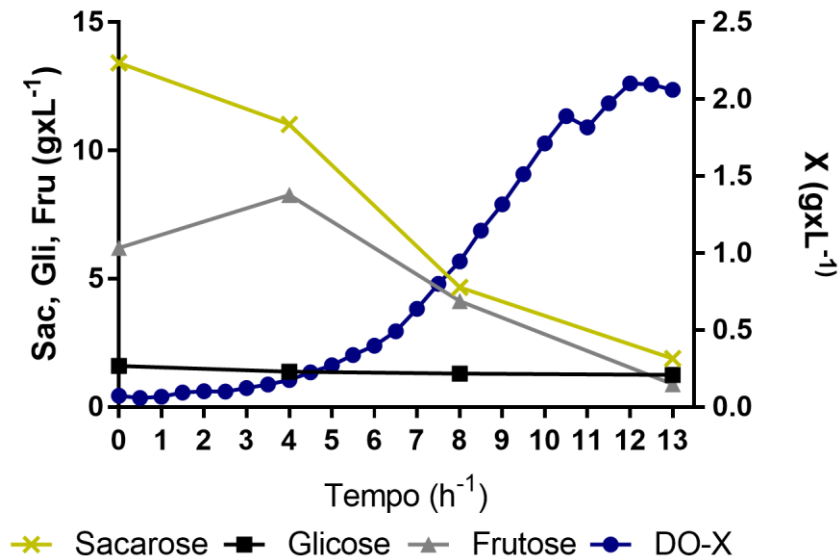


Fonte: o autor (2018).

### 2.5.3.3 Sacarose

A linhagem PE-2 apresentou durante a fase *lag* um consumo preferencial de glicose e uma alta quebra da sacarose, demonstrado no Gráfico 7.

Gráfico 7. Curva de crescimento e consumo do substrato sacarose da levedura PE-2



Fonte: o autor (2018).

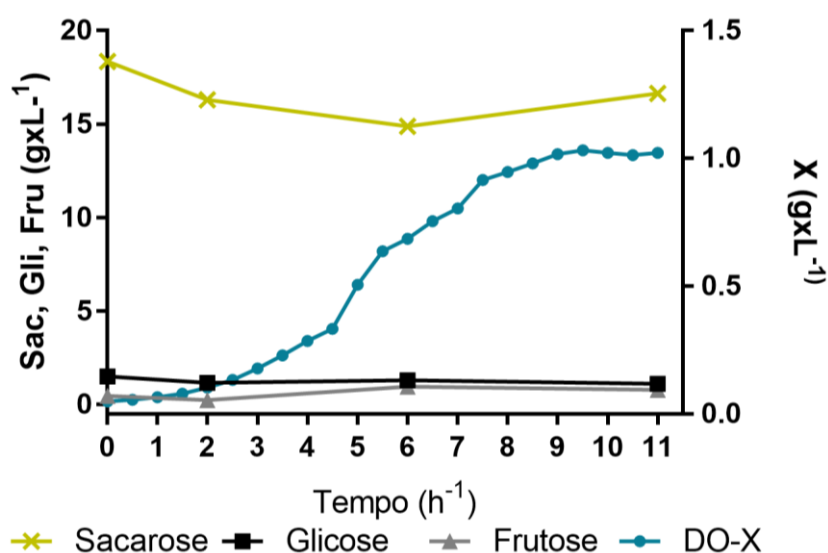
Durante a fase de crescimento exponencial consumiu ambos açúcares pela evidente quebra da sacarose demonstrado pela queda da curva de sacarose.

Na fase estacionária ocorreu uma redução na quebra da sacarose e aumento do consumo de frutose em relação ao de glicose (ECHEGARAY, et al., 2000).

O diferencial dessa linhagem é que durante a fase de metabolismo intenso, ela consegue metabolizar dois açúcares igualmente. O isolado AVE-I demonstrou, durante a fase *lag*, um consumo semelhante de glicose e frutose e elevada quebra de sacarose assim como a PE-2 (Gráfico 8).

Na fase de crescimento exponencial ocorreu uma redução da quebra da sacarose, evidenciado pela estabilização da concentração da sacarose, com consequente aumento da concentração de frutose, indicando aumento do consumo de glicose. Na fase estacionária a quebra de sacarose diminuiu e o consumo semelhante de glicose e frutose, parece cessar indicado pela queda quase imperceptível na curva. Entretanto o aumento de aproximadamente  $0,3 \text{ gL}^{-1}$  de 6 a 10 horas indica que existe consumo de alguma fonte de carbono.

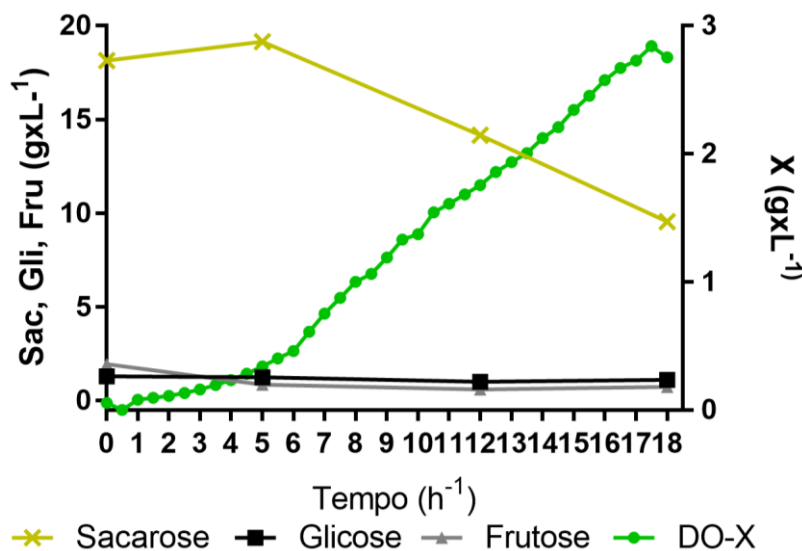
Gráfico 8. Curva de crescimento e consumo do substrato sacarose da levedura AVE-I



Fonte: o autor (2018)

O Gráfico 9 mostra que o isolado AVE-II durante a fase *lag*, demonstrou consumo preferencial de frutose e baixa quebra de sacarose. Durante a fase estacionária o consumo de ambos açúcares na mesma velocidade e menor velocidade de quebra da sacarose. Pode-se verificar que o comportamento da linhagem para os açúcares glicose e frutose se repete também para sacarose, com acúmulo de muita biomassa e baixo consumo de sacarose, com alta quantidade de açúcar residual.

Gráfico 9. Curva de crescimento e consumo do substrato sacarose da levedura AVE-II



Fonte: o autor

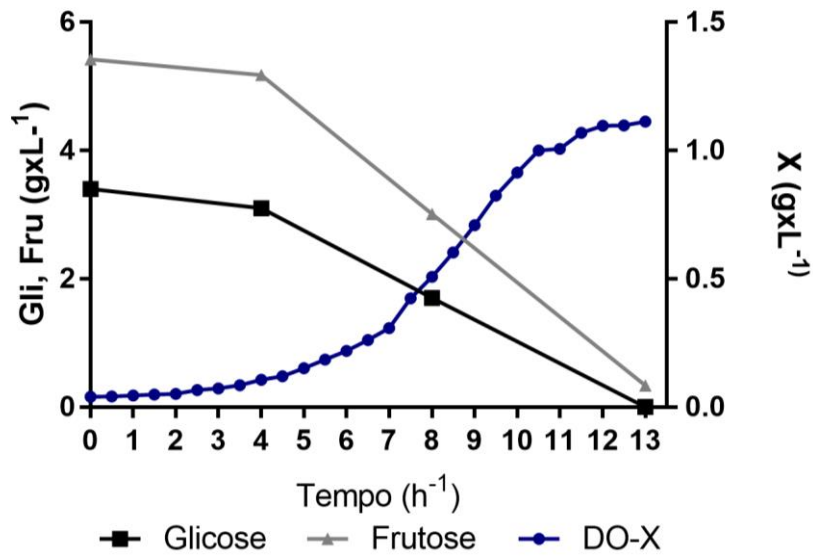
Todos consumos paralelos indicam, não repressão entre glicose e frutose, indicando sistema transportador simporte (FONSECA et al., 2013).

#### 2.5.3.4 Cultivo com Glicose e Frutose

Neste tipo de cultivo com os dois açúcares a linhagem PE-2 durante a fase *lag* a glicose já inicia no tempo zero em uma concentração mais baixa do que a mistura inicial de 5 g·L<sup>-1</sup> para cada açúcar, demonstrando que o método para a detecção específico da glicose (enzimático) e o método DNS para açúcares redutores totais utilizado para a quantificação de frutose por diferença demonstra uma diferença experimental que interfere diretamente na interpretação dos resultados.

Observa-se um consumo semelhante entre glicose e frutose devido ao ângulo de queda do consumo, porém quando observado no cultivo desses açúcares em sacarose (Gráfico 10) a hidrólise da mesma resulta no acúmulo da frutose indicando consumo preferencial de glicose. Já para fase *log* e estacionária há consumo dos dois açúcares, porém com maior intensidade no consumo de frutose, corroborando com o resultado em sacarose.

Gráfico 10. Curva de crescimento e consumo dos substratos glicose e frutose da levedura PE-2

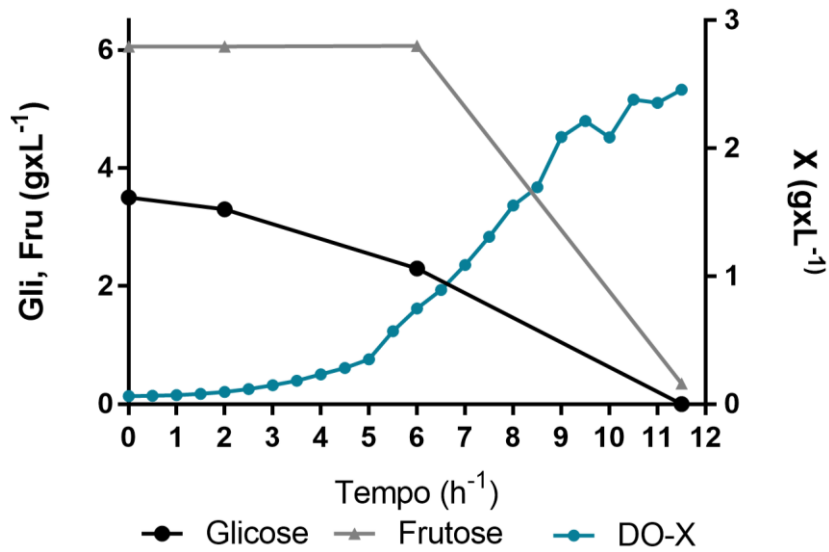


Fonte: o autor (2018)

O Gráfico 11 mostra que o isolado AVE-I apresentou, durante a fase *lag*, consumo preferencial por glicose, porém assim como na linhagem PE-2. Ao entrar na fase *log* o consumo preferencial de glicose ocorre como indicado na co cultura com sacarose.

Durante a fase estacionária há consumo preferencial por frutose, indicado pela queda da concentração da mesma, mais intensa que na cultura com sacarose. Indicando que a diferença de consumo entre glicose e frutose, não é um parâmetro fixo durante a fermentação, pois é dependente das características da levedura e dos fatores externos (BERTHEL.S., et al, 2004).

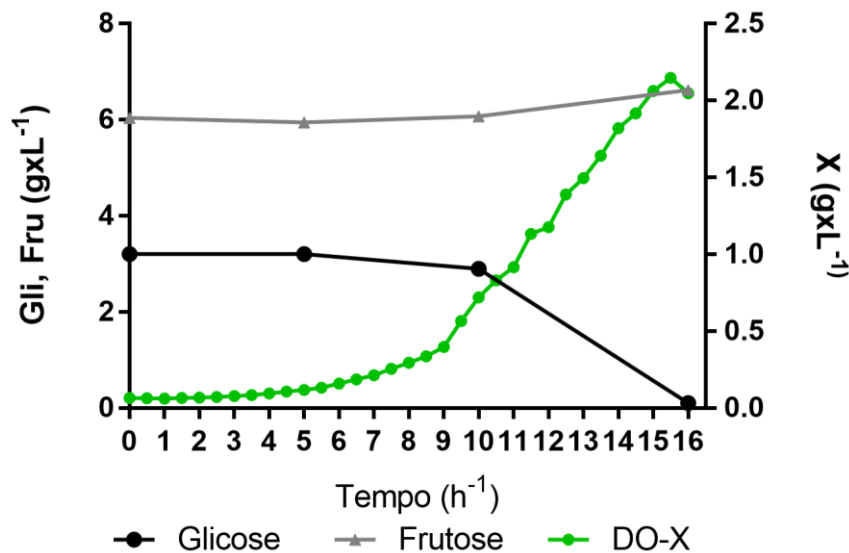
**Gráfico 11. Curva de crescimento e consumo dos substratos glicose e frutose da levedura AVE-I**



Fonte: o autor (2018)

O isolado AVE-II mostrou durante a fase *lag* maior consumo de frutose tanto no meio misto em glicose e frutose quanto com sacarose (Gráfico 12).

**Gráfico 12. Curva de crescimento e consumo dos substratos glicose e frutose da levedura AVE-II**



Fonte: o autor (2018)

Ao entrar na fase *log* e estacionária ocorre um acúmulo de frutose, pela conversão de glicose em frutose e consumo preferencial de glicose, demonstrando atividade constante de isomerase, gerando frutose e acúmulo no final do cultivo funcionando como reserva.



## **2.6. CONCLUSÃO**

Os resultados deste trabalho mostraram que a linhagem industrial PE-2, apresentou menor produção de biomassa nos substratos glicose, frutose, e galactose na mistura entre glicose e frutose, demonstrando possível preferência pela via fermentativa. Nos experimentos observou-se consumo preferencial de frutose.

O isolado AVE-I demonstrou comportamento muito semelhante ao PE-2, nos cultivos estudados indicando uma possível alta produção de etanol. Porém com maior velocidade máxima de crescimento, e menor tempo de fase de adaptação. Observou-se também que o isolado AVE-II demonstrou maior acúmulo de biomassa dentre as leveduras estudadas, indicando possível utilização para produção de biomassa.

Ao comparar as características dos dois isolados com a linhagem PE-2, observou-se que os isolados possuem micro e macro morfologias diferentes indicando espécies diferentes.

## 2.7 REFERÊNCIAS

- AMORIM, Henrique V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267, 2011.
- BASSO, L.C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast Research**, v.8, n.7, p.1155-1163, 2008.
- BASSO, T.O. et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic engineering**, v.13, n.6, p.694-703, 2011.
- BATISTOTE, M. et al. 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**, v.32, n.2, p.83, 2010.
- BERTHELIS, N. J. et al. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS yeast research**, v.4, n.7, p.683-689, 2004.
- BRASIL, MME. Balanço Energético Nacional. MME, Empresa de Pesquisa Energética (EPE), Brasília, DF. Disponível em, 2017.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. – v. 1 – Brasília:2017.
- COSTA, R.C.; PRATES, C.C.; PIMENTEL P.T. O Papel das Fontes Renováveis de Energia no Desenvolvimento do Setor Energético e Barreiras à sua Penetração no Mercado. **BNDES Setorial**, v.21, p.5-30, 2005.
- 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.
- ECHEGARAY, O. F. et al. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 1, p. 39-50, 2000.
- FERREIRA, O.O. C.. **Biocombustíveis Líquidos no Brasil**. 2008. Disponível em: <[http://ecen.com/eee74/eee74p/biocombustiveis\\_liquidos\\_no\\_brasil.htm](http://ecen.com/eee74/eee74p/biocombustiveis_liquidos_no_brasil.htm)>. Acesso em: 04 set. 2017.

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.

FREIRE, L.; ISHII, L. Xilanases: Principais metodologias e parâmetros cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 7–15, 2011.

GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 81–86, 2015.

GIMENEZ, Andres Rosello et al. O aumento da produtividade e a busca pela excelência na produção do etanol brasileiro: uma história de sucesso. **Research, Society and Development**, v. 7, n. 2, p. 4, 2018.

LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, v.3, p.1-43, 2001.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

MARQUES, W. L. et al. Combined engineering of disaccharide transport and phosphorolysis for enhanced ATP yield from sucrose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 45, p. 121–133, 2018.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MICHAELIS, **Dicionário**. Disponível em:< <http://michaelis.uol.com.br>>. Acesso em 05 jan. 2018.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

NANDY, S. K.; SRIVASTAVA, R. K. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. **Microbiological Research**, v.207, p.83-90, 2018.

NASCIMENTO, V.M. **Fisiologia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e da bactéria *Burkholderia sacchari* LFM 101 em diferentes condições de cultivo**. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2016.

- NELSON, D.L.; LEHNINGER, A.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2014.
- NEVES, Guilherme Tonial. **Seleção e caracterização de leveduras selvagens do cerrado do Mato Grosso do Sul com potencial biotecnológico**. 2014. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.
- OKPOKWASILI, G. C.; NWEKE, C. O. Microbial growth and substrate utilization kinetics. **African Journal of Biotechnology**. v.5, p. 305-317, 2005.
- PACHECO, T.F. Produção de etanol: Primeira ou Segunda Geração. **Circular Técnica** 04, p.1 – 6. 2011.
- PALOMINO, J.J.M.M.G. **Formação de preço de energia elétrica gerada por biomassa no Ambiente de Contratação Livre brasileiro: uma abordagem computacional baseada em agentes**. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) - Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- PEREIRA, Francisco B. et al. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 1, p. 45-53, 2012.
- RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v.56, p.255-263, 1999.
- ROCHE DIAGNOSTICA BRASIL. Assistência técnica/serviço médico. **Manual de instruções**. São Paulo, 68p. 2003.
- RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. **The alcohol textbook**, v.4, p.531-537, 2003.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biociencia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, cap. 8, p. 179-192, 2001.
- SILVA, F. A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assisat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1,p71-78,2002.

STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 89, n. 2, p. 212-214, 2000.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 40, n. 2, p. 289-297, 1992.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; DE ARAGAO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2013.

VENTURINI FILHO, W.G. et al. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e aneróbio de levedura alcoólica. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, p. 227-236, 2013.

VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v.8, n.7, p.501-517, 1992.

ZABED, Hossain et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The Scientific World Journal**, v.2014, 2014.