



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

GABRIELLA ESCOBAR MACHADO

**Avaliação da fisiologia de leveduras isoladas na Região Centro-
Oeste crescidas em diferentes fontes de carbono**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

**DOURADOS/MS
ABRIL/2014**

GABRIELLA ESCOBAR MACHADO

Avaliação da fisiologia de leveduras isoladas na Região Centro-Oeste crescidas em diferentes fontes de carbono

**ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO GRACIANO FONSECA
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARNEY PASCOLI CEREDA**

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.

**DOURADOS/MS
ABRIL/2014**

Termo de Aprovação

“Always laugh when you can. It is cheap medicine”.

Lord Byron

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por estar sempre presentes em todos os momentos da minha vida, sempre com todo o amor que uma família pode conceder. E por amparar e orientar as decisões mais difíceis a ser tomadas.

Aos meus grandes amigos Joel Kunrath e Simone Kunrath, que sempre deixaram com tanto carinho um espaço em suas casas, para que eu pudesse ter um lar familiar mesmo longe de casa.

A minha grande amiga Janina Zanoni Camargo pelo apoio nos trabalhos mais longos que tive em laboratório. Por disponibilizar de seu tempo para atender a todos os meus telefonemas. E por sempre arrancar altas risadas com seu bom humor.

Ao prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pela orientação, flexibilidade nos momentos referentes à gestão e planejamento do trabalho a longa distância, e por confiar no desenvolvimento do trabalho em uma aluna com formação bastante distinta da área de estudo.

A profa. Dra. Marney Pascoli Cereda, pela co-orientação bastante atuante. Pela disponibilidade em ensinar e tirar as dúvidas sempre que preciso no decorrer do trabalho. E ao apoio do espaço físico utilizado nas dependências da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

Aos meus colegas de laboratório da UCDB e UFGD pelo companheirismo e amizade, deixando os momentos mais agradáveis nas inúmeras horas sucedidas dentro de um laboratório.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de estudo.

A UFGD pela formação profissional proporcionada.

A UCDB pelo espaço físico proporcionado para a execução dos trabalhos em laboratório.

E a todos os meus amigos que me apoiaram no decorrer deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

BB.....	Barra do Bugres
CAT	Catanduva
DO	densidade ótica
DO _{max}	densidade ótica máxima
EtOH max.....	concentração máxima de etanol
FEC	fase exponencial de crescimento
FRU	frutose
GLC	glicose
LEV.....	levedura
MCS	massa celular seca
μ_{max}	velocidade específica de crescimento máxima
μ_S	velocidade específica de consumo de substrato
pH.....	potencial hidrogeniônico
R ²	correlação
RECOL.....	Rede Centro-Oeste de Leveduras
SAC	sacarose
TD	tempo de duplicação
TFA.....	ácido trifluoroacético
TG.....	tempo de geração
UPLC.....	cromatografia líquida de ultra <i>performance</i>
X.....	concentração de biomassa
X _{máx}	concentração máxima de biomassa
Y _{X/S}	fator de conversão de substrato a células

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Parâmetros cinéticos de cultivo de 17 linhagens de leveduras em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono. Cultivos realizados a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm (média de 2 repetições).	8
Tabela 2.1. Correlação entre o potencial hidrogeniônico (pH) e a densidade óptica (DO) de linhagens de leveduras isoladas diferentes materiais e cultivadas a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.	14
Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos de cultivo de 15 linhagens de leveduras em meio mineral tendo glicose na concentração 10% como única fonte de carbono. Cultivos realizados a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm (média de 2 repetições).	25
Tabela 3.2. Parâmetros cinéticos de cultivo de 15 linhagens de leveduras em meio mineral tendo frutose na concentração 10% como única fonte de carbono. Cultivos realizados a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm (média de 2 repetições).	31
Tabela 3.3. Parâmetros cinéticos de cultivo de 15 linhagens de leveduras em meio mineral tendo sacarose na concentração 10% como única fonte de carbono. Cultivos realizados a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm (média de 2 repetições).	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Cinética de crescimento das linhagens isoladas dos frutos da cereja do Rio Grande (<i>Eugenia involucrata</i>), cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.....	9
Figura 2.2. Cinética de crescimento das linhagens isoladas dos frutos de jatobá (<i>Hymenaea courbaril</i>), cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.....	11
Figura 2.3. Cinética de crescimento das linhagens isoladas dos frutos de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i>) RECOL 29 e do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>), RECOL 42, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.	12
Figura 2.4. Cinética de crescimento das linhagens isoladas de caldo de cana (BB9) e de glicerol bruto <i>Pichia kudriavzevii</i> LEV1 e LEV2, cultivadas a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.	12
Figura 3.1. Cinética de crescimento das leveduras isoladas do caldo de cana, <i>P. kudriavzevii</i> (BB10, BB11, e BB12) e BB16, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicose na concentração 10% como única fonte de carbono (valores com a média de 2 repetições).	26
Figura 3.2. Cinética de crescimento das leveduras isoladas de frutos, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicose na concentração 10% como única fonte de carbono (valores com a média de 2 repetições).	28
Figura 3.3. Taxa de produção de etanol em leveduras cultivadas a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicose na concentração 10% como única fonte de carbono.....	29
Figura 3.4. Cinética de crescimento das leveduras isoladas de frutos, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral.	32
Figura 3.5. Cinética de crescimento de leveduras <i>Saccharomyces</i> isoladas de caldo de cana, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral.	34

Figura 3.6. Cinética de crescimento das leveduras isoladas de caldo de cana, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo frutose na concentração 10% como única fonte de carbono (valores com a média de 2 repetições)..... 34

Resumo

Os objetivos do trabalho foram estudar a fisiologia de diferentes linhagens de leveduras isoladas na Região Centro-Oeste, crescidas em diferentes fontes de carbono (glicerol, glicose, frutose e sacarose), visando à produção de etanol e caracterizar fisiologicamente as leveduras em termos do consumo de substratos, formação de metabólitos extracelulares e crescimento celular. A linhagem *Pichia kudriavzevii* LEV2 foi a que apresentou melhores parâmetros cinéticos, como maior velocidade de crescimento celular, demonstrando boa capacidade de adaptação em glicerol PA a 10% como substrato, evidenciado por *lag* fase de apenas 2 h, atingindo a fase estacionária com 20 h de experimento. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PG, PG1 e PPG mostraram-se as mais promissoras em cultivos em glicose, frutose e sacarose a 10% como fonte única de carbono, devido aos parâmetros cinéticos obtidos. Dada às condições de aerobiose plena em que se realizaram os cultivos, não é possível de antemão lançar um novo candidato melhor que *S. cerevisiae* CAT-1 para a fermentação industrial, pois esta última possui formação máxima de etanol superior às demais. *P. kudriavzevii* pode ser considerada a mais adequada para a utilização em processos fermentativos visando a produção de biomassa, contudo mais estudos são necessários devido ao caráter clínico em geral apresentado pela espécie. Estudos em sacarose e em mosto industrial em anaerobiose são importantes para dar-se continuidade a este trabalho.

Palavras-chave: Fisiologia, Levedura, Açúcares, Glicerol, *Pichia kudriavzevii*

Abstract

The aims of the work were to study the physiology of different yeast strains isolated from the Brazilian Midwest region grown on different carbon sources (glycerol, glucose, fructose and sucrose) for the production of ethanol, and physiologically characterize the yeast in terms of substrate consumption, formation of extracellular metabolites and cell growth. The strain *Pichia kudriavzevii* LEV2 showed the best kinetic parameters, such as increased cell growth rate, showing good capacity of adaptation on glycerol PA 10% as substrate, evidenced by the lag phase of only 2 h, reaching the stationary phase after 20 h of experiment. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* PG, PG1 and PPG proved to be the most promising in glucose, fructose and sucrose cultivations as the sole carbon source at 10% due to the kinetic parameters obtained. Given the conditions of full aerobic set up where cultivations were carried out, it is not possible beforehand to launch a new best candidate to replace *S. cerevisiae* CAT-1 for industrial fermentation, since the latter has a maximum formation of ethanol higher than the others. *P. kudriavzevii* can be considered the most appropriate for use in fermentation processes aimed at producing biomass, however further studies are needed due to the clinical nature generally presented for this species. Anaerobically studies on sucrose and industrial must are important to continue this work.

Keywords: Physiology, Yeast, Sugars, Glycerol, *Pichia kudriavzevii*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Objetivos	1
2 CINÉTICAS DE CRESCIMENTO DE LEVEDURAS EM GLICEROL COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO	2
2.1 Introdução.....	2
2.2 Material e métodos.....	4
2.2.1 Leveduras e manutenção	4
2.2.2 Meio de cultura	5
2.2.3 Pré-cultivos e cultivos em incubador rotativo	5
2.2.4 Amostragens e preparo das amostras	6
2.2.5 Determinação do pH e da biomassa.....	6
2.2.6 Determinação de parâmetros durante fase exponencial de crescimento	6
2.3 Resultados e discussão	7
2.4 Conclusões.....	15
2.5 Referências	16
3 CINÉTICAS DE CRESCIMENTO, CONSUMO DE SUBSTRATO E FORMAÇÃO DE PRODUTO DE LEVEDURAS EM GLICOSE, FRUTOSE E SACAROSE COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO	19
3.1 Introdução.....	19
3.2 Material e métodos.....	21
3.2.1 Leveduras e manutenção	21
3.2.2 Meio de cultura	21
3.2.3 Pré-cultivos e cultivos em incubador rotativo	21
3.2.4 Amostragens e preparo das amostras	22
3.2.5 Determinação do pH, da biomassa e das concentrações de açúcares e metabólitos extracelulares	22
3.2.6 Determinação de parâmetros durante fase exponencial de crescimento	23
3.3 Resultados e discussão	23
3.3.1 Parâmetros cinéticos em glicose	24
3.3.2 Parâmetros cinéticos em frutose	30

3.3.3 Parâmetros cinéticos em sacarose	35
3.4 Conclusão	37
3.5 Referências	37
4 CONCLUSÃO GERAL	41
ANEXOS.....	42

1. INTRODUÇÃO GERAL

Esta dissertação apresenta as atividades realizadas pela aluna Gabriella Escobar Machado 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 2012 a abril de 2014.

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 5). Assim, este trabalho foi organizado da seguinte forma:

- Capítulo 2. Cinéticas de crescimento de leveduras em glicerol como única fonte de carbono;
- Capítulo 3. Cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto de leveduras em glicose, frutose e sacarose como única fonte de carbono.

1.1 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Estudar a fisiologia de diferentes linhagens de leveduras isoladas na Região Centro-Oeste, crescidas em diferentes fontes de carbono (glicerol, glicose, frutose e sacarose), visando à produção de etanol;
- Caracterizar fisiologicamente as leveduras em termos do consumo de substratos, formação de metabólitos extracelulares e crescimento celular.

***Elsevier. Manuscript Guidelines for Authors.**

http://www.us.elsevierhealth.com/media/us/files/us/manuscript_guidelines_for_authors.pdf

2 CINÉTICAS DE CRESCIMENTO DE LEVEDURAS EM GLICEROL COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO

Resumo

O uso de resíduos como substrato em processos biotecnológicos depende de sua disponibilidade, custo e valor nutricional. O glicerol residual resultante da produção de biodiesel tem sido pesquisado como meio de cultivo potencial, principalmente para bactérias. A falta de informações sobre o potencial de uso de leveduras motivou a pesquisa em que foram avaliadas 17 linhagens de diversas origens, duas delas isoladas de glicerol bruto. Como as mais promissoras dependem da adaptação ao glicerol, foi usada a cinética de crescimento sobre glicerol PA como única fonte de carbono como ferramenta de seleção. Utilizou-se frascos do tipo Erlenmeyer com 200 mL de meio mineral, com o pH ajustado para 6,0, onde foram inoculados com suspensões padronizadas das 17 linhagens, mantidas sob agitação (200 rpm) a 30°C. O crescimento foi acompanhado pela densidade óptica (DO) em intervalos de 2 h, até o final da fase de crescimento exponencial, adotado como DO 2,0. Embora todas as linhagens tenham apresentado habilidade de metabolizar o glicerol, os perfis de crescimento diferiram entre si, com algumas delas exigindo maior tempo de adaptação ao meio. Nas condições estudadas o destaque foi para as duas linhagens de *Pichia kudriavzevii*, com os melhores parâmetros cinéticos entre todas as leveduras avaliadas. Esse desempenho foi decorrente de melhor adaptação ao glicerol, comprovado por menor fase lag, maior $\mu_{\text{máx}}$ ($0,3705 \pm 0,061 \text{ h}^{-1}$), menor tempo de geração (1,87 h) e $\text{DO}_{\text{máx}}$ de $1,535 \pm 0,162 \text{ h}^{-1}$, em 20 h de cultivo. Esse desempenho, assim como os de outras linhagens, será estudado em glicerol bruto, substrato mais complexo, e em anaerobiose, como forma de avaliar a potencialidade de seus produtos metabólicos formados.

Palavras-chave: Resíduo, Glicerol bruto, Leveduras; Seleção; Valorização.

2.1 Introdução

Os biocombustíveis foram introduzidos no mercado brasileiro em razão dos altos preços do petróleo, consequência dos choques ocorridos em 1973 e 1979. Os impactos internos foram fortes em razão do Brasil, na época, importar 80% do óleo

bruto (Lobão, 2011). Nesta década Iniciaram-se também estímulos e subsídios a programas de desenvolvimento de energia renováveis.

Como resultado o Brasil despontou no uso do etanol carburante a partir da cana-de-açúcar como principal biocombustível no país (Lopes, 2009). Entretanto, a substituição de gasolina por etanol não resolvia a dependência do diesel, obtido também do processo de *cracking* do petróleo e necessário aos motores mais potentes. Em 2003 iniciaram-se no país os estudos sobre a viabilidade da produção e incorporação do biodiesel ao diesel (Rodrigues e Accarini, 2011).

A decisão de apostar em combustíveis renováveis vem da base sólida do agronegócio brasileiro, onde além da cana-de-açúcar, as oleaginosas são cultivos bem implantados. A leguminosa mais utilizada é a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em razão de sua produtividade e potencial oleaginoso (Santos e Silva, 2013). Outras culturas oleaginosas podem ser citadas, e.g. mamona, dendê, girassol, pinhão manso, nabo forrageiro e macaúba (Sluszz e Machado, 2006).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural, e Biocombustíveis (ANP), a produção brasileira de biodiesel até maio de 2013 era da ordem de 1,15 bilhões de litros e a região Centro-Oeste era líder da produção, com quase 494 milhões de litros no acumulado do ano, beneficiando-se da vantagem competitiva da disponibilidade de áreas agriculturáveis sem concorrência com a produção de alimentos (ANP, 2013).

O processo de produção de biodiesel baseia-se na reação de transesterificação de óleos e gorduras. Para cada tonelada de biodiesel, são produzidos aproximadamente 100 Kg de glicerina bruta, com cerca de 50% de glicerol (Oliveira et al., 2013). A composição do glicerol bruto depende da matéria-prima e processo usado, e por isso o resíduo apresenta contaminantes diversos, dos quais os mais comuns são o metanol e o sabão, mas também fósforo, potássio, cálcio, silício, sódio e zinco em diferentes valores (Abad e Xavier, 2012).

Embora após purificação o glicerol residual possa apresentar diversas aplicações na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos (Abad e Xavier, 2012), o aumento do volume tem feito cair o preço e caracterizado o glicerol como resíduo (Rossi et al., 2011).

Os processos biotecnológicos são soluções atrativas para valorização de resíduos (French, 2009). O glicerol pode ser degradado com relativa facilidade por microrganismos (Silva, 2013), como fonte de carbono em fermentações alcoólicas

(Kirtadze e Nutsubidze, 2009). Por glicerol ser um componente estrutural de diversos lipídeos, pode ser transformado em compostos de maior valor agregado, tais como 1,3 - propanodiol, etanol, ácido propiônico, ácido cítrico, ácido láctico, poli-3-hidroxibutirato e biossurfactantes (Duque, 2011).

Apesar do potencial das bactérias como agentes de transformação do glicerol bruto, a literatura relata problemas de patogenicidade ao homem, o que reduz o interesse em sua utilização. Por outro lado, as leveduras são mais fáceis de utilizar e gêneros como *Candida*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula* têm sido reportados pela sua utilização de glicerol, inclusive produzindo etanol (Ito et al., 2005).

A biodiversidade de cepas isoladas de diferentes materiais e a possibilidade de que apresentem também diversidade genética são vantagens estratégicas para a seleção de cepas industriais, mas para isso há necessidade de avaliar esses agentes em condições padronizadas (Fonseca, 2007).

O consumo da fonte de carbono do substrato e a formação de produto variam ao longo do tempo durante os cultivos. Estes parâmetros são estabelecidos em experimentos de laboratório ou em planta-piloto, a partir de “curvas” (Tsao, 1979). O estudo destas cinéticas determina as velocidades de transformações que ocorrem durante o consumo do substrato e permitem estabelecer os fatores que influenciam nesta velocidade de transformação, correlacionando-os por meio dessas equações matemáticas (Daré, 2008), revelando a cepa mais adequada para determinado processo industrial.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os parâmetros cinéticos de 17 linhagens de leveduras da Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL) durante o crescimento exponencial em meio definido contendo o glicerol como única fonte de carbono, a 30°C, buscando identificar as mais eficientes para metabolização do glicerol.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Leveduras e manutenção

Foram estudadas 17 linhagens de leveduras: 14 isolados bioprospectados de frutos (RECOL 7-12, 15 e 16, de cereja do Rio Grande (*Eugenia involucreta* DC); RECOL 17-20, de jatobá (*Hymenaea courbaril*); RECOL 29, de uvaia (*Eugenia pyriformis*); RECOL 42, de pequi (*Caryocar brasiliense*)) obtidos na Região Centro-Oeste (Stefanello, 2010; Camargo, 2013), 1 isolada da Usina Barralcool (BB9) no

município de Barra do Bugres - MT (Silva et al., 2011, 2013) e 2 leveduras isoladas de glicerol (*Pichia kudriavzevii* LEV1 e LEV2) (Rampi, 2013).

As leveduras BB9 e *P. kudriavzevii* LEV1 e LEV2 foram obtidas liofilizadas, cultivadas em meio YPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L) por 24 h, acrescidas de 15% (v/v) de glicerol estéril e estocadas a 4°C (Fonseca, 2007). As demais leveduras também foram mantidas em ágar YPD.

2.2.2 Meio de cultura

O meio mineral (Verduyn et al., 1992) 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; elementos-traço (EDTA, 15 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,84 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg; $\text{Na}_2 \cdot \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 mg; H_3BO_3 , 1,0 mg; KI, 0,1 mg). Foi ajustado para pH 6,0 com NaOH antes de autoclavado (121°C, 20 min). O meio foi resfriado a temperatura ambiente e uma solução filtro-esterilizada de vitaminas preparada em água desmineralizada foi adicionada, a uma concentração final por litro de: D-biotina, 0,05 mg; pantotenato de cálcio, 1,0 mg; ácido nicotínico, 1,0 mg; mio-inositol, 25 mg; tiamina HCl, 1,0 mg; piridoxina HCl, 1,0 mg; e ácido para-aminobenzóico, 0,20 mg. A fonte de carbono (glicerol comercial PA) foi esterilizada separadamente (121°C, 20 min) e adicionada à concentração final de 10 g/L.

2.2.3 Pré-cultivos e cultivos em incubador rotativo

Para o pré-cultivo foi transferida uma colônia da placa de Petri contendo a linhagem selecionada para um frasco tipo Erlenmeyer com 200 mL de meio mineral estéril, com pH ajustado a 6,0 (Verduyn et al., 1992). Os pré-cultivos foram realizados em agitador orbital (Tecnal TE- 420 Incubadora) a 30°C e 200 rpm até que a final da fase exponencial de crescimento fosse atingida. Os cultivos principais foram realizados em duplicada em condições idênticas aos pré-cultivos, a partir de uma alíquota do pré-cultivo, tendo-se utilizado uma densidade óptica (DO) inicial ($\lambda = 600\text{nm}$) de 0,1 (Camargo, 2013). Porém cada cultivo principal foi finalizado ao atingir-se a fase estacionária de crescimento, a partir da medida das DOs obtidas no espectrofotômetro.

2.2.4 Amostragens e preparo das amostras

Amostragens foram realizadas em média a cada 1 h para a determinação do pH e da biomassa. Alíquotas de 2 mL foram filtradas sob pressão positiva utilizando-se filtros de seringa de acetato celulose com membrana de 0,45 μm para a remoção de células e obtenção de sobrenadante para a determinação das concentrações de açúcares e metabólitos extracelulares. Os sobrenadantes foram acondicionados em microtubos tipo Eppendorf revestidos com filme plástico do tipo parafilm e armazenados a -20°C até sua utilização (determinação das concentrações de açúcar remanescente no meio e dos metabólitos formados, por cromatografia líquida de ultra *performance* (UPLC) - resultados não apresentados).

2.2.5 Determinação do pH e da biomassa

O pH foi obtido por meio de aferições potenciométricas (Hanna Instruments Ph 21). A determinação da biomassa foi realizada a cada hora, com 1 ml do meio de cultivo, sendo estabelecida indiretamente pela medida da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (BioResearch do Brasil, BioPhotometer plus), como função da DO como forma de estimar, de maneira rápida, a concentração celular e acompanhar o crescimento microbiano (Costa, 2010).

A amostra do meio de cultura foi diluída na proporção de 1:10 com água, e a leitura realizada a 600 nm. A variação da densidade celular obtida como DO em relação ao tempo foi usada para estabelecer uma equação de curva de crescimento, e a correlação avaliada pelo coeficiente de correlação linear (R^2). Os valores de absorbância medidos foram convertidos em valores mássicos utilizando uma relação linear de 0,50 unidade de densidade ótica por grama de massa celular seca (Fonseca, 2007).

2.2.6 Determinação de parâmetros durante fase exponencial de crescimento

A fase exponencial de crescimento (FEC) foi identificada como a região linear da plotagem da densidade ótica (DO) em função do tempo. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) foi determinada pela inclinação da reta, pelo quociente do \ln (DO) pelo tempo, obtendo a correlação da reta (R^2), onde o coeficiente (a) da equação da reta é igual ao μ_{max} . Todos os cálculos foram realizados para cada duplicata e expressos pela média da duplicata.

2.3 Resultados e discussão

Embora a literatura destaque as bactérias como os agentes para consumo de glicerol e produção de metabólitos, as leveduras também são citadas com bom desempenho. Neste sentido [Tabosa \(2009\)](#) usou de glicerol PA como única fonte de carbono para cultivo de cepas da levedura do Gênero *Rhodotorula* visando produção de biomassa. Em cultivo por fermentação submersa na temperatura de 30°C, com velocidade de agitação de 150 rpm, constatou 63% de consumo, um residual de 7,36 g/L.

A prospecção de microrganismos em meio ambiente é uma das formas de explorar a diversidade genética disponível. No caso da busca por agentes de processos biotecnológicos, que possam proporcionar produtos mais valorizados, uma das formas é buscar no próprio substrato, no caso o glicerol bruto. As frutas por sua composição nutricional também é um habitat natural para leveduras com variedade de enzimas. Por fim, o caldo de cana por sua riqueza em açúcares fermentescíveis também é um recurso a ser explorado ([Silva, 2011](#)).

As linhagens selvagens isoladas de habitat natural deverá ainda ser avaliadas em seu desempenho como forma de seleção daquelas mais adaptáveis a um novo substrato. Na ausência de identificação das linhagens que possibilitem uma seleção mais eficiente, é necessário avaliar sua capacidade de crescer no substrato selecionado ([Franco et al., 2012](#)).

Neste sentido, a medição da DO facilita o monitoramento do crescimento celular pela possibilidade de estabelecer a curva de crescimento, com esta estabelecer graficamente a duração da lag fase, que representa a adaptação ao meio de cultivo, assim como estabelecer a entrada na fase estacionária.

Os processos metabólicos utilizando o glicerol como única fonte de carbono, que caracterizam a curva de crescimento das 17 linhagens de leveduras em estudo duraram entre 18 a 30 h, em função da maior ou menor adaptação ao substrato, uma vez que as demais variáveis permaneceram controladas. A [Tabela 2.1](#) apresenta esses parâmetros cinéticos para cada linhagem.

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) demonstra a velocidade com que a levedura consome o substrato com fonte de carbono. Os maiores valores de μ_{\max} foram observados nas linhagens RECOL 10 (isolado dos frutos de cereja do Rio Grande) e *P. kudriavzevii* LEV2, isolada do glicerol bruto de biodiesel.

Tabela 2.1. Parâmetros cinéticos de cultivo de 17 linhagens de leveduras em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono. Cultivos realizados a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm (média de 2 repetições).

Isolado	Parâmetros de Cultivo			Parâmetros Cinéticos		
	Tempo (h)	pH final	DO _{máx}	TG (h)	μ _{máx} (h ⁻¹)	R ²
RECOL 7	30	3,17	2,03 ± 0,12	5,39	0,13 ± 0,029	0,9927 ± 0,0004
RECOL 8	28	2,97	7,76 ± 0,32	3,05	0,23 ± 0,000	0,9933 ± 0,0003
RECOL 9	22	3,10	3,89 ± 0,06	2,65	0,26 ± 0,003	0,9985 ± 0,0005
RECOL 10	24	2,88	6,28 ± 0,11	2,15	0,32 ± 0,014	0,9941 ± 0,0011
RECOL 11	18	3,56	1,59 ± 0,03	2,76	0,25 ± 0,001	0,9944 ± 0,0013
RECOL 12	28	5,62	2,95 ± 0,07	6,64	0,10 ± 0,000	0,9932 ± 0,0015
RECOL 15	20	2,56	3,66 ± 0,12	4,91	0,14 ± 0,051	0,9905 ± 0,0002
RECOL 16	30	2,96	5,63 ± 0,01	3,93	0,18 ± 0,005	0,9932 ± 0,0008
RECOL 17	20	2,74	3,27 ± 0,33	5,00	0,14 ± 0,046	0,9865 ± 0,0088
RECOL 18	30	3,30	2,35 ± 0,27	5,33	0,13 ± 0,002	0,9903 ± 0,0004
RECOL 19	28	3,96	1,66 ± 0,07	7,61	0,09 ± 0,000	0,9914 ± 0,0007
RECOL 20	26	3,59	1,92 ± 0,06	5,78	0,12 ± 0,002	0,9957 ± 0,0037
RECOL 29	26	3,74	1,80 ± 0,05	3,53	0,20 ± 0,004	0,9930 ± 0,0025
RECOL 42	22	3,86	1,88 ± 0,11	5,68	0,12 ± 0,006	0,9924 ± 0,0005
LEV1	26	2,74	2,47 ± 0,10	2,86	0,24 ± 0,029	0,9954 ± 0,0005
LEV2	20	3,67	1,53 ± 0,16	1,87	0,37 ± 0,061	0,9974 ± 0,0035
BB9	22	3,83	2,14 ± 0,20	2,69	0,26 ± 0,044	0,9978 ± 0,0023

Ao todo, da coleção da RECOL, 8 linhagens foram isoladas de frutos de cereja do Rio Grande. Observou-se que essas linhagens (Tabela 2.1) foram as que apresentaram maior densidade óptica (DO) em relação as demais cepas caracterizadas em estudo.

Para facilitar a comparação entre as linhagens foram elaborados gráficos das curvas de crescimento de todas as linhagens isoladas (Figs. 2.1, 2.2 e 2.3).

Os gráficos obtidos dos frutos da cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata*) são apresentados na Fig. 2.1. Esses gráficos mostram que mesmo isoladas da mesma fonte, houve diferenças no metabolismo sobre glicerol e as que apresentaram maior DO foram as RECOL 8, 9, 10 e 16.

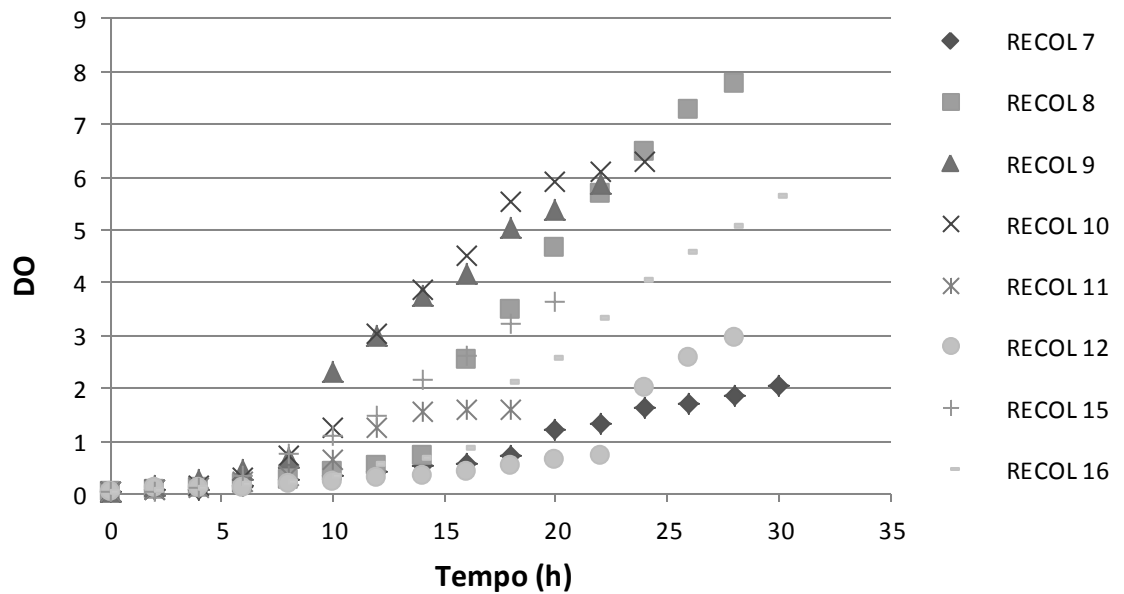


Figura 2.1. Cinética de crescimento das linhagens isoladas dos frutos da cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata*), cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.

Observa-se na Fig. 2.1 que as 8 linhagens de leveduras isoladas de frutos de cereja do Rio Grande apresentaram perfis que poderiam ser reunidos em 3 grupos. O grupo que reúne as RECOL 8, 9, 10 foram as que apresentaram melhor adaptação ao glicerol como fonte de carbono. O grupos das RECOL 7 e 12, ao contrário, mostram baixa afinidade com o substrato. A RECOL 16 apresentou um perfil intermediário.

A RECOL 8 representa o grupo, com o maior $DO_{m\acute{a}x}$ ($7,755 \pm 0,318 \text{ h}^{-1}$) em 28 h de cultivo. A fase de adaptação ao meio (fase lag), observada nessa linhagem foi de 6 a 8 h. Esse dado destaca sua capacidade de replicação celular neste meio mineral onde glicerol como única fonte de carbono, demonstrando afinidade a este tipo de ambiente. Seu tempo de geração foi de 3 h, com uma velocidade de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) de $0,227 \pm 0,0002 \text{ h}^{-1}$.

Na linhagem *Sacharomyces cerevisiae* CAT-1 (levedura industrial, utilizada para a produção de etanol), nas mesmas condições utilizadas no presente estudo, diferenciando-se pelo uso da glicose como única fonte de carbono, teve como parâmetros cinéticos, um ($\mu_{m\acute{a}x}$) de $0,517 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$, atingindo uma $DO_{m\acute{a}x}$ de 4,34, com um tempo de geração de $3,99 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$ (Camargo, 2013).

A RECOL 9 embora tenha apresentado menor DO, caracterizou-se por uma fase lag inferior a 5 h, com uma $DO_{m\acute{a}x}$ de $5,885 \pm 0,063 \text{ h}^{-1}$ em 22 h de cultivo. Seu $\mu_{m\acute{a}x}$ foi de $0,261 \pm 0,0003 \text{ h}^{-1}$ e um tempo de geração de 2 h, constando a segunda maior velocidade de crescimento celular entre as linhagens do fruto da cereja. A linhagem RECOL 10 destacou por sua velocidade de crescimento, com $\mu_{m\acute{a}x}$ de $0,323 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$, o maior valor verificado entre todas as linhagens isoladas de frutos, e conseqüentemente, apresentou o menor tempo de geração celular (2,145 h).

A linhagem RECOL 12 foi a que apresentou menor afinidade com o substrato no grupo das leveduras isoladas de frutos de cereja do Rio Grande, com $\mu_{m\acute{a}x}$ de $0,104 \pm 0,0001 \text{ h}^{-1}$, explicado pelo tempo de geração (TG) de 6,639, o maior entre as 17 linhagens investigadas no estudo. A fase de adaptação foi proporcionalmente longa (10 h), contribuindo, destacando a dificuldade em metabolizar o glicerol como fonte de carbono, quando comparada as demais linhagens do estudo.

No grupo das linhagens de leveduras que apresentaram o pior desempenho sobre glicerol como única fonte de carbono, a RECOL 16 alcançou uma $DO_{m\acute{a}x}$ de 5,63, dando início a fase estacionária com 30 h de cultivo, e levando 8 h para se adaptar no meio. Já a RECOL 11 foi a que obteve, entre os isolados da cereja, o menor tempo de cultivo, atingindo a fase estacionária com 18 h, com a menor DO entre essas linhagens, com $DO_{m\acute{a}x}$ de $1,59 \pm 0,028 \text{ h}^{-1}$. Sua fase lag foi de 4 h, e o seu $\mu_{m\acute{a}x}$ de $0,251 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração de 2 h.

Esses dados demonstram afinidade com o substrato utilizado, mas com uma capacidade de replicação celular menor em relação às outras linhagens de origem dos frutos da cereja. Pode têm ter ocorrido inibição do crescimento celular por algum subproduto formado do metabolismo do glicerol. No caso de leveduras *Saccharomyces* a baixa produção de biomassa  indício de maior produção de etanol (Dar, 2008).

Se a cereja do Rio Grande é uma fruta muito suculenta, o fruto do jatobá (*Hymenaea courbaril*) tem comprimento entre 6 e 18 cm e 3 a 6 cm de diâmetro, são secos, e farináceos (Matuda e Netto, 2005).

A Fig. 2.2 apresenta as curvas de metabolismo das 4 linhagens avaliadas em glicerol como única fonte de carbono. Observa-se que os perfis da linhagem RECOL 17 destacou-se das demais, que apresentaram perfil semelhante.

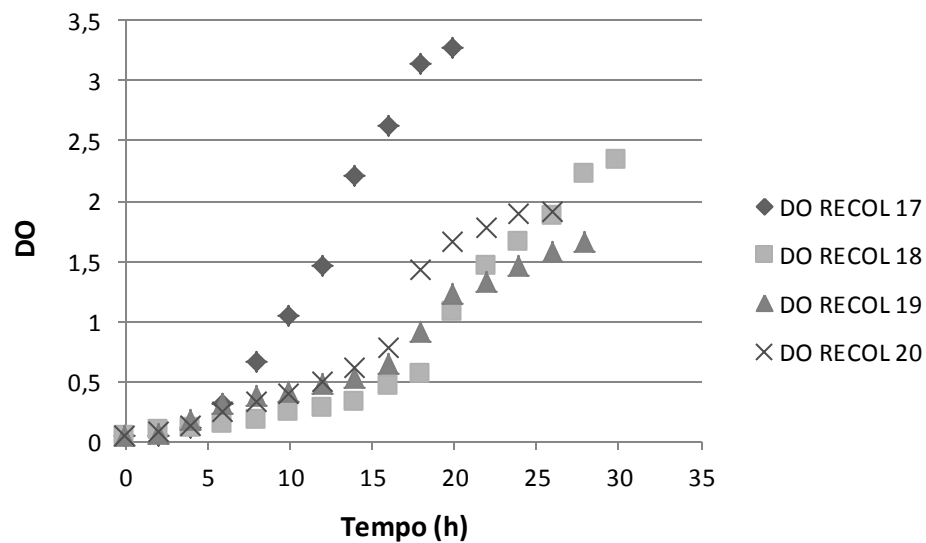


Figura 2.2. Cinética de crescimento das linhagens isoladas dos frutos de jatobá (*Hymenaea courbaril*), cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.

A Fig. 2.2 reúne as curvas de crescimento das linhagens isoladas dos frutos de jatobá, definidas em 2 grupos. As leveduras RECOL 18, 19 e 20 apresentaram perfis semelhantes, com pior desempenho que a RECOL 17.

Dessas linhagens, a RECOL 17 destaca-se no grupo pela rapidez de crescimento com a maior densidade óptica em 4 h de cultivo. Esse resultado explica-se pela curta fase lag de 2 h. As curvas de crescimento das linhagens do segundo grupo (RECOL 18, 19 e 20) sobrepuseram-se até 16 h de cultivos, com pequena diferenciação após este período.

As curvas de crescimento das linhagens isoladas dos frutos de uvaia e pequi são apresentadas na Fig. 2.3, apresentando perfis semelhantes àquelas linhagens isoladas dos outros frutos.

A $DO_{máx}$ observada nas duas linhagens, foram muito semelhantes, mas com crescimento celular bastante distinto. As duas linhagens tiveram uma fase lag curta, de 2 h, assim como verificado nas linhagens de leveduras isoladas dos frutos de jatobá.

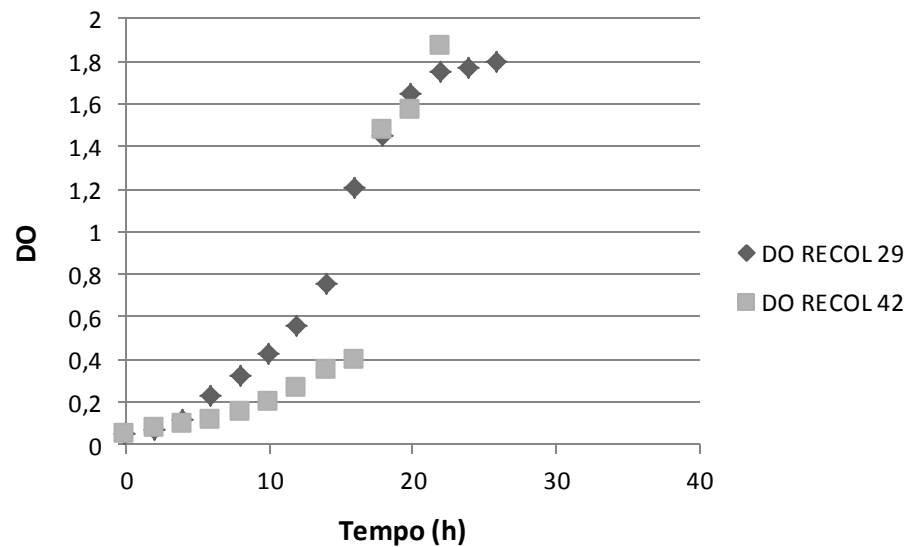


Figura 2.3. Cinética de crescimento das linhagens isoladas dos frutos de uvaia (*Eugenia pyriformis*) RECOL 29 e do pequi (*Caryocar brasiliense*), RECOL 42, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.

Como diferencial a RECOL 42 ($\mu_{\text{máx}}$ de $0,122 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ e TG de 5,681 h) apresentou um acidente na curva de crescimento entre 16 e 18 h de cultivo, de forma que a DO de 0,404 subiu para 1,475. Não foi possível estabelecer a razão desta anomalia.

A Fig. 2.4 reúne os gráficos correspondentes às linhagens isoladas de caldo de cana (BB9) e de glicerol bruto *Pichia kudriavzevii* LEV1 e LEV2, cultivadas a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.

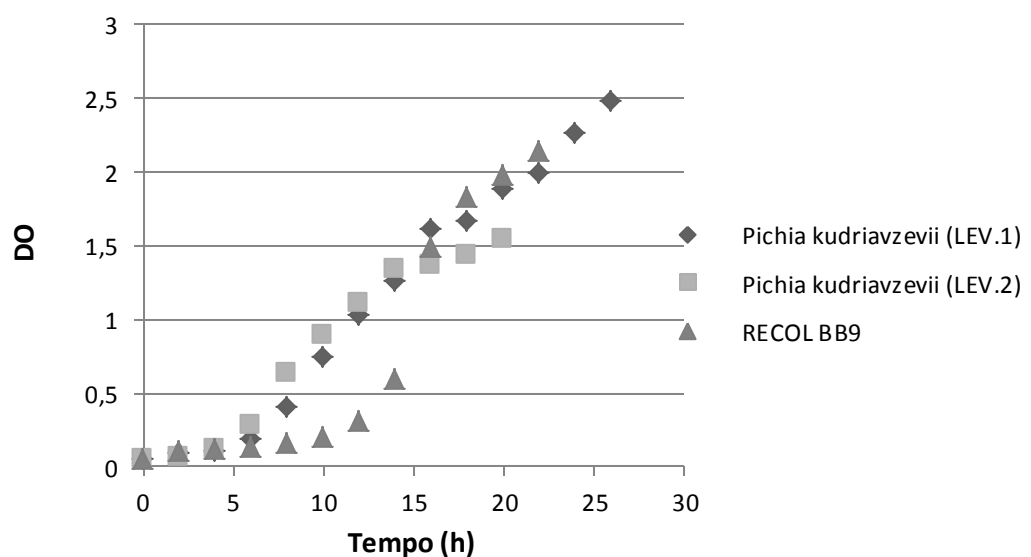


Figura 2.4. Cinética de crescimento das linhagens isoladas de caldo de cana (BB9) e de glicerol bruto *Pichia kudriavzevii* LEV1 e LEV2, cultivadas a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.

Esperava-se o melhor desempenho das linhagens isoladas de glicerol bruto, a *Pichia kudriavzevii* nos morfotipos LEV1 e LEV2, em relação às 15 outras linhagens isoladas de frutos. Entretanto, a linhagem isolada do caldo de cana (BB9) apresentou desempenho semelhante ou melhor que as isoladas de glicerol bruto do biodiesel. Embora ambas tenham apresentado os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ entre as linhagens investigadas, os menores tempos de geração celular e as menores *lag* fases, de apenas 2 h de cultivo, os resultados mostram que nem sempre os microrganismos isolados do próprio substrato apresentam as melhores adaptação ao meio de cultivo diferente daquele em que foi isolado.

A explicação poderá estar no relatado por [Silva et al. \(2011\)](#) para essa linhagem (BB09) que mostrou-se capaz de fermentar e produzir gás em caldo de cana ajustado para condições de estresse (temperatura, acidez, calor e presença de etanol), sugerindo uma *Sacchamomyces cerevisiae* selvagem. A literatura mostra que em condições de estresse há produção de glicerol, portanto é possível que essa linhagem já apresentasse adaptação ao glicerol PA ([Ding et al., 2013](#)).

O bom desempenho da linhagem isolada de glicerol bruto já era esperada, mas a avaliação dos morfotipos poderia esclarecer se seria possível obter respostas diferentes.

As linhagens LEV1 e LEV2 de *P. kudriavzevii* foram os únicos morfotipos isolados de glicerol bruto e embora o aspecto das colônias e das células fosse semelhante ([Rampi et al., 2013](#)) não se pode concluir que sejam iguais. Por essa razão as curvas cinéticas destas linhagens foram avaliadas em separado.

A [Fig. 2.4](#) mostra que o perfil de ambas foi muito parecido, embora a LEV1 tenha levado maior tempo para atingir a fase estacionária de crescimento (26 h) que a linhagem LEV2 (20 h). Essa diferença, se confirmada, poderá evidenciar diferença também em metabolismo, suscitando interesse de estudos mais aprofundados, inclusive com glicerol bruto como única fonte de carbono.

O fato de crescer bem em glicerol PA não pressupõe bom crescimento em glicerol bruto. O glicerol bruto apresenta composição mais complexa que o glicerol PA, com impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual ([Costa, 2010](#)). As altas concentrações de sais, tais como cloreto de sódio podem vir a inibir o crescimento celular como também podem ser utilizados no metabolismo da levedura ([Ito et al., 2005](#)), portanto essa questão deverá ser melhor investigada.

Em relação ao acompanhamento do potencial hidrogeniônico (pH) durante o cultivo das 17 linhagens investigadas, as equações de correlações entre encontram-se listadas na [Tabela 2.1](#) e podem ser comparadas por seus coeficientes de correlação (R^2).

Os resultados de [Ito et al. \(2005\)](#) para metabolismo de glicerol pela linhagem *Enterobacter aerogenes* HU-101 mostram que pode haver formação de ácidos como o láctico. Outro produto verificado por [Ito et al. \(2005\)](#), proveniente desse metabolismo, é o 1,3 propanodiol que tem alto valor econômico, pois é utilizado como intermediário na síntese de poliésteres, poliéteres e poliuretanos, dentre outras aplicações ([Rodrigues e Vinhas, 2011](#)).

Portanto era esperado acidificação com redução do valor do pH. A redução do pH é também comum em fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* ([Orij et al., 2011](#)).

Tabela 2.1. Correlação entre o potencial hidrogeniônico (pH) e a densidade óptica (DO) de linhagens de leveduras isoladas diferentes materiais e cultivadas a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicerol PA na concentração 10% como única fonte de carbono.

Procedência	Linhagem	Equação da reta	R^2
Cereja do Rio Grande (<i>E. involucrata</i>)	RECOL 7	$y = -0,6442x + 3,8275$	0,9729
	RECOL 8	$y = -2,4541x + 14,3950$	0,9784
	RECOL 9	$y = -1,7817x + 10,9350$	0,9703
	RECOL 10	$y = -1,7050x + 10,1540$	0,8625
	RECOL 11	$y = -0,6340x + 3,7659$	0,9774
	RECOL 12	$y = -8,3583x + 49,8710$	0,8852
	RECOL 15	$y = -0,8048x + 4,5697$	0,7616
Jatobá (<i>H. coubaril</i>)	RECOL 16	$y = -1,6683x + 9,7863$	0,9654
	RECOL 17	$y = -0,8256x + 4,6919$	0,7819
	RECOL 18	$y = -0,7276x + 4,4801$	0,9676
	RECOL 19	$y = -0,6953x + 4,3087$	0,9855
Uvaia (<i>E. pyriformis</i>)	RECOL 20	$y = -0,7316x + 4,4739$	0,9898
	RECOL 29	$y = -0,6933x + 4,2160$	0,9650
Pequi (<i>C. brasiliense</i>)	RECOL 42	$y = -0,8017x + 5,0667$	0,8276
Glicerol bruto de biodiesel	LEV1	$y = -0,5956x + 3,4697$	0,8508
	LEV2	$y = -0,5325x + 3,2640$	0,9342
Caldo de cana-de-açúcar	BB9	$y = -0,9085x + 5,6575$	0,9496

Como observado na [Tabela 2.1](#) todas as equações de correlação ajustaram retas com r^2 que variou de 0,7616 a 0,9898. Pode-se, portanto, afirmar que um dos resultados do metabolismo do glicerol pelas leveduras avaliadas foi a acidificação do meio, diretamente proporcional com a densidade óptica. Essa acidificação também

acontece em cultivos com leveduras utilizando como fonte de carbono sacarose ou glicose, que tem como subprodutos do metabolismo desses açúcares, ácidos orgânicos (Basso et al., 2011). O menor pH observado foi com a RECOL 15, com pH final de 2.55. Já a levedura que menos acidificou o meio de cultivo com o consumo de glicerol, foi a RECOL 12, que teve um pH final de 5,62 (Tabela 2.1).

Leveduras com resistência a ambientes mais ácidos, são interessantes para o setor industrial, por serem capazes de manter suas características e suas estruturas sem alterar as cargas dos sítios ativos de suas enzimas (Rita, 2002).

Com todos os parâmetros cinéticos já determinados, concluindo a capacidade dessas linhagens selecionadas de metabolizar o glicerol PA como fonte de carbono, as amostras retiradas durante as cinéticas, serão posteriormente analisadas por cromatografia líquida de ultra *performance* (UPLC), para estabelecer os metabólitos formados do consumo de glicerol como única fonte de carbono.

Também faz se necessário o uso de glicerol bruto do biodiesel, para conhecer o perfil cinético de crescimento de leveduras nesse tipo de substrato, com uma análise dos compostos orgânicos e inorgânicos existentes nesse substrato.

2.4 Conclusões

Todas as leveduras avaliadas caracterização cinética em meio mineral quando o glicerol foi a única fonte de carbono.

A linhagem *P. kudriavzevii* LEV2 foi a que apresentou melhores parâmetros cinéticos, com a maior velocidade de crescimento celular com $\mu_{\text{máx}}$ de $0,3705 \pm 0,061 \text{ h}^{-1}$, menor tempo menor de geração celular (TG = 1.87 h), demonstrando boa capacidade de adaptação em glicerol PA a 10% como substrato, evidenciado por *lag* fase de apenas 2 h, atingindo a fase estacionária com 20 h de experimento. Entretanto a linhagem BB9, isolada de caldo de cana, apresentou perfil muito próximo

A RECOL 19 foi a que apresentou menor velocidade de reação com $\mu_{\text{máx}}$ de $0,0911 \pm 0,0007 \text{ h}^{-1}$, com o maior tempo de geração com reflexo de uma fase lag bastante longa, indicando baixa adaptação ao glicerol PA como fonte de carbono.

Em relação à avaliação do potencial hidrogeniônico (pH), no metabolismo do glicerol PA, como fonte de carbono, pelas leveduras avaliadas nesse estudo, concluiu que esse metabolismo acidifica o meio de cultivo conforme ocorre em meios contendo açúcares como fonte de carbono.

2.5 Referências

- Abad, S., Xavier, T. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. Elsevier. Research review paper. Bioengineering Department, Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull. Barcelona, 2012.
- ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural, e Biocombustíveis). (2013) *Anuário Estatístico Brasileiro de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis*. Índice. Brasil.
- Basso, T. O., Tonso, A., Gombert, A. K. (2011). Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva. Tese. Biotecnologia. USP: São Paulo.
- Camargo, J. Z. (2013). Estudo da Fisiologia das diferentes leveduras isoladas da Região Centro-Oeste. *Dissertação*. Ciências e Tecnologia Ambiental. UFGD: Dourados.
- Costa, J. B. (2010) Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação de biodiesel. *Dissertação*. Química. UFRGS: Porto Alegre.
- Daré, R. M. (2008). Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol. *Dissertação*. Engenharia Química. UFSCar: São Carlos.
- Ding, W.-T., Zhang, G.-C., Liu, J.-Ji. (2013). Truncation of the GPD1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield and productivity. *American Society for Microbiology*. Key Laboratory of Systems Bioengineering of Ministry of Education, Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin, People's Republic of China.
- Duque, J. A. P. (2011). Design and analysis of technological schemes for glycerol conversion to added value products. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Ingeniería Eléctrica, Electrónica y Computación. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Fonseca, G. G. (2007). Análise de Fluxos Metabólicos em *Kluyveromyces marxianus* utilizando substratos marcados com ^{13}C . 288 f. Tese (Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, USP.

- Franco, P. F., Fávaro, L. C. L., Almeida, J. R. M. (2012). Novas leveduras e enzimas para a produção de biocombustíveis e químicos. *X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC*. Embrapa Agroenergia: Brasília.
- French, C. E. (2009). Synthetic Biology and biomass conversion: a match made in heaven? *Journal of the Royal Society. Interface. J. R. Soc. Interface*.
- Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., Nishio, N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after Biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), 260–265.
- Kirtadze, E., Nutsubidze, N. (2009). Metabolic potential of alcoholic fermentation yeasts. *Bulletin of The Georgian National Academy of Sciences*, 3(1).
- Lobão, E. A crise do petróleo e os biocombustíveis. Ministério de Minas e Energia. Brasil, 2011.
- Lopes, M. B. (2009). Análise dos canais de distribuição de etanol carburante brasileiro: um estudo exploratório. *Dissertação*. Engenharia de Produção. UFSCar: São Carlos.
- Matuda, T. G., Netto, F. M. (2005). Caracterização Química Parcial da Semente de Jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). **SciELO**. Ciências Tecnologia Alimentos. Campinas.
- Oliveira, J. S., Antoniassi, R., Freitas, S. C., Müller, M. D. (2013). Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. *Ciência Rural*, 43(3), 509-512.
- Orij, R., Brul, S., Smits, G. J. (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). General Subjects* 1810(10), 933-944. Systems Biology of Microorganisms. Molecular Biology and Microbial Food Safety, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam. Amsterdam.
- Rampi J. C. L. Avaliação de metabolismo de leveduras em meio sólido e líquido utilizando glicerol comercial como única fonte de carbono. *Dissertação*. Biotecnologia. UCDB: Campo Grande, 2013.
- Rita, F. (2002). Desempenho de um reator Uasb em escala piloto para o tratamento anaeróbico de líquidos percolados de resíduos sólidos urbanos. *Dissertação*. Engenharia Química. UFSC: Florianópolis.
- Rodrigues, R. A., Accarini, J. H. (2011). Brazil's Biodiesel Program. *Biofuels in Brazil: realities and prospects*. Brasil.

- Rodrigues, D. A., Vinhas, G. M. (2011). Uso da glicerina na produção fermentativa de 1,3-propanodiol pelo *Clostridium acetobutyricum* ATCC 4259. XIX CONIC, III CONITI, VII JOIC. UFPE: Recife.
- Rossi, D.M., Costa, J. B.; Souza, E. A. de, Peralba, M. C. R., Samios, D., Ayub, M. A. Z. (2011). Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(8), 4814-4819.
- Santos, E. A., Silva, J. A. L. (2013). Influência da aplicação foliar de cálcio e boro em pré e pós-floração sobre os componentes de produção e na produtividade da soja. *Dissertação. Agronomia. UFPI: Teresina.*
- Silva, R. O., Batistote, M., Cereda, M. P. (2011). Wild strains of fermenting yeast isolated of sugar cane juice from an alcohol distillery from Mato Grosso, Brazil. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2(3), 22-27.
- Silva, R.O., Batistote, M., Cereda, M. P. Avaliação de leveduras selvagens em condições de estresse temperatura. *Revista SODEBRAS*, v. 8, p. 46-52, 2013
- Silva, V. C. F. Efeito da radiação ultravioleta em microrganismos, composição físico-química e isolamento de leveduras selvagens resistentes em caldo de cana-de-açúcar variedade RB-867515, *Dissertação Biotecnologia: 2010.*
- Silva, G. V. (2013). Caracterização experimental do efeito combinado de aditivos no desempenho de misturas biodiesel-óleo diesel. *Tese. Ciências Mecânicas. UB: Brasília.*
- Sluszz, T., Machado, J. A. D. (2006). Características das potenciais culturas matérias-primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. *Scielo Proceedings. Pós-Graduação em Agronegócios da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEPAN-UFRGS). An. 6. Enc. Energ. Meio Rural.*
- Tabosa, M., Soares, L., Saavedra, G. (2009). Utilização do glicerol como fonte de carbono em fermentação submersa. *XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal.*
- Tsao, G. T., *Elementary Principles of Microbial Reaction Engineering. Microbial Technology: Microbial Processes. 2nd ed., Vol. II. Copyright 1979 by Academic Press. Inc. ISBN 0-12-551502-2.*
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration an alcoholic fermentation. *Yeast*, 8, 501-517.

3 CINÉTICAS DE CRESCIMENTO, CONSUMO DE SUBSTRATO E FORMAÇÃO DE PRODUTO DE LEVEDURAS EM GLICOSE, FRUTOSE E SACAROSE COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO

Resumo

Melhorias significativas de produção de álcool são necessárias a fim de reduzir os custos de produção e tornar o álcool mais competitivo. Diante dessa expectativa de selecionar as mais eficientes para metabolização de açúcares e produção de etanol, cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto foram avaliadas para 15 linhagens de leveduras isoladas pela Rede Centro-Oeste de Leveduras em substrato contendo glicose, frutose e sacarose como fonte única de carbono. Resultados mostraram que as leveduras *S. cerevisiae* PG, PG1 e PPG são as mais promissoras devido aos parâmetros cinéticos obtidos. Dada às condições de aerobiose plena em que se realizaram os cultivos, não é possível de antemão lançar um novo candidato melhor que *S. cerevisiae* CAT-1 para a fermentação industrial, pois esta última possui formação máxima de etanol superior às demais.

Palavras-chave: Fisiologia, Açúcares, Glicose, Frutose; Sacarose, Etanol.

3.1 Introdução

O Brasil tem por tradição a produção de cana-de-açúcar desde o século XVIII, consolidando como alternativa energética no século XX ([Sales et al., 2010](#)), levando a ser o maior produtor de cana do mercado, beneficiado da disponibilidade de áreas agriculturáveis sem concorrência com a produção de alimentos.

O plantio extensivo da cana era somente para a produção de açúcar, vindo o Brasil a ser o maior produtor de açúcar do mundo ([Koo e Taylor, 2012](#)). No entanto, após o aumento do barril do petróleo, deu início da conversão do mel residual da produção de açúcar em etanol como alternativa energética. Atualmente o Brasil produz 60% do etanol mundial ([Lima et al., 2009](#)).

O setor sucroalcooleiro no Brasil teve uma maior atividade no mercado, quando em 1931, o Governo Vargas tornou obrigatória a mistura de 5% de álcool na gasolina, por meio de decreto de lei ([Almeida, 2009](#)). Posteriormente, houve a criação do Programa Nacional do Álcool ou *Proálcool* em 1975 pelo decreto nº

76.593 (Andrade et al., 2009), que estimulou a produção de etanol com a obrigatoriedade de adição de até 22% de etanol na gasolina.

Além da incorporação de uma porcentagem de etanol na gasolina, o que fez a produção obter avanços significativos, houve incentivo para a indústria automotiva na contemplação do sistema flex nas novas frotas de carro, despontando no uso do etanol carburante a partir da cana-de-açúcar como principal biocombustível no país (Lopes, 2009). A produção de etanol é originada de processos fermentativos, na qual 61% do etanol mundial decorre da fermentação de açúcares e matérias-primas como cana-de-açúcar, beterraba e melaço, enquanto os outros 39% vem de grãos (Gutierrez, 1991).

As leveduras têm grande habilidade de metabolizar a sacarose, principal açúcar encontrado na cana, e transformar em etanol por meio anaeróbio. A sacarose é um dissacarídeo não redutor formado por moléculas de glicose e de frutose unidas através da ligação glicosídica (Dário, 2012). O metabolismo dos dissacarídeos na levedura *Saccharomyces cerevisiae* é precedido pela sua hidrólise e produção dos respectivos monômeros, podendo ocorrer em duas vias, fora da célula, no espaço periplasmático, e/ou dentro da célula, após o transporte do dissacarídeo.

O metabolismo desse dissacarídeo é diferente para as espécies de leveduras. Mesmo que todas tenham a capacidade de produção de etanol, os metabólitos formados se diferenciam, assim como o rendimento de etanol, produção de biomassa e tolerância a estresses ocorridos no meio de cultivo. Com isso setores industriais estão constantemente investindo no desenvolvimento de linhagens de leveduras mais adequadas aos seus interesses (Badotti, 2005).

A seleção de cepas com diversidade genética isoladas de diferentes materiais pode ser utilizada para a seleção de cepas industriais, mas para isso estas devem ser avaliadas em condições padronizadas (Fonseca, 2007). Estudos cinéticos possibilitam a determinação das velocidades de transformações que ocorrem durante o consumo do substrato e a formação de biomassa e produtos, permitindo estabelecerem-se parâmetros por meio de equações matemáticas e correlacioná-los (Daré, 2008).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os parâmetros cinéticos de 15 linhagens de leveduras da Rede Centro-Oeste de Leveduras durante o crescimento exponencial em meio definido contendo glicose, frutose e sacarose como única fonte de carbono, a 30°C.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Leveduras e manutenção

Foram estudadas 15 linhagens de leveduras: 6 isolados bioprospectados de frutos (*Saccharomyces cerevisiae* L32, L34, L36 e L38, de lobeira (*Solanum lycocarpum*); *S. cerevisiae* B32 e BARU, de baru (*Dipteryx alata* Vogel)) (Oliveira, 2013), 5 isoladas de mosto de cana-de-açúcar (*S. cerevisiae* PG, PG1 e PPG) (Silva, 2010) e LB e LBB (não publicado) e 4 isoladas da Usina Barralcool (*Pichia kudriavzevii* BB10, BB11 e BB12; BB16 - não identificada) no município de Barra do Bugres - MT (Silva et al., 2011, 2013). As leveduras foram mantidas em ágar YPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L).

3.2.2 Meio de cultura

O meio mineral (Verduyn et al., 1992) 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; elementos-traço (EDTA, 15 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,84 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg; $\text{Na}_2 \cdot \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 mg; H_3BO_3 , 1,0 mg; KI, 0,1 mg). Foi ajustado para pH 6,0 com NaOH antes de autoclavado (121°C, 20 min). O meio foi resfriado a temperatura ambiente e uma solução filtro-esterilizada de vitaminas preparada em água desmineralizada foi adicionada, a uma concentração final por litro de: D-biotina, 0,05 mg; pantotenato de cálcio, 1,0 mg; ácido nicotínico, 1,0 mg; mio-inositol, 25 mg; tiamina HCl, 1,0 mg; piridoxina HCl, 1,0 mg; e ácido para-aminobenzóico, 0,20 mg. A fonte de carbono (glicose, frutose ou sacarose) foi esterilizada separadamente (121°C, 20 min) e adicionada à concentração final de 10 g/L.

3.2.3 Pré-cultivos e cultivos em incubador rotativo

Para o pré-cultivo foi transferida uma colônia da placa de Petri contendo a linhagem selecionada para um frasco tipo Erlenmeyer com 200 mL de meio mineral estéril, com pH ajustado a 6,0 (Verduyn et al., 1992). Os pré-cultivos foram realizados em agitador orbital (Tecnal TE- 420 Incubadora) a 30°C e 200 rpm até que a final da fase exponencial de crescimento fosse atingida. Os cultivos principais foram realizados em duplicada em condições idênticas aos pré-cultivos, a partir de uma alíquota do pré-cultivo, tendo-se utilizado uma densidade óptica (DO) inicial ($\lambda=600\text{nm}$) de 0,1 (Fonseca, 2007). Porém cada cultivo principal foi finalizado ao atingir-

se a fase estacionária de crescimento, a partir da medida das DOs obtidas no espectrofotômetro.

3.2.4 Amostragens e preparo das amostras

Amostragens foram realizadas em média a cada 1 h para a determinação do pH e da biomassa. Alíquotas de 2 mL foram filtradas sob pressão positiva utilizando-se filtros de seringa de acetato celulose com membrana de 0,45 µm para a remoção de células e obtenção de sobrenadante para a determinação das concentrações de açúcares e metabólitos extracelulares. Os sobrenadantes foram acondicionados em microtubos tipo Eppendorf revestidos com filme plástico do tipo parafilm e armazenados a -20°C até sua utilização.

3.2.5 Determinação do pH, da biomassa e das concentrações de açúcares e metabólitos extracelulares

O pH foi obtido por meio de aferições potenciostáticas (Hanna Instruments Ph 21). A determinação da biomassa foi realizada a cada hora, com 1 ml do meio de cultivo, sendo estabelecida indiretamente pela medida da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (BioResearch do Brasil, BioPhotometer plus), como função da DO como forma de estimar, de maneira rápida, a concentração celular e acompanhar o crescimento microbiano ([Costa, 2010](#)).

A amostra do meio de cultura foi diluída na proporção de 1:10 com água, e a leitura realizada a 600 nm. A variação da densidade celular obtida como DO em relação ao tempo foi usada para estabelecer uma equação de curva de crescimento, e a correlação avaliada pelo coeficiente de correlação linear (R^2). Os valores de absorbância medidos foram convertidos em valores mássicos utilizando uma relação linear de 0,50 unidade de densidade ótica por grama de massa celular seca ([Fonseca, 2007](#)).

As amostras foram descongeladas e transferidas para recipientes do tipo vial (Clear snap top vial, 2 ml) a fim de determinar-se as concentrações de açúcar remanescente no meio e dos metabólitos formados por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) (UPLC Agilent 1290) em uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm; Bio-Rad, Hercules, EUA). A coluna foi eluída a 55 °C empregando-se água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) a 0,005 M como fase móvel a uma vazão de 0,6 ml/min⁻¹. Estes compostos foram detectados por

absorbância UV a 254 nm conectado em série com um detector refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados (Fonseca, 2007).

3.2.6 Determinação de parâmetros durante fase exponencial de crescimento

A fase exponencial de crescimento (FEC) foi identificada como a região linear da plotagem da densidade ótica (DO) em função do tempo. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max}) foi determinada pela inclinação da reta, pelo quociente do \ln (DO) pelo tempo, obtendo a correlação da reta (R^2), onde o coeficiente (a) da equação da reta é igual ao μ_{\max} . O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi determinado como a inclinação da linha obtida pela plotagem de X em função do S, incluindo exclusivamente pontos pertencentes à FEC. A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\mu_S = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \quad \text{Eq. 1}$$

sendo μ_{\max} = velocidade específica de crescimento máxima (1/h); X = concentração celular (g MCS/L), considerando-se $X = DO \times 0,5$; μ_S = velocidade específica de consumo de substrato durante a FEC (g/(g MCS h)); S = concentração de substrato (g/L); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato a células durante a FEC (g MCS/g); MCS = massa celular seca.

Todos os cálculos foram realizados para cada duplicata e expressos pela média da duplicata.

3.3 Resultados e discussão

As leveduras utilizadas neste estudo foram isoladas de frutas, que tem uma composição nutricional natural para leveduras, com grande variedade de enzimas (Oliveira, 2013) e do caldo de cana e mosto industrial, ricos em açúcares fermentescíveis (Silva, 2010; Silva et al., 2011, 2013).

Entre elas, *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie predominante. Esta levedura desempenha um papel já bem consolidado no processo industrial de

fermentação alcoólica com cana-de-açúcar no Brasil (Lima et al., 2009). Também foram selecionadas 3 linhagens de *Pichia kudriavzevii* BB10, BB11 e BB12 (Oliveira, 2013), que tem a capacidade de crescer nos substratos selecionados (Franco et al., 2012). Apenas a levedura BB16 ainda não foi identificada.

Estudos cinéticos foram elaborados com as 15 linhagens em três diferentes açúcares (glicose, frutose e sacarose). A cinética de crescimento foi avaliada através da medição da DO, estabelecendo-se curvas de crescimento que permitiram identificar as fases de crescimento e calcular os parâmetros cinéticos. Os cultivos até a fase estacionária duraram entre 11 a 16 h, dependendo da levedura e da fonte de carbono utilizada, o que permitiu a exploração das questões relacionadas à adaptação de cada linhagem ao substrato, uma vez que as demais variáveis permaneceram controladas.

3.3.1 Parâmetros cinéticos em glicose

A Tabela 3.1 apresenta esses parâmetros cinéticos para cada levedura tendo a glicose como única fonte de carbono.

Os maiores valores obtidos para a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) em glicose foram obtidos nas leveduras isoladas do caldo da cana, *S. cerevisiae* PG e *S. cerevisiae* PPG, com valores de μ_{\max} de 0,53 e 0,51 h⁻¹, respectivamente. Seus valores de μ_{\max} foram semelhantes ao reportado para *S. cerevisiae* CAT-1, utilizada em processo industrial, com μ_{\max} igual a 0,517 (Camargo, 2013; Anexo). Estes valores são bastante superiores aos encontrados para uma série de outras leveduras cultivadas em condições semelhantes, contudo são inferiores àqueles indicados na literatura para as leveduras BB1 e BB2 (Anexo).

O tempo de replicação da *S. cerevisiae* PG (1,48 h) e *S. cerevisiae* PPG (1,34 h) foram calculados a partir de seus valores de μ_{\max} .

No entanto, os valores máximos de produção de etanol foram inferiores ao da levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1, que produz 0,872 (g L⁻¹) (Camargo, 2013), enquanto *S. cerevisiae* PG atinge 0,435 (g L⁻¹) e a *S. cerevisiae* PPG 0,466 (g L⁻¹).

Os resultados de Barford e Hall (1981) já mostraram em um μ_{\max} de 0,455, com o fator de conversão de substrato a células de 0,162 (g g⁻¹) e etanol produzido na concentração de 0,368 (g L⁻¹) a partir da fermentação de glicose (10 g/L). Ressalta-se que os valores do presente trabalho foram obtidos de cultivos realizados em plena aerobiose, que não favorecem a formação de etanol.

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos de cultivo de 15 linhagens de leveduras em meio mineral tendo glicose na concentração 10% como única fonte de carbono. Cultivos realizados a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm (média de 2 repetições).

Levedura	Tempo (h)	pH final	DO _{máx}	TD (h)	$\mu_{máx}$ (h ⁻¹)	μ_s (g (g h) ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	EtOH _{máx} (g L ⁻¹)	Tempo EtOH (h)*
<i>S. cerevisiae</i> L32	11	2,86	5,46 ± 0,03	1,53	0,47 ± 0,01	1,01 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,45 ± 0,09	5
<i>S. cerevisiae</i> L34	12	2,76	6,35 ± 0,26	1,53	0,46 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,45 ± 0,04	6
<i>S. cerevisiae</i> L36	12	2,77	6,09 ± 0,16	1,36	0,49 ± 0,01	1,10 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,47 ± 0,00	3
<i>S. cerevisiae</i> L38	12	2,71	6,06 ± 0,06	1,40	0,49 ± 0,02	1,59 ± 0,77	0,24 ± 0,02	0,42 ± 0,02	4
<i>S. cerevisiae</i> LB	12	2,85	7,23 ± 0,32	1,48	0,47 ± 0,00	0,52 ± 0,08	0,35 ± 0,07	0,35 ± 0,09	6
<i>S. cerevisiae</i> LBB	12	2,76	7,35 ± 0,49	1,58	0,44 ± 0,03	0,74 ± 0,01	0,35 ± 0,07	0,43 ± 0,05	3
<i>S. cerevisiae</i> PG	12	2,62	8,27 ± 0,13	1,49	0,53 ± 0,01	0,52 ± 0,08	0,40 ± 0,06	0,44 ± 0,00	1
<i>S. cerevisiae</i> PG1	11	3,00	6,49 ± 0,55	1,46	0,47 ± 0,01	0,52 ± 0,12	0,29 ± 0,07	0,55 ± 0,06	1
<i>S. cerevisiae</i> PPG	11	2,87	5,94 ± 0,34	1,35	0,51 ± 0,00	0,55 ± 0,01	0,37 ± 0,04	0,47 ± 0,11	1
<i>P. kudriavzevii</i> BB10	13	2,71	8,23 ± 0,16	1,50	0,47 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,70 ± 0,19	0,16 ± 0,05	10
<i>P. kudriavzevii</i> BB11	14	2,64	9,26 ± 0,06	1,59	0,48 ± 0,00	0,34 ± 0,12	0,45 ± 0,00	0,44 ± 0,01	3
<i>P. kudriavzevii</i> BB12	16	2,71	9,06 ± 0,31	1,86	0,38 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,54 ± 0,04	0,28 ± 0,02	1
BB16	15	2,70	12,47 ± 0,10	1,46	0,47 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,27 ± 0,09	1
<i>S. cerevisiae</i> B32	11	2,97	7,55 ± 0,07	1,38	0,50 ± 0,01	0,71 ± 0,02	0,40 ± 0,00	0,41 ± 0,01	1
<i>S. cerevisiae</i> BARU	12	2,90	6,76 ± 0,05	1,49	0,46 ± 0,00	0,59 ± 0,10	0,36 ± 0,01	0,44 ± 0,01	4

Onde: DO_{máx}: densidade óptica máxima; TD (h): tempo de duplicação; $\mu_{máx}$: velocidade específica máxima de crescimento; μ_s : velocidade específica de consumo de substrato (g (g h)⁻¹); Y_{X/S}: fator de conversão de substrato a células (g g⁻¹); EtOH_{máx}: concentração máxima de etanol (g L⁻¹). *Tempo para o início da produção de etanol.

O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) das leveduras *S. cerevisiae* PG e PPG também foram maiores do que aqueles obtidos com as demais linhagens de *S. cerevisiae* deste estudo (Tabela 3.1) e do que *S. cerevisiae* CAT-1 (Camargo, 2013; Anexo). Este dado indica sua elevada capacidade de conversão do açúcar glicose em células (Tabela 3.1). Mendes et al. (2013) com o objetivo de produção de biomassa, encontrou em meio aerado, com leveduras *S. cerevisiae*, $Y_{X/S}$ igual a $0,41(\text{g g}^{-1})$, para maximizar a reprodução das células e minimizar a formação de etanol (Malta, 2006). Este valor é muito semelhante ao encontrado com as leveduras *S. cerevisiae* PG e PPG, com valores de $Y_{X/S}$ iguais a 0,40 e 0,37 (g.g^{-1}), respectivamente, em condições de plena aerobiose.

Contudo os maiores valores de $Y_{X/S}$ foram obtidos para a espécie *Pichia kudriavzevii* (BB10, BB11 e BB12) e a linhagem BB16, o que nos dá um indicativo que a mesma possa também pertencer a esta espécie. A conversão em biomassa também pode ser observado pelos maiores valores de $\text{DO}_{\text{máx}}$ de *P. kudriavzevii* (e a linhagem não identificada BB16) em relação as linhagens de *S. cerevisiae* avaliadas neste estudo (Figura 1).

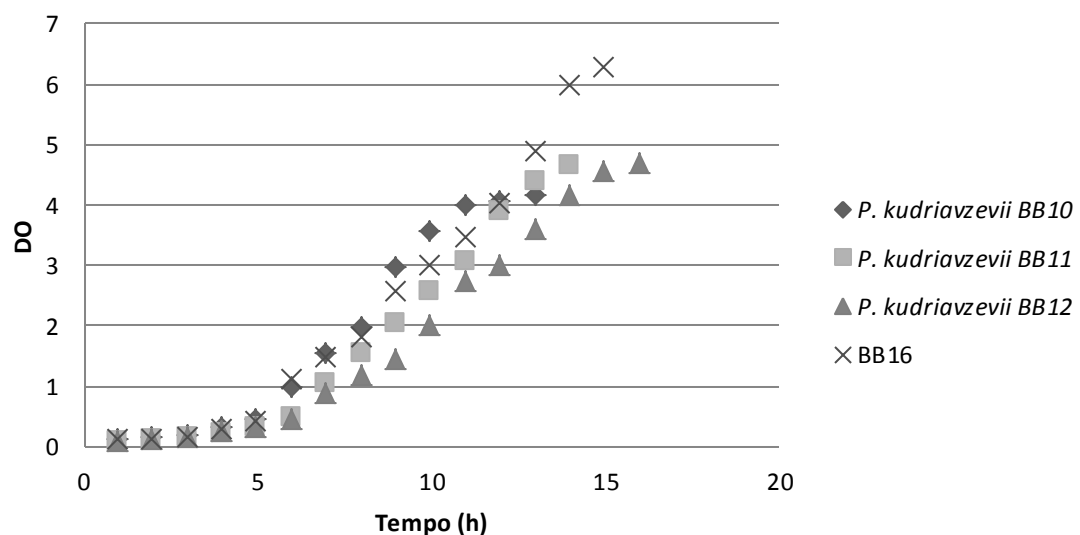


Figura 3.1. Cinética de crescimento das leveduras isoladas do caldo de cana, *P. kudriavzevii* (BB10, BB11, e BB12) e BB16, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicose na concentração 10% como única fonte de carbono (valores com a média de 2 repetições).

O comportamento cinético dessas 4 leveduras foi bastante semelhante, com uma fase lag (fase de adaptação ao meio de cultivo) entre 3 a 5 h, e uma velocidade específica de crescimento (μ_{\max}) igual a 0,37 (h^{-1}) para a *P. kudriavzevii* BB12, 0,48 (h^{-1}) para a *P. kudriavzevii* BB11, e 0,47 (h^{-1}) para a *P. kudriavzevii* BB10 e levedura BB16. Esses valores demonstram um bom mecanismo de replicação utilizando glicose como fonte de carbono, quando comparados ao encontrado por [Fredlund et al. \(2004\)](#), que em glicose, obtiveram um μ_{\max} de 0,22 (h^{-1}) para a levedura *Pichia anomala* NRRL-Y-366-8 (CBS 1984) em aerobiose ([Anexo](#)).

A levedura *P. kudriavzevii* BB10 foi a que obteve o maior valor de conversão de substrato a células ($Y_{x/s}$ de 0,70) encontrado no estudo. Quando comparadas, por exemplo, com as leveduras *P. anomala* NRRL-Y-366-8 (CBS 1984) e *P. stipitis* CBS 7126, com valores de $Y_{x/s}$ igual a 0,59 e 0,23, respectivamente ([Fredlund et al., 2004](#); [Ligthelm et al., 1988](#); [Anexo](#)).

A comparação do $Y_{x/s}$ das leveduras *P. kudriavzevii* com os valores obtidos para as *S. cerevisiae* revela um metabolismo puramente oxidativo, reforçado pela menor concentração máxima de etanol obtida (0,16 g L^{-1}). A linhagem BB16 e *P. kudriavzevii* BB12 foram as que na sequência produziram menos etanol (0,27 e 0,28 g L^{-1} , respectivamente). A menor conversão de glicose em etanol, diante que a alta eficiência de conversão de substrato a biomassa, como observado nessas leveduras, indica que sua rota metabólica é mais focada no crescimento celular (metabolismo respiratório) ([Liu, 2011](#)). Ou seja, essas leveduras utilizam o substrato mais eficientemente para a produção celular do que as outras linhagens em estudo. Resta saber como estas linhagens se comportariam em anaerobiose, porém tais condições não foram aqui testadas.

Já se esperava das *S. cerevisiae* nos morfotipos PG, PG1 e PPG, e das *Pichia kudriavzevii* nos morfotipos BB10, BB11 e BB12, o melhor desempenho, por serem linhagens isoladas do caldo de cana, suscitando maior afinidade com o meio de cultivo, em relação as outras linhagens isoladas de frutos.

As linhagens que apresentaram maior velocidade de consumo de substrato foram as advindas de frutas, onde os maiores valores obtidos foram com as leveduras isoladas do fruto da lobeira. Posteriormente, as isoladas do baru, também mostraram valores de μ_s superiores aquelas isoladas do caldo de cana. A [Figura 3.2](#) que reúne as curvas de crescimento das linhagens isoladas dos frutos.

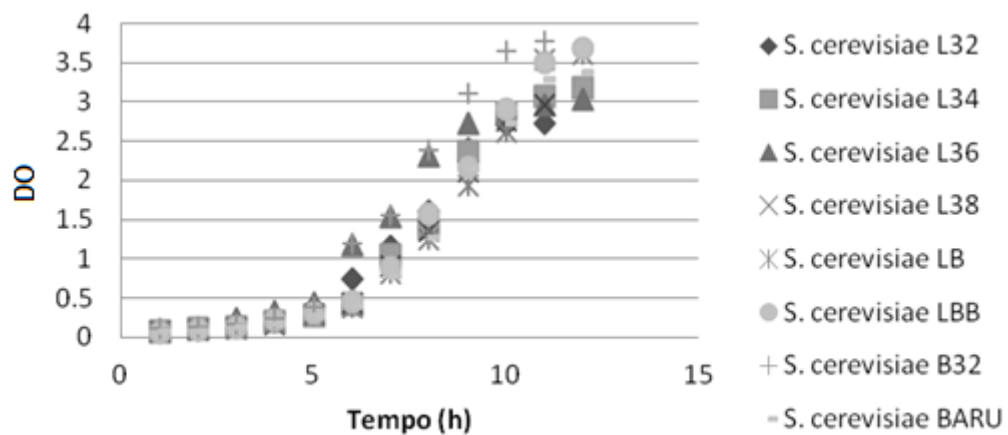


Figura 3.2. Cinética de crescimento das leveduras isoladas de frutos, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicose na concentração 10% como única fonte de carbono (valores com a média de 2 repetições).

A levedura *S. cerevisiae* L38, isolada do fruto da lobeira, foi a que apresentou maior velocidade específica de consumo da glicose, com valor de μ_s igual a 1,59 g (g.h)⁻¹, valor similar ao encontrado por [Camargo \(2013\)](#) em leveduras isoladas de frutas, com valores em média de 1,7 g (g.h)⁻¹ para as leveduras *S. cerevisiae* RECOL 37, 39 e 41.

O perfil cinético das leveduras isoladas de frutos foi similar, com uma fase lag com duração de 2-3 h, com tempo de replicação de células de 1,4 h (em média), atingindo a fase estacionária entre 11 a 12 h de cultivo.

A levedura *S. cerevisiae* B32 representa no grupo dos isolados de frutos a linhagem com o maior valor máximo de biomassa produzida (3,77 g/L) em 11 h de cultivo. A fase de adaptação ao meio (fase lag), observada nessa linhagem foi de 3 h. Esse dado destaca sua capacidade de replicação celular neste meio mineral com glicose como única fonte de carbono, demonstrando afinidade a este tipo de ambiente. Seu tempo de geração foi de 1,37 h, com uma velocidade de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) de 0,5 ± 0,01 h⁻¹.

Mesmo com as leveduras isoladas de frutos apresentando maiores valores de μ_s , mostrando uma relação de afinidade maior ao substrato, não foram nessas linhagens que ocorreu o maior valor de produção de etanol, i.e, não houve “overflow” do metabolismo de respiratório para fermentativo devido à alta taxa de consumo de

glicose. Isto em parte ocorreu na levedura *S. cerevisiae* PG1, isolada do caldo de cana e com metabolismo respiro-fermentativo, que obteve produção máxima de etanol de 0,553 g L⁻¹. Contudo este valor é pontual e não remete ao rendimento indicado na literatura, onde o processo de produção de etanol é na ordem de conversão estequiométrica de 0,511 g de etanol (g hexose)⁻¹ (Basso, 2011). De qualquer forma houve grande eficiência na produção e consumo de ATP por parte de *S. cerevisiae* PG1, com pouca energia sendo deslocada para a manutenção celular.

As cinéticas de formação de etanol para as diferentes linhagens são apresentadas na [Figura 3.3](#).

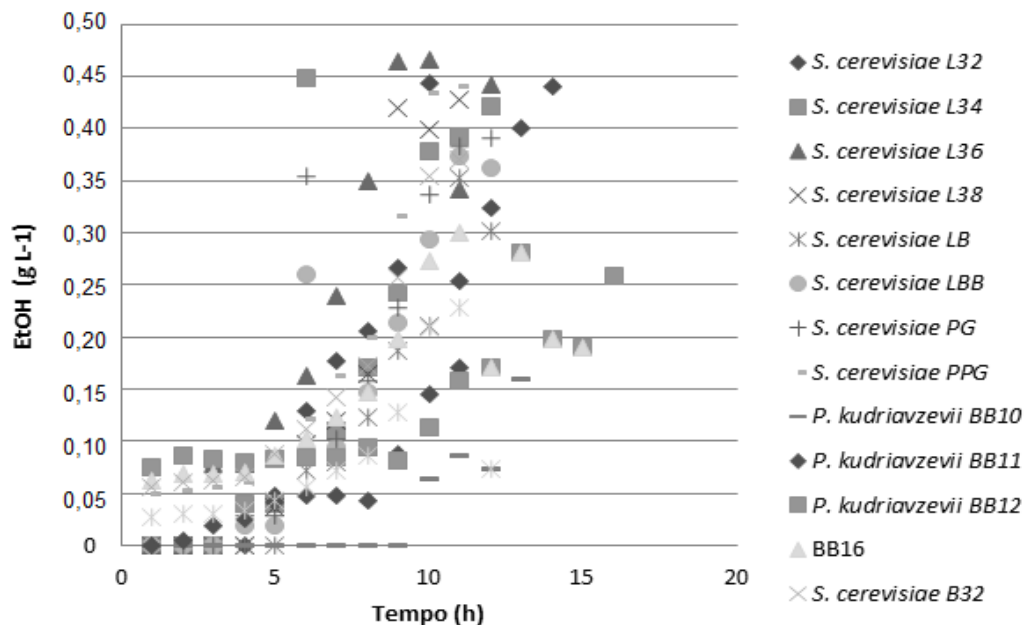


Figura 3.3. Taxa de produção de etanol em leveduras cultivadas a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo glicose na concentração 10% como única fonte de carbono.

As *Saccharomyces* em estudo tiveram os valores máximos de produção de etanol, entre 0,41 a 0,47 g L⁻¹, com exceção da *S. cerevisiae* PG1. No entanto o tempo para desencadear a conversão de glicose em etanol foi menor nas leveduras isoladas do caldo de cana ([Tabela 3.1](#)), onde na primeira hora do experimento, essas já estavam realizando a conversão para etanol do substrato.

Este comportamento foi observado na levedura *P. kudriavzevii* BB12, na qual também produziu etanol desde a primeira hora de experimento, no entanto sua produção foi bem inferior aos resultados observados para as diferentes *S. cerevisiae*. A levedura *P. kudriavzevii* BB11 teve um tempo de início de conversão de glicose em etanol de 3 h, entretanto a sua produção máxima foi padrão ao encontrado pelas *S. cerevisiae* avaliadas, com $\text{EtOH}_{\text{máx}}$ de $0,442 \text{ g L}^{-1}$.

O pH inicial para todos os experimentos foi igual a 6,0, e pode observar que todos os meios de cultivos com as leveduras houve a acidificação do meio. Este provavelmente foi promovido da formação de ácidos orgânicos do metabolismo da glicose, mesmo que estes ácidos voltaram a ser reabsorvidos, contribuíram nessa acidificação (Zel-Seydim et al., 2000; Nobre, 2005).

O ácido orgânico mais formado do catabolismo da glicose, entre as leveduras avaliadas, foi o ácido láctico (dados não mostrados). Todas as leveduras provenientes de frutos (*S. cerevisiae* de morfotipos L32-L38, LB, LBB e BARU) formaram o ácido láctico da fermentação com glicose como fonte de carbono. Os ácidos orgânicos (succínico, fumárico, piruvato e acético), também foram verificados nos cultivos usando glicose como fonte de carbono.

As leveduras *S. cerevisiae* PPG, *P. kudriavzevii* BB11 e a linhagem BB16 formaram como metabólitos da fermentação alcoólica, o glicerol. A formação desse composto pode estar associada à manutenção do equilíbrio redox celular, quando ocorre formação de biomassa, ácidos orgânicos, e/ou estresse osmótico diante a concentração alta de açúcares (Daré, 2008).

3.3.2 Parâmetros cinéticos em frutose

Em função da velocidade de consumo (μ_s) da fonte de carbono, velocidade específica de crescimento de cada levedura ($\mu_{\text{máx}}$), e da maior ou menor adaptação (fase lag) em determinado substrato, os cultivos duraram entre 11 a 15 h (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Parâmetros cinéticos de cultivo de 15 linhagens de leveduras em meio mineral tendo frutose na concentração 10% como única fonte de carbono. Cultivos realizados a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm (média de 2 repetições).

Levedura	Tempo (h)	pH final	DO _{máx}	TD (h)	$\mu_{máx}$ (h ⁻¹)	μ_s (g (g h) ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	EtOH _{máx} (g L ⁻¹)	Tempo EtOH (h)*
<i>S. cerevisiae</i> L32	12	3,71	7,44 ± 0,18	1,34	0,53 ± 0,06	0,88 ± 0,02	0,58 ± 0,00	0,40 ± 0,09	6
<i>S. cerevisiae</i> L34	11	2,85	6,24 ± 0,01	1,38	0,50 ± 0,01	0,89 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,28 ± 0,02	6
<i>S. cerevisiae</i> L36	11	2,89	6,42 ± 0,15	1,32	0,53 ± 0,03	1,03 ± 0,10	0,34 ± 0,01	0,41 ± 0,04	3
<i>S. cerevisiae</i> L38	11	2,95	6,21 ± 0,21	1,41	0,49 ± 0,01	0,81 ± 0,09	0,32 ± 0,01	0,37 ± 0,02	3
<i>S. cerevisiae</i> LB	12	2,92	7,84 ± 0,05	1,59	0,43 ± 0,00	0,72 ± 0,06	0,50 ± 0,00	0,37 ± 0,04	7
<i>S. cerevisiae</i> LBB	13	2,83	8,24 ± 0,33	1,49	0,46 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,30 ± 0,02	5
<i>S. cerevisiae</i> PG	11	2,79	6,97 ± 0,05	1,25	0,55 ± 0,02	0,50 ± 0,04	0,50 ± 0,00	0,40 ± 0,06	5
<i>S. cerevisiae</i> PG1	12	3,04	5,95 ± 0,07	1,42	0,49 ± 0,01	0,60 ± 0,08	0,48 ± 0,05	0,38 ± 0,00	3
<i>S. cerevisiae</i> PPG	11	2,87	6,51 ± 0,01	1,29	0,54 ± 0,01	0,67 ± 0,15	0,52 ± 0,03	0,34 ± 0,03	6
<i>P. kudriavzevii</i> BB10	15	2,90	8,50 ± 0,27	1,82	0,38 ± 0,01	0,68 ± 0,04	0,47 ± 0,02	0,21 ± 0,04	11
<i>P. kudriavzevii</i> BB11	13	2,71	7,73 ± 0,35	1,41	0,49 ± 0,02	1,11 ± 0,19	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,02	5
<i>P. kudriavzevii</i> BB12	13	2,85	9,00 ± 0,21	1,35	0,51 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,61 ± 0,07	0,21 ± 0,01	9
BB16	15	2,79	11,20 ± 0,28	1,48	0,47 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,82 ± 0,19	0,11 ± 0,01	7
<i>S. cerevisiae</i> B32	12	3,03	7,24 ± 0,16	1,42	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,04	0,43 ± 0,04	0,11 ± 0,03	5
<i>S. cerevisiae</i> BARU	11	3,01	7,26 ± 0,08	1,41	0,50 ± 0,02	0,59 ± 0,18	0,41 ± 0,05	0,30 ± 0,02	4

Onde: DO_{máx}: densidade óptica máxima; TD (h): tempo de duplicação; $\mu_{máx}$: velocidade específica máxima de crescimento; μ_s : velocidade específica de consumo de substrato (g (g h)⁻¹); Y_{X/S}: fator de conversão de substrato a células (g g⁻¹); EtOH_{máx}: concentração máxima de etanol (g L⁻¹). *Tempo para o início da produção de etanol.

Em frutose pode-se observar também que os cultivos das 15 leveduras levaram um tempo maior para entrar na fase estacionária em relação às curvas de crescimento utilizando glicose. Assim como em glicose os valores de biomassa foram menores para as leveduras isoladas de frutos (Figura 3.4). Todas as leveduras foram capazes de fermentar a frutose, no entanto com rendimentos de etanol menores aos observados em glicose.

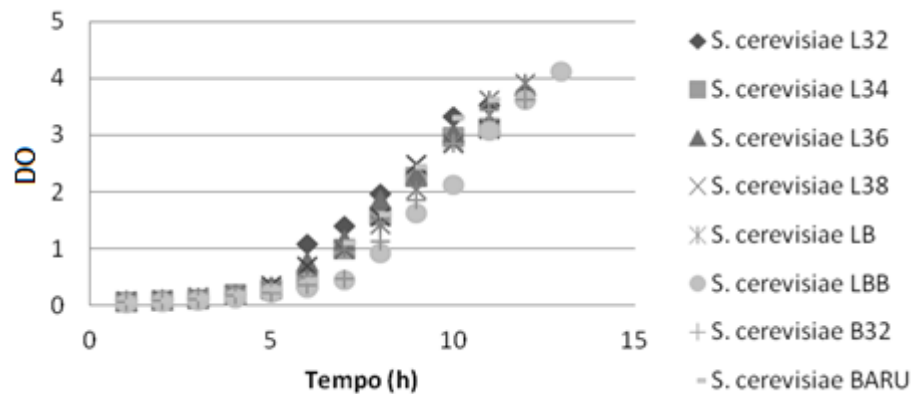


Figura 3.4. Cinética de crescimento das leveduras isoladas de frutos, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral.

Observa-se no Figura 3.4 que as 8 linhagens de leveduras isoladas de frutos apresentaram os mesmos perfis na fase de adaptação ao meio de cultivo, mostrando afinidades semelhantes no crescimento celular, fato esse confirmado no tempo de geração celular e do $\mu_{\text{máx}}$ desse grupo, na qual foram bastante próximos, como observado na Tabela 3.2. No entanto, a levedura *S. cerevisiae* L36 foi a que apresentou os melhores parâmetros cinéticos desse grupo de isolados de frutos.

A levedura *S. cerevisiae* L36 foi a que obteve a maior velocidade de crescimento celular com $\mu_{\text{máx}}$ de $0,53 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, menor tempo de geração celular (TG = 1,31 h), demonstrando boa capacidade de adaptação em frutose a 10% como substrato, evidenciado pela fase *lag* de apenas 2 h, atingindo a fase estacionária com 11 h de experimento.

Foi também a linhagem que apresentou maior produção de etanol ($0,41 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$) em frutose em relação a todas as leveduras avaliadas no mesmo substrato e nas mesmas condições de cultivo. Constando também o menor tempo de transformação de substrato em etanol, já que em 3 h de cultivo, já estava acontecendo a fermentação alcoólica, apesar das condições de plena aerobiose.

A literatura mostra valores maiores de etanol produzido por leveduras, com frutose como fonte de carbono. Na concentração de 91,1 g/L a levedura *S. cerevisiae* CCTCC M201022 produziu 0,81 g L⁻¹ de etanol. Mesmo que nessas concentrações de frutose a formação de etanol seja mais alta, o rendimento dessa produção é menor, já que precisa de um valor alto de açúcar por etanol formado. Para desenvolver um bioprocessamento competitivo é necessário menor quantidade de matéria-prima por produto formado, otimizando todo o processo produtivo (Oka et al., 2013; Bideaux, et al., 2006).

Shafaghat et al. (2009) produziu levedura 0,66 g L⁻¹ de etanol, através do metabolismo da levedura *S. cerevisiae* PTCC 24860 em uma concentração 15 g/L de frutose, um rendimento maior de etanol por substrato.

No grupo de leveduras isoladas de frutos também se destaca a levedura *S. cerevisiae* L32 diante dos parâmetros cinéticos de consumo de frutose apresentados.

Seu desempenho para a produção de etanol foi o segundo valor mais alto avaliado de isolados de frutos. Com produção de 0,396 g L⁻¹ de etanol, apresentou um tempo de geração celular e de velocidade específica de crescimento igual ao apresentado pela *S. cerevisiae* L36. Seu tempo de transformação de substrato a etanol também foi maior, com início depois de 6 h de experimento (Tabela 3.2).

No entanto, sua produção de biomassa foi maior, com um fator de conversão de substrato a células de 0,58 g.g⁻¹, atingindo uma densidade óptica máxima de 7,44 ± 0,183 em 12 h de cultivo, até atingir a fase estacionária.

Semelhantes dados de $\mu_{m\acute{a}x}$ foram observados por Oka et al. (2013) em *S. cerevisiae* com a mesma concentração de frutose (10 g/L). Os valores reportados pelos autores com a levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1 e com a levedura *S. cerevisiae* RECOL 41 foram de 0,47 ± 0,007 (h⁻¹) e 0,44 ± 0,002 (h⁻¹), respectivamente. Estes valores estão próximos à média encontradas em 5 linhagens de *S. cerevisiae* do estudo.

O grupo das leveduras *S. cerevisiae* isoladas do caldo de cana (Figura 3.5) foram as que tiveram maior afinidade com o substrato. Apresentaram um perfil cinético com uma fase lag curta, com os menores tempos de geração celular das leveduras avaliadas em frutose. Seus valores para velocidade de consumo de substrato (μ_s) e produção de etanol foram acima da média avaliada, mas não os maiores valores encontrados.

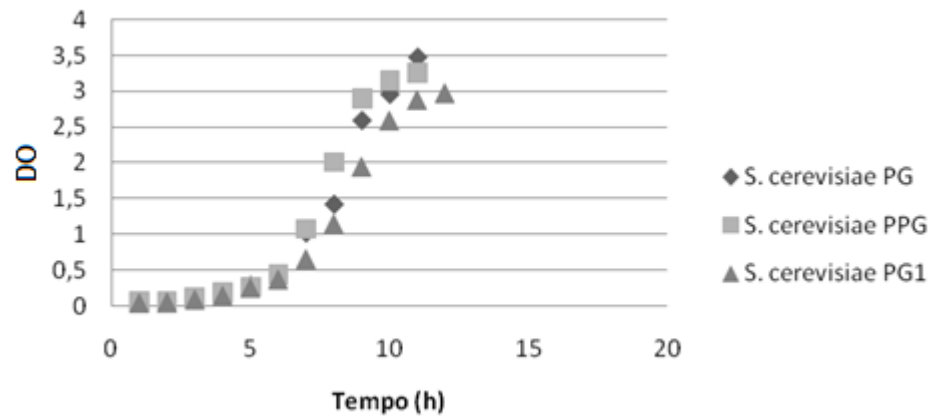


Figura 3.5. Cinética de crescimento de leveduras *Saccharomyces* isoladas de caldo de cana, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral.

O conjunto relativo às leveduras *P. kudriavzevii* (com morfotipos BB10, BB11, e BB12) e a levedura BB16, exibiram os índices de conversão de substrato a células ($Y_{x/s}$) bem elevados, dados esses que remetem, consequentemente, a presença dos maiores valores de biomassa nos cultivos com frutose (Figura 3.6).

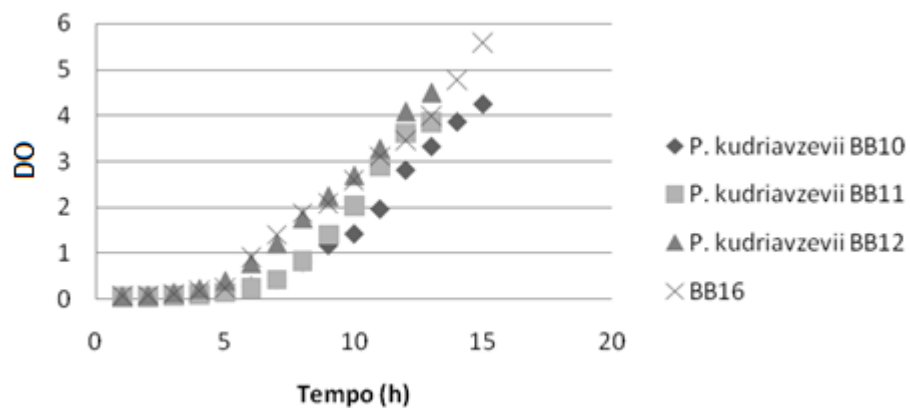


Figura 3.6. Cinética de crescimento das leveduras isoladas de caldo de cana, cultivadas em a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm em meio mineral tendo frutose na concentração 10% como única fonte de carbono (valores com a média de 2 repetições).

O destaque desse grupo fica por conta da levedura BB16, que em 15 h de cultivo atingiu uma DO de $11,2 \pm 0,282 \text{ g L}^{-1}$, com um tempo de geração celular de 1,48 h, dado que a velocidade específica de consumo do substrato nessa levedura

(μ_s), no valor de $0,11 \pm 0,02$ (g h^{-1}), foi a mais baixa dos parâmetros exibidos das leveduras avaliadas.

Seu $\mu_{\text{máx}}$ foi de $0,47 \pm 0,02$ (h^{-1}), um perfil similar às demais leveduras, e sua produção de etanol foi inversamente proporcional à taxa de biomassa. Com o menor valor de produção de etanol evidenciado, em razão de iniciar a produção de etanol somente no tempo de 7 h, e atingir o valor máximo de produção de etanol após 15 h de experimento.

Por outro lado, *P. kudriavzevii* BB11 exibiu uma concentração de etanol elevada em relação aos valores encontrados nas 8 leveduras *S. cerevisiae* avaliadas. Por ser menos provável cepas de *P. kudriavzevii* com alto teor alcoólico, leveduras *S. cerevisiae* são os microrganismos mais representativos nos processos industriais de fermentação alcoólica, por geralmente obterem parâmetros rentáveis na produção de etanol (Barbosa et al., 2010; Ostergaard et al., 2000).

3.3.3 Parâmetros cinéticos em sacarose

A Tabela 3.3 apresenta os parâmetros cinéticos para cada levedura tendo a sacarose como única fonte de carbono. Destaca-se que as *S. cerevisiae* PG, PG1 e PPG foram novamente aquelas que apresentaram maior $\mu_{\text{máx}}$, juntamente com *P. kudriavzevii* BB11 ($0,53 \text{ h}^{-1}$). *S. cerevisiae* isoladas de frutos também novamente tiveram as maiores valores de μ_s , especialmente *S. cerevisiae* L32 e L38 com 2,47 e 2,17 (g (g h)^{-1}). O $Y_{X/S}$ foi maior para as 3 linhagens de *P. kudriavzevii* e isolado BB16. Este último também apresentou maior $DO_{\text{máx}}$ em sacarose. A concentração de etanol foi em média inferior àquela encontrada para glicose e frutose.

Diferenças quanto à formação de etanol (e outros metabólitos) podem ser relacionadas às diferenças de oxigênio dissolvido, ocasionadas por diferentes taxas de aeração e/ou agitação dos meios. Espera-se que quanto maior a oxigenação do meio, maior a velocidade específica de consumo de substrato e formação de biomassa. Contudo a hidrólise da sacarose, normalmente em ambiente extracelular pela invertase, é responsável pelo aumento das concentrações de glicose e frutose produzidas (Myers et al., 1997), que podem reprimir a expressão dos transportadores de hexoses, incrementar os ciclos fúteis e conseqüentemente aumentar o gasto energético, além de que menos carbono é direcionado para a produção de etanol, diminuindo portanto o rendimento da fermentação (Stambuk et al., 1999).

Tabela 3.3. Parâmetros cinéticos de cultivo de 15 linhagens de leveduras em meio mineral tendo sacarose na concentração 10% como única fonte de carbono. Cultivos realizados a 30°C, com velocidade de agitação de 200 rpm (média de 2 repetições).

Levedura	Tempo (h)	pH final	DO _{máx}	TD (h)	$\mu_{máx}$ (h ⁻¹)	μ_s (g (g h) ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	EtOH _{máx} (g L ⁻¹)	Tempo EtOH (h)*
<i>S. cerevisiae</i> L32	12	2,56	6,38 ± 0,03	1,53	0,47 ± 0,01	2,47 ± 0,05	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,06	5
<i>S. cerevisiae</i> L34	12	2,44	6,92 ± 0,08	1,53	0,45 ± 0,02	1,88 ± 0,07	0,24 ± 0,03	0,35 ± 0,11	4
<i>S. cerevisiae</i> L36	12	2,84	6,62 ± 0,00	1,36	0,51 ± 0,00	1,96 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,48 ± 0,00	1
<i>S. cerevisiae</i> L38	13	2,71	6,42 ± 0,30	1,40	0,50 ± 0,01	2,17 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,14 ± 0,10	6
<i>S. cerevisiae</i> LB	11	2,35	7,23 ± 0,28	1,48	0,44 ± 0,01	1,47 ± 0,03	0,30 ± 0,06	0,48 ± 0,04	3
<i>S. cerevisiae</i> LBB	13	2,77	9,02 ± 0,09	1,58	0,45 ± 0,01	1,41 ± 0,12	0,32 ± 0,02	0,24 ± 0,33	7
<i>S. cerevisiae</i> PG	12	2,61	8,59 ± 0,34	1,49	0,52 ± 0,01	1,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,02 ± 0,00	7
<i>S. cerevisiae</i> PG1	11	2,75	8,97 ± 0,04	1,46	0,52 ± 0,02	1,73 ± 0,05	0,30 ± 0,05	0,05 ± 0,04	8
<i>S. cerevisiae</i> PPG	11	3,09	7,03 ± 0,37	1,35	0,53 ± 0,02	1,51 ± 0,11	0,35 ± 0,04	0,04 ± 0,01	5
<i>P. kudriavzevii</i> BB10	13	2,82	6,26 ± 0,37	1,50	0,46 ± 0,05	0,75 ± 0,04	0,61 ± 0,02	0,24 ± 0,12	9
<i>P. kudriavzevii</i> BB11	14	2,73	8,24 ± 0,03	1,59	0,53 ± 0,01	1,26 ± 0,05	0,42 ± 0,02	0,04 ± 0,01	6
<i>P. kudriavzevii</i> BB12	16	2,56	9,51 ± 0,30	1,86	0,39 ± 0,00	0,78 ± 0,04	0,50 ± 0,03	0,24 ± 0,03	9
BB16	16	2,49	11,51 ± 0,01	1,46	0,46 ± 0,01	0,96 ± 0,09	0,48 ± 0,02	0,31 ± 0,02	10
<i>S. cerevisiae</i> B32	11	3,01	7,18 ± 0,09	1,38	0,50 ± 0,01	1,39 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,41 ± 0,01	1
<i>S. cerevisiae</i> BARU	12	2,94	6,96 ± 0,00	1,49	0,50 ± 0,02	1,52 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,19 ± 0,01	5

Onde: DO_{máx}: densidade óptica máxima; TD (h): tempo de duplicação; $\mu_{máx}$: velocidade específica máxima de crescimento; μ_s : velocidade específica de consumo de substrato (g (g h)⁻¹); Y_{X/S}: fator de conversão de substrato a células (g g⁻¹); EtOH_{máx}: concentração máxima de etanol (g L⁻¹). *Tempo para o início da produção de etanol.

3.4 Conclusão

As leveduras *S. cerevisiae* PG, PG1 e PPG mostraram-se as mais promissoras devido aos parâmetros cinéticos desejáveis obtidos. Dada às condições de aerobiose plena em que se realizaram os cultivos, não é possível de antemão lançar um novo candidato melhor que *S. cerevisiae* CAT-1 para a fermentação industrial, pois esta última possui formação máxima de etanol superior as demais. *P. kudriavzevii* pode ser considerada a mais adequada para a utilização em processos fermentativos visando a produção de biomassa, contudo mais estudos são necessários devido ao caráter clínico em geral apresentado pela espécie.

3.5 Referências

- Almeida, J. C. (2009). A indústria sucroalcooleira-energética e os recursos hídricos: rio Santo Antônio Grande, Alagoas. *Dissertação*. Recursos Hídricos e Saneamento. UFS: Alagoas.
- Andrade, E. T., Carvalho, S. R. G., Souza, L. F. (2009). Programa do Proálcool e o Etanol no Brasil. *Engevista*, 11(2), 127-136.
- Badotti, F., Stambuk, B. U., Sant'anna, E. (2005). Caracterização de populações de leveduras associadas à produção de cachaça artesanal e estudos bioquímicos do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertação*. Ciência dos Alimentos. UFSC: Florianópolis.
- Barbosa, A. S., Florentino, E. R., Florêncio, I. M., Araújo, A. S. (2010). Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 5(1), 7-25.
- Barford, J. P., Hall, R. J. (1981). A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory capacity. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1735-1762.
- Basso, T. O., Tonso, A., Gombert, A. K. (2011). Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva. *Tese*. Biotecnologia. USP: São Paulo.
- Bideaux, C., Alfenore, S., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., Uribelarrea, J. L., Guillouet, S. E. (2006). Minimization of glycerol production during the high-performance fed-batch ethanolic fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*, using a metabolic model as a prediction tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2134-2140.

- Camargo, J. Z. (2013). Estudo da Fisiologia das diferentes leveduras isoladas da Região Centro-Oeste. *Dissertação*. Ciências e Tecnologia Ambiental. UFGD: Dourados.
- Costa, J. B. (2010) Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação de biodiesel. *Dissertação*. Química. UFRGS: Porto Alegre.
- Daré, R. M. (2008). Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol. *Dissertação*. Engenharia Química. UFSCar: São Carlos.
- Dário, M. G. (2012). Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo em *Saccharomyces cerevisiae*. *Tese*. Biotecnologia. USP: São Paulo.
- Fonseca, G. G. (2007). Análise de Fluxos Metabólicos em *Kluyveromyces marxianus* utilizando substratos marcados com ^{13}C . *Tese*. Biotecnologia. USP: São Paulo.
- Franco, P. F., Fávaro, L. C. L., Almeida, J. R. M. (2012). Novas leveduras e enzimas para a produção de biocombustíveis e químicos. *X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC*. Embrapa Agroenergia: Brasília.
- Fredlund, E., Blank, L. M., Schnurer, J., Sauer, U., Passoth V. (2004). Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5905-5911.
- Gutierrez, L. E. (1991). Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. *Anais ESALQ*. Piracicaba.
- Koo, W. W., Taylor, R. D. (2012). Outlook of the U.S. and World Sugar Markets, 2011-2021. Center for Agricultural Policy and Trade Studies. *Agribusiness & Applied Economics Report*, 692.
- Ligthelm, M. E., Prior, B. A., Preez J. C. (1988). The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28: 63-68.
- Lima, S. A., Sales, A., Moretti, J. P., Santos, T. J. (2009). Análise de argamassas confeccionadas com a cinza do bagaço da cana-de-açúcar em substituição ao agregado miúdo. *Revista Tecnológica, edição especial*, 87-97.
- Liu, Z. L. (2011). Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(3), 809-25.

- Lopes, M. B. (2009). Análise dos canais de distribuição de etanol carburante brasileiro: um estudo exploratório. *Dissertação*. Engenharia de Produção. UFSCar: São Carlos.
- Malta, H. L., Maia, A. B. R. A., Oliveira, E. S. (2006). Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique. *Dissertação*. Ciência de Alimentos. UFMG: Belo Horizonte.
- Mendes, T. A. O., Pinto, L. M., Malta, H. L., Oliveira, E. S. (2013). Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16(2), 81-89.
- Myers, D. K., Lawlor, D. T. M., Attfield, P. V. (1997). Influence activity and glicerol syntesis and retention on fermentation of media with a hig sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 145.
- Nobre, T. P. (2005). Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Dissertação*. Ciências. USP: Piracicaba.
- Oka, M. L., Silva, C. A. A., Camargo, J. Z., Fonseca G. G. (2013). Kinectis of growth, sugar consumption and metabolites formation of yeasts isolated from the Brazilian mid-west region. *8° Congresso Internacional de Bioenergia*, São Paulo, SP.
- Oliveira, R. F. (2013). Leveduras com atividade de fermentação em caldo de cana, isoladas sob estresse, de frutos do Cerrado. *Dissertação*. Biotecnologia. UCDB: Campo Grande.
- Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 64(1), 34-50.
- Sales, A., Lima, S. A., Almeida, F. C. R., Moretti, J. P. (2010). Considerações ambientais e proposta de aproveitamento da cinza do bagaço da cana-de-açúcar para uso na infraestrutura urbana. *Pluris*.
- Shafaghat, H., Najafpour, G.D., Rezaei, P.S., Sharifzadeh, M. (2009). Growth kinetics and etanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 24860 on various carbon sources. *World Applied Sciences Journal*, 7(2), 140-144.
- Silva, V. C. F. (2010). Efeito da radiação ultravioleta em microrganismos, composição físico-química e isolamento de leveduras selvagens resistentes em

caldo de cana-de-açúcar variedade RB-867515. *Dissertação*. Biotecnologia. UCDB: Campo Grande.

Silva, R. O., Batistote, M. Cereda, M. P. (2011). Wild strains of fermenting yeast isolated of sugar cane juice from an alcohol distillery from Mato Grosso, Brazil. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2(3), 22-27.

Silva, R. O., Batistote, M., Cereda, M. P. (2013). Avaliação de leveduras selvagens em condições de estresse temperatura. *Revista Sodebras*, 8, 46-52.

Stambuk, B. U., Silva, M. A., Panek, A. D. E Araujo, P. S. (1999). Active -glicoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Letters*, 170, 105-110.

Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration an alcoholic fermentation. *Yeast*, 8, 501-517.

Zel-Seydim, Z. B. Seydim, G., A. C., Greene, A. K., Bodine, A. B. (2000). Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis* 13, 35-43.

4 CONCLUSÃO GERAL

A linhagem *P. kudriavzevii* LEV2 foi a que apresentou melhores parâmetros cinéticos, como maior velocidade de crescimento celular, demonstrando boa capacidade de adaptação em glicerol PA a 10% como substrato, evidenciado por *lag* fase de apenas 2 h, atingindo a fase estacionária com 20 h de experimento. Entretanto a linhagem BB9, isolada de caldo de cana, apresentou perfil muito próximo. As leveduras *S. cerevisiae* PG, PG1 e PPG mostraram-se as mais promissoras em cultivos em glicose, frutose e sacarose a 10% como fonte única de carbono, devido aos parâmetros cinéticos desejáveis obtidos. Dada às condições de aerobiose plena em que se realizaram os cultivos, não é possível de antemão lançar um novo candidato melhor que *S. cerevisiae* CAT-1 para a fermentação industrial, pois esta última possui formação máxima de etanol superior às demais. *P. kudriavzevii* pode ser considerada a mais adequada para a utilização em processos fermentativos visando a produção de biomassa, contudo mais estudos são necessários devido ao caráter clínico em geral apresentado pela espécie. Estudos em sacarose e em mosto industrial em anaerobiose são importantes para dar-se continuidade a este trabalho.

ANEXOS

Anexo 1. Parâmetros cinéticos de cultivos aeróbios descontínuos com diferentes leveduras em meios com glicose, frutose ou sacarose (e glicose mais frutose) como fonte de carbono.

Microrganismo	μ_{max}	YX/S	μ_S	YETH/S	Substrato	Referência
Glicose (GLC)						
<i>S. cerevisiae</i> Y41 (ATCC 38531)	0,29 ± 0,02	nd	nd	nd	GLC (5g/L)	Blomberg et al., 1988
BB1	0,570 ± 0,001	0,197 ± 0,026	5,949 ± 0,211	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
BB2	0,563 ± 0,001	0,418 ± 0,003	3,293 ± 0,130	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
BB9	0,179 ± 0,001	0,177 ± 0,002	0,962 ± 0,084	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 3	0,282 ± 0,001	0,241 ± 0,009	1,980 ± 0,053	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 9	0,449 ± 0,002	0,511 ± 0,000	1,121 ± 0,020	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 10	0,306 ± 0,002	0,323 ± 0,001	2,269 ± 0,078	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 12	0,408 ± 0,005	0,280 ± 0,003	1,354 ± 0,061	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 29	0,485 ± 0,001	0,364 ± 0,001	1,127 ± 0,086	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 37	0,526 ± 0,002	0,415 ± 0,007	1,711 ± 0,197	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 39	0,444 ± 0,004	0,400 ± 0,003	1,738 ± 0,055	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 41	0,464 ± 0,005	0,364 ± 0,001	1,711 ± 0,071	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 42	0,416 ± 0,001	0,403 ± 0,008	1,236 ± 0,002	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 43	0,372 ± 0,012	0,498 ± 0,010	0,850 ± 0,015	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
RECOL 44	0,349 ± 0,008	0,289 ± 0,005	1,054 ± 0,072	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
<i>S. cerevisiae</i> EBY.D149	0,46	nd	nd	nd	GLC (10g/L)	Boles et al., 1998
<i>S. cerevisiae</i> X2180	0,34	0,12	nd	nd	GLC (10g/L)	van Dijken et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> BAY.17	0,42	0,11	nd	nd	GLC (10g/L)	van Dijken et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> CBS 8066	0,44	0,12	nd	nd	GLC (10g/L)	van Dijken et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> CBS 8066	0,49	nd	nd	nd	GLC (10g/L)	Postma et al., 1989
<i>S. cerevisiae</i> T2-3D	0,45	nd	nd	nd	GLC (10g/L)	Zeeman et al., 1988
<i>S. cerevisiae</i> 248 UNSW 703100	0,455	0,162	nd	0,368	GLC (10g/L)	Barford e Hall, 1981
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK122	0,41	0,12	nd	nd	GLC (10g/L)	van Dijken et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	0,37	0,105	nd	nd	GLC (10g/L)	Gombert et al., 2001
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	0,38 ± 0,01	0,14 ± 0,00	nd	nd	GLC (20g/L)	Bakker et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	0,40	nd	nd	nd	GLC (20g/L)	Luttik et al., 1998
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	0,40 ± 0,01	nd	nd	nd	GLC (20g/L)	Flikw eert et al., 1999
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	0,44 ± 0,01	nd	nd	nd	GLC (20g/L)	van Hoek et al., 1998
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	0,29 ± 0,01	0,12 ± 0,01	nd	nd	GLC (20g/L)	Rodrigues et al., 2001
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	0,34	0,11	nd	0,34	GLC (20g/L)	Della-Bianca e Gombert, 2013
<i>S. cerevisiae</i> S288c	0,32	0,13	nd	0,38	GLC (20g/L)	Della-Bianca e Gombert, 2013
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	0,517 ± 0,001	0,241 ± 0,001	2,801 ± 0,059	nd	GLC (10g/L)	Camargo, 2013
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	0,36	0,15	nd	0,38	GLC (20g/L)	Della-Bianca e Gombert, 2013
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	0,34	0,12	nd	0,37	GLC (20g/L)	Della-Bianca e Gombert, 2013
<i>S. cerevisiae</i> BG-1	0,29	0,12	nd	0,37	GLC (20g/L)	Della-Bianca e Gombert, 2013
<i>S. cerevisiae</i> JP-1	0,32	0,13	nd	0,35	GLC (20g/L)	Della-Bianca e Gombert, 2013

<i>S. cerevisiae</i> Fleishmann	0,42	0,12	nd	0,35	GLC (20g/L)	Della-Bianca e Gombert, 2013
<i>S. cerevisiae</i> D5A	0,46	nd	3,90	nd	GLC (20g/L)	Bailey et al., 1982
<i>S. cerevisiae</i> TN1	0,41	0,092	nd	0,376	GLC (20g/L)	Nissen et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> Y 750	0,37	0,12	nd	0,40	GLC (20g/L)	Møler et al., 2001
<i>S. cerevisiae</i> TMB3001	0,44 ± 0,01	0,14	3,14 ± 0,05	nd	GLC (5g/L)	Sonderegger e Sauer, 2003
<i>S. cerevisiae</i> VL3c	0,6101	nd	nd	nd	GLC (50g/L)	Serra et al., 2005
<i>Debaryomyces hansenii</i> INETI CL18	0,447 ± 0,047	0,448 ± 0,093	nd	nd	GLC (10g/L)	Nobre et al., 1999
<i>Candida utilis</i> CBS 621	0,59	nd	nd	nd	GLC (10g/L)	Postma et al., 1989
<i>Candida utilis</i> CBS 621	0,53 ± 0,02	0,53 ± 0,01	nd	nd	GLC (20g/L)	Rodrigues et al., 2001
<i>Zygosaccharomyces baillii</i> ISA 1307	0,25 ± 0,02	0,29 ± 0,01	nd	nd	GLC (20g/L)	Rodrigues et al., 2001
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2359	0,41	nd	nd	nd	GLC (10g/L)	Zeeman et al., 1988
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	0,44	0,49	0,90	nd	GLC (10g/L)	Bellaver et al., 2004
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	0,56 ± 0,02	0,51 ± 0,02	1,095 ± 0,005	nd	GLC (10g/L)	Fonseca et al., 2007
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	0,495 ± 0,005	0,545 ± 0,005	0,908 ± 0,001	nd	GLC (10g/L)	Fonseca et al., 2013
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	0,49	0,53	0,92	nd	GLC (20g/L)	Fonseca et al., 2013
<i>S. kluyveri</i> Y 749	0,35	0,27	nd	0,11	GLC (20g/L)	Møler et al., 2001
<i>S. kluyveri</i> Y 708	0,47 ± 0,01	0,29 ± 0,01	nd	0,08 ± 0,02	GLC (20g/L)	Møler, 2001
<i>Pichia anomala</i> NRRL-Y-366-8 (CBS 1984)	0,22 ± 0,02	0,59 ± 0,13	nd	0,03 ± 0,004	GLC (20g/L)	Fredlund et al., 2004
<i>P. stipitidis</i> CBS 7126	nd	0,23	nd	0,26	GLC (40g/L)	Ligthelm et al., 1988
<i>Candida shehatae</i> CBS 2779	0,17	0,21	nd	0,33	GLC (40g/L)	Ligthelm et al., 1988
<i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460	0,31	0,14	nd	0,31	GLC (40g/L)	Ligthelm et al., 1988
<i>S. cerevisiae</i> CCTCC M201022	0,0945	0,22	nd	nd	GLC (85g/L)	Wang et al., 2004
<i>S. cerevisiae</i> PTCC 24860	0,45	0,043	nd	nd	GLC (15g/L)	Shafaghat et al., 2009
Frutose (FRU)						
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	0,47 ± 0,007	0,11 ± 0,006	3,74 ± 0,15	nd	FRU (10g/L)	Oka et al., 2013
<i>S. cerevisiae</i> RECOL 41	0,44 ± 0,002	0,16 ± 0,005	2,71 ± 0,01	nd	FRU (10g/L)	Oka et al., 2013
<i>S. cerevisiae</i> PTCC 24860	0,42	0,042	nd	0,66	FRU (15g/L)	Shafaghat et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i> CCTCC M201022	0,08	0,1922	nd	0,81	FRU (91,1g/L)	Wang et al., 2004
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	0,42	0,49	0,86	nd	FRU (10g/L)	Fonseca et al., 2013
Sacarose (SAC)						
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK122	0,38	nd	nd	nd	SAC (10g/L)	van Dijken et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> X2180	0,34	nd	nd	nd	SAC (10g/L)	van Dijken et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> BAY.17	0,42	nd	nd	nd	SAC (10g/L)	van Dijken et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> CBS 8066	0,42	nd	nd	nd	SAC (10g/L)	van Dijken et al., 2000
<i>S. cerevisiae</i> 248 UNSW 703100	0,545	0,175	nd	0,345	SAC (10g/L)	Barford e Hall, 1981
<i>S. cerevisiae</i> 248 UNSW 703100	0,55	0,16	nd	nd	SAC (10g/L)	Orlow ski e Barford, 1991
<i>S. cerevisiae</i> 248 UNSW 703100	0,45	0,15	nd	nd	GLC (5g/L) + FRU (5g/L)	Orlow ski e Barford, 1991
<i>S. cerevisiae</i> PTCC 24860	0,39	0,04	nd	0,58	SAC (15g/L)	Shafaghat et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i> CCTCC M201022	0,0887	0,2061	nd	nd	SAC (96,6g/L)	Wang et al., 2004
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	0,43	0,63	0,68	nd	SAC (10g/L)	Fonseca et al., 2013
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	0,42	0,48(0,37/0,56)	0,88	nd	GLC (10g/L) + FRU (10g/L)	Fonseca et al., 2013

Referências

- Abdel-Fattah, W. R., Fadil, M., Nigam, P., Banat, I.M. (2000). Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 531–535.
- Bailey, R. B., Benitez, T., Woodward A. (1982). *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to catabolite repression: use in cheese whey hydrolysate fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 631-639.
- Bakker, B. M., Bro, C., Kotter, P., Luttk, M. A. H., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (2000). The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4730–4737.
- Barba, D., Beolchini, F., Del Re, G., Di Giacomo, G., Veglió, F. (2001). Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochemistry*, 36, 531–536.
- Barford, J. P., Hall, R. J. (1981). A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory capacity. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1735-1762.
- Blomberg, A., Larsson, C., Gustafsson, L. (1988). Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in relation to physiological state. *Journal of Bacteriology*, 170(10), 4562-4568.
- Boles, E., de Jong-Gubbels, P., Pronk, J. T. (1998). Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *Journal of Bacteriology*, 180(11), 2875–2882.
- Delgenes, J. P., Moletta, R., Navarro, J. M. (1988). Fermentation of D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture by *Pichia stipitis* Y 7124: sugar tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 155-161.
- Della-Bianca, B. E., Gombert, A. K. (2013). Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104, 1083-1095.
- Flikweert, M. T., Kuyper, M., van Maris, A. J. A., Kotter, P., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (1999). Steady-state and transient-state analysis of growth and metabolite production in a *Saccharomyces cerevisiae* strain with reduced pyruvate-decarboxylase activity. *Biotechnology and Bioengineering* 66, 42–50.

- Fonseca, G. G., de Carvalho, N. M., Gombert, A. K. (2013). Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Fonseca, G. G., Gombert, A. K., Heinzle, E., Wittmann, C. (2007). Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. *FEMS Yeast Research*, 7, 422-435.
- Fredlund, E., Blank, L. M., Schnurer, J., Sauer, U., Passoth V. (2004). Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5905–5911.
- Gombert, A. K., dos Santos, M. M., Christensen, B., Nielsen, J. (2001). Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1441–1451.
- Grubb, C. F., Mawson, A. J. (1993). Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. *Biotechnology Letters* 15(6), 621–626.
- Ligthelm, M. E., Prior, B. A., Preez J. C. (1988). The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, 63-68.
- Lukondeh, T., Nicholas, A. E., Ashbolt, J., Rogers, P. L. (2005). Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 32, 284–288.
- Luttik, M A. H., Overkamp, K. M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(38/18), 24529–24534.
- Møler, K. (2001). Glucose metabolism in the petite-negative yeast *Saccharomyces kluyveri*.
- Møller, K., Tidemand, L. D., Winther, J. R., Olsson L. Piskur, J., Nielsen J. (2001). Production of a heterologous proteinase A by *Saccharomyces kluyveri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 216–219.

- Nissen, T. L., Hamann, C. W., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J., Villadsen, J. (2000) Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast*, 16, 463-474.
- Nobre, A., Lucas, C., Leão C. (1999). Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3594–3598.
- Oka, M. L., Silva, C. A. A., Camargo, J. Z., Fonseca G. G. (2013). Kinetics of growth, sugar consumption and metabolites formation of yeasts isolated from the Brazilian mid-west region. 8° Congresso Internacional de Bioenergia, São Paulo, SP.
- Orlowski, J. H., Barford, J. P. (1991). Direct uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous culture. *Journal of General Applied Microbiology*, 37, 215-218.
- Postma, E., Kuiper, A., Tomasow, F., Scheffers, A., Van Dijken, J. P. (1989). Competition for glucose between the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), 3214-3220.
- Ramakrishnan S., Hartley B. S. (1993). Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4230-4235.
- Rech, R., Cassini, C.F., Secchi, A., Ayub, M.A.Z. (1999). Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23, 91–96.
- Roca, C., Nielsen, J., Olsson, L. (2003). Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4732–4736.
- Rodrigues, F., Côte-Real, M., Leão, C., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (2001). Oxygen requirements of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in synthetic and complex media. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2123–2128.
- Serra, A., Strehaiano, P., Taillandier, P. (2005). Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), 257-65.

- Shafaghat, H., Najafpour, G.D., Rezaei, P.S., Sharifzadeh, M. (2009). Growth kinetics and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 24860 on various carbon sources. *World Applied Sciences Journal* 7(2), 140-144.
- Sonderegger, M., Jeppsson, M., Hahn-Hagerdal, B., Sauer U. (2004). Molecular basis for anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* on xylose, investigated by global gene expression and metabolic flux analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2307–2317.
- Sonderegger M., Sauer, U. (2003). Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1990–1998.
- van Dijken, J. P., Bauer, J., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J. M., Gancedo, C., Giuseppin, M. L. F., Heijnen, J. J., Hoare, M., Lange, H. C., Madden, E. A., Niederberger, P., Nielsen, J., Parrou, J. L., Petit, T., Porro, D., Reuss, M., van Riel, N., Rizzi, M., Steensma, H. Y., Verrips, C. T., Vindeløv, J., Pronk J. T. (2000). An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 706–714.
- van Hoek, P., Flikweert, M. T., van Der Aart, Q. J. M., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (1998). Effects of pyruvate decarboxylase overproduction on flux distribution at the pyruvate branch point in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2133–2140.
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte, W. H., van Dijken, J. P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(12), 3785-3792.
- Wang, D., Xu, Y., Hu, J., Zhao, G. (2004). Fermentation kinetics of different sugars by the apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Institute of Brewery*. 110(4), 340–346.
- Zeeman, A.-M., Luttik, M. A. H., Thiele, C., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., de Steensma H. Y. (1998). Inactivation of the *Kluyveromyces lactis* KIPDA1 gene leads to loss of pyruvate dehydrogenase activity, impairs growth on glucose and triggers aerobic alcoholic fermentation. *Microbiology*, 144, 3437–3446.