

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

JANINA ZANONI CAMARGO

**ESTUDO DA FISILOGIA DE DIFERENTES LEVEDURAS
INDUSTRIAIS E ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
FEVEREIRO/2013**

JANINA ZANONI CAMARGO

**ESTUDO DA FISIOLOGIA DE DIFERENTES LEVEDURAS
INDUSTRIAIS E ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE**

ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO GRACIANO FONSECA

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

**DOURADOS/MS
FEVEREIRO/201**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

576 Camargo, Janina Zanoni.
C172e Estudo da fisiologia de diferentes leveduras industriais e isoladas na região Centro-Oeste / Janina Zanoni Camargo – Dourados-MS : UFGD, 2013.
92 f.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade Federal da Grande Dourados.


1. Leveduras (fungos). 2. Microrganismo. 3. Saccharomyces cerevisiae. I. Título.



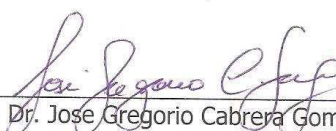
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Estudo da Fisiologia de Diferentes Leveduras Industriais e Isoladas na Região Centro-Oeste”**, de autoria de **Janina Zaroni Camargo**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
(Orientador-UFGD)
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Jose Gregorio Cabrera Gomez
Membro Examinador (USP)



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

Dourados/MS, 14 de fevereiro de 2013.

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços”.

Albert Einstein

Dedico, aos meus pais e irmãos, pela confiança depositada em mim, pelo incentivo e apoio aos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças para alcançar meus objetivos e sonhos me amparar e me confortar nos momentos difíceis.

Aos companheiros de laboratório, pela ajuda, companheirismo e amizade desfrutada nos dias e noites de trabalho, acompanhados sempre de muitas risadas e brincadeiras que me ajudaram muito durante esta caminhada. A pós-graduação já valeu pelos amizados que conquistei.

A um grande amigo que fiz, Roberto Araújo Bezerra, que sempre se disponibilizou a me ajudar e incentivar em todos os momentos, pela descontração e companheirismo.

Ao prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pela orientação, confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho.

A toda minha família pelo apoio e compreensão, principalmente a minha mãe, que sempre me incentivou mesmo nos momentos mais difíceis, com atenção e carinho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A UFGD pela formação profissional proporcionada.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

Metabólitos

3PG ou G3P	3-fosfoglicerato
ACA	acetaldeído
AcCoA	acetil coenzima A
ACE ou ACET	acetato
AKG	α -cetogluturato
AMP	monofosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
C1	unidade de 1 carbono
CO ₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
E4P	eritrose-4-fosfato
ETH ou EtOH	etanol
F6P	frutose-6-fosfato
FUM	fumarato
G6P	glicose-6-fosfato
G3P	gliceraldeído-3-fosfato
GLC	glicose
GLI	glicerol
LAC	lactato
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
OAA	oxalacetato
OGA	oxogluturato
P5P	pentose-5-fosfato
PEP	fosfoenolpiruvato
PYR	piruvato
R5P	ribose-5-fosfato
RNA	ácido ribonucléico
S7P	sedoepulose-7-fosfato
SUC	succinato
TRE	trealose

Subscritos e sobrescritos

cyt.....	citosólico
máx	máximo
mit	mitocondrial

Aminoácidos

Ala.....	alanina
Arg.....	arginina
Asn	asparagina
Asp.....	aspartato
Cys.....	cisteína
Gln.....	glutamina
Glu.....	glutamato
Gly	glicina
His	histidina
Ile	isoleucina
Leu	leucina
Lys.....	lisina
Met	metionina
Phe.....	fenilalanina
Pro.....	prolina
Ser.....	serina
Thr.....	treonina
Trp.....	triptofano
Tyr	tirosina
Val	valina

Símbolos

μ_{max}	velocidade específica de crescimento máxima
μ_s	velocidade específica de consumo de substrato
DT	tempo de duplicação
DO ₆₀₀	densidade óptica a 600 nm
MDV	vetor de distribuição de massa
SFL.....	soma dos fragmentos marcados

vvia metabólica
 $Y_{X/S}$ fator de conversão de substrato a células
 X concentração de biomassa
 X_{max} concentração máxima de biomassa

Demais abreviaturas

AA aminoácido
 AFM Análise de Fluxos Metabólicos
 CNL marcação normalizada do carbono
 DMF dimetilformamida
 EGP fase de crescimento exponencial
 EMP Embden-Meyerhof-Parnas (via metabólica)
 GC-MS Cromatografia gasosa-Espectrometria de massa
 MBDSTFA N-(terbutildimetilsilil)-N-metil-trifluoroacetamida
 MCS biomassa celular seca
 MM meio mineral
 NMR Ressonância Magnética Nuclear
 pb pares de bases
 PCR reação em cadeia da polimerase
 PP ou PPP Pentoses Fosfato (via metabólica)

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Análise morfológica das linhagens de leveduras estudadas.....	18
Tabela 2.2 Avaliação da capacidade de assimilação e fermentação dos isolados...23	
Tabela 2.3 Fermentação dos isolados BB1, BB2, BB9 e CAT-1 em diferentes intervalos de tempo.	26
Tabela 3.1 Parâmetros cinéticos de cultivo de diversas linhagens leveduras em meio mineral tendo glicose como fonte de carbono.....	36
Tabela 4.1 Abundâncias corrigidas dos isotopômeros de massa correspondentes a diferentes fragmentos de aminoácidos e SFLs obtidas a partir de cultivos de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em [1- ¹³ C] glicose.	56
Tabela 4.2 Demanda anabólica de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 durante cultivos em frascos agitados. Os dados são expressos em $\mu\text{mol}/(\text{g MCS})$ e foram calculados a partir da composição celular.....	60
Tabela 4.3 CNLs a partir de cultivos de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em frascos agitados ..	61
Tabela 4.4 Fluxos metabólicos medidos e calculados (moles por 100 moles de glicose consumidos) de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 durante cultivos em frascos agitados .	62
Tabela 4.1 Abundâncias corrigidas dos isotopômeros de massa correspondentes a diferentes fragmentos de aminoácidos e SFLs obtidas a partir de cultivos de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em [1- ¹³ C] glicose.	56
Tabela 4.2 Demanda anabólica de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 durante cultivos em frascos agitados. Os dados são expressos em $\mu\text{mol} (\text{g MCS})^{-1}$ e foram calculados a partir da composição celular.....	60
Tabela 4.3 CNLs a partir de cultivos de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 em frascos agitados ..	61
Tabela 4.4 Fluxos metabólicos medidos e calculados (moles por 100 moles de glicose consumidos) de <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 durante cultivos em frascos agitados .	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do produto amplificado por PCR de oito leveduras avaliadas neste estudo. Coluna M, marcador de peso molecular DNA <i>Ladder</i> 100 pb (Promega); colunas 1 a 8, leveduras isoladas 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 29, respectivamente; coluna 9 controle, negativo da PCR.	20
Figura 2.2 Tamanho dos produtos de PCR obtidos dos isolados de leveduras.	21
Figura 2.3 Assimilação e fermentação em diferentes substratos após 120 h de incubação.....	24
Figura 3.1 Produção máxima de etanol das linhagens estudadas.	38
Figura 3.2 Cinéticas de crescimento das linhagens industriais BB1, BB2 e BB9 tendo glicose como única fonte de carbono. Dados obtidos são referentes às médias obtidas em dois experimentos.....	40
Figura 3.3 Cinéticas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de metabólitos da levedura <i>S. cerevisiae</i> CAT-1. Dados obtidos são referentes às médias obtidas em dois experimentos.	41
Figura 3.4 Cinéticas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de metabólitos da levedura 37. Dados obtidos são referentes às médias obtidas em dois experimentos.....	42
Figura 3.5 Cinéticas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de etanol da levedura BB2. Dados obtidos são referentes às médias obtidas em dois experimentos.....	42
Figura 4.1 Distribuição de fluxos metabólicos em <i>S. cerevisiae</i> CAT-1 cultivada em frasco agitado com [1- ¹³ C] glicose como substrato limitante, sob condições aeróbias, com os dados de marcação e metabólitos extracelulares medidos durante o estado pseudo-estacionário. Todos os fluxos são relativos ao consumo de 100 unidades arbitrárias de glicose. Os valores dos fluxos para reações reversíveis estão indicados entre parênteses, representando uma fração do fluxo no sentido oposto da reação.	57

Resumo

A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura comumente utilizada industrialmente como agente da fermentação, destacando-se por realizar uma rápida conversão de açúcar em etanol e CO₂. Algumas leveduras utilizadas em processos industriais, mesmo pertencendo à mesma espécie, apresentam diferenças, tanto em termos genéticos quanto em sua fisiologia. Apesar do crescente conhecimento sobre as leveduras associada a produção de etanol, há uma falta da informação a respeito de seus metabolismo e fisiologia. Com isto, os objetivos do presente trabalho foram realizar a caracterização morfológica, molecular e fisiológica de diferentes linhagens de leveduras industriais e isoladas na Região Centro-Oeste, visando à produção de etanol; estudar a fisiologia das leveduras em termos do consumo de substratos, formação de metabólitos extracelulares e crescimento celular e investigar o metabolismo da levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1 através do uso da AFM utilizando glicose 1-¹³C marcada. Nas análises moleculares foi possível verificar que 41,3% dos isolados tinham 400 pares de base. Entre os isolados, 22% tiveram capacidade de fermentar a glicose em até 24 h, sendo a fonte de carbono de mais rápido crescimento quando comparado aos outros substratos. Em seguida, foi determinado parâmetros cinéticos e produção de metabólicos durante os cultivos usando meio mineral com glicose como fonte única de carbono, a 30°C. Entre as leveduras avaliadas pode-se verificar que a linhagem BB2 apresentou mais rápido crescimento ($\mu_{\max} = 0,563 \pm 0,001$ 1/h). Por fim, cultivos com 100% de [1-¹³C] glicose foram conduzidos para a elucidação dos fluxos metabólicos em *S. cerevisiae* CAT-1, onde verificou-se um metabolismo respiro-fermentativo.

Palavras-chave: caracterização, cinética, análises de fluxos metabólicos.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is the yeast species commonly used industrially as fermentation agent, distinguished by performing a rapid conversion of sugar into ethanol and CO₂. Some yeasts used in industrial processes, although belonging to the same species, differ both in terms of genetics and in their physiology. Despite the growing knowledge about the yeasts associated with ethanol production, there is a lack of information regarding their metabolism and physiology. With this, the objectives of this study were to characterize morphological, molecular and physiological different industrial yeast strains, isolated in the Brazilian Midwest Region, aiming at the production of ethanol and to study the physiology of yeast in terms of substrate consumption, training extracellular metabolites and cell growth and investigate the metabolism of industrial yeast *S. cerevisiae* CAT-1 through the use of AFM using ¹³C-1 labeled glucose. In molecular analyzes we found that 41.3% of isolates had 400 base pairs. Among the isolates, 22% had ability to ferment glucose within 24 h, as the carbon source for growth faster compared to other substrates. Then, kinetic parameters were determined and metabolic production during the cultivations using the mineral medium with glucose as the sole carbon source at 30 ° C. Among the yeasts evaluated can be seen that the strain BB2 showed faster growth ($\mu_{max} = 0.563 \pm 0.001$ 1 / h). Finally, 100% of crops with [1-¹³C] glucose were conducted to elucidate the metabolic fluxes in *S. cerevisiae* CAT-1, where there was a vent-fermentative metabolism.

Keywords: characterization, kinetics, metabolic flux analysis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 Objetivos	12
2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE LEVEDURAS ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO OESTE	13
2.1 Introdução	13
2.2 Materiais e métodos	15
2.3 Resultados e discussão.....	17
2.4 Conclusões.....	27
2.5 Referências	27
3 CRESCIMENTO, CONSUMO DE AÇÚCAR E FORMAÇÃO DE METABÓLITOS DURANTE CULTIVOS DE LEVEDURAS ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE	32
3.1 Introdução	32
3.2 Materiais e métodos	33
3.3 Resultados e discussão.....	36
3.4 Conclusões.....	43
3.5 Referências	43
4 ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> CAT-1 COM GLICOSE ¹³C MARCADA	47
4.1 Introdução	47
4.2 Materiais e métodos	49
4.3 Resultados e discussão.....	54
4.4 Conclusões.....	62
4.5 Referências	63
5 CONCLUSÕES GERAIS	66
6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA	67
ANEXOS	69
Anexo A Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do produto amplificado por PCR de leveduras isoladas industrialmente. Coluna M, marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Promega); colunas 1 a 4, leveduras BB1, BB2, BB9 e CAT-1.....	69
Anexo B Caracterização morfológica das linhagens avaliadas.	70

Anexo C Cinéticas de crescimento em glicose (linhagens <i>S. cerevisiae</i> Cat-1, BB1, BB2, BB9, 3, 9, 10, 12, 29, 37, 39, 41, da direita para a esquerda, de cima para baixo.....	71
Anexo D Dados experimentais referentes às cinéticas de crescimento.	72

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta dissertação apresenta as atividades realizadas pela aluna Janina Zanoni Camargo 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 2011 a fevereiro de 2013.

O texto foi estruturado de modo que cada capítulo corresponde-se 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. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de leveduras isoladas da Região Centro-Oeste;
- Capítulo 3. Crescimento, consumo de açúcar e formação de metabólitos durante cultivos de leveduras isoladas da Região Centro-Oeste;
- Capítulo 4. Análise de fluxos metabólicos de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 com glicose ^{13}C marcada.

1.1 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Caracterizar morfológica-, molecular- e fisiologicamente de diferentes linhagens de leveduras industriais e isoladas na Região Centro-Oeste, visando à produção de etanol;
- Estudar a fisiologia das leveduras em termos do consumo de substratos, formação de metabólitos extracelulares e crescimento celular;
- Investigar o metabolismo da levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1 através do uso da AFM utilizando glicose 1- ^{13}C marcada.

2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE LEVEDURAS ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO OESTE

Resumo: A identificação de leveduras para o uso em processo fermentativos tem sido realizada principalmente para produção de etanol. Estes microrganismos dependem de fontes de carbono para seu crescimento, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. Dentre as leveduras mais utilizadas para obtenção de etanol, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*. Embora esta espécie tenha atributos que a coloquem como ideal para o uso industrial, ela não é capaz de fermentar alguns carboidratos. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fisiológica de diferentes linhagens de leveduras industriais e isoladas na Região Centro-Oeste, visando à produção de etanol, por meio de análises morfológicas, moleculares e bioquímicas destas leveduras. Entre os resultados, observaram-se colônias com superfícies lisas e rugosas, de formas circulares e ovais, sendo branca a cor predominante. Microscopicamente, as leveduras avaliadas apresentaram reprodução por brotamento. Nas análises moleculares foi possível verificar que 6,52% dos isolados tinham 800 pares de base, sendo correspondente a espécie *S. cerevisiae*. Dentre os isolados, 22% tiveram capacidade de fermentar a glicose em até 24 h, sendo a fonte de carbono de mais rápido crescimento quando comparado aos demais substratos.

Palavras-chave: leveduras, bioprospecção, etanol, PCR

2.1 Introdução

As leveduras são microrganismos eucarióticos pertencentes ao Reino Fungi, reconhecidos pela sua diversidade morfológica e bioquímica (SILVA, 2011). Estes microrganismos unicelulares são as mais antigas fontes de proteínas unicelulares consumidas pelo homem por meio de produtos naturais, bebidas e alimentos elaborados por processos fermentativos (COSTA, 2004). Os produtos obtidos via processos fermentativos a partir de leveduras se destacam em setores industriais importantes, como biocombustíveis, medicamentos, bebidas, produtos agrícolas e o ambiente (GUIMARÃES, 2005). As indústrias de maneira geral tiveram como desafio nos últimos anos o aumento da resistência da levedura ao etanol, à temperatura e

ao dióxido de carbono e a redução ou eliminação da formação de compostos indesejáveis que possam alterar o produto final (MARTINS et al., 1998).

O setor sucroenergético tem apresentado uma grande expansão de desenvolvimento em vários estados brasileiros (BATISTOTE et al., 2010), existindo a necessidade de microrganismos fermentadores, com a capacidade de transformar substrato em etanol (BUCKERIDGE, 2008).

Dentre as leveduras mais utilizadas no processo de fermentação alcoólica destacam-se as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, um eucarioto aeróbio facultativo muito estudado em processos biotecnológicos. Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais que a levedura irá encontrar (BORGES, 2004).

Embora essa espécie tenha os atributos que a colocam como ideal para o uso industrial, ela não é capaz de fermentar alguns carboidratos, como a lactose e a xilose, além de ter sua eficiência fermentativa reduzida em temperatura acima de 35 °C, bem como em concentração de etanol superior a 12%. Além disso, é muitas vezes vulnerável à formação de espumas, floculação, estresse por quantidade de álcool no meio, os quais diminuem o rendimento da fermentação, tornando-a susceptível à contaminação bacteriana (JOSHI; PANDAY, 1999). Desta forma, torna-se importante a busca por novas linhagens de leveduras com potencial fermentativo, seja através da bioprospecção (BASSO et al., 2008), da engenharia genética (YOUNG et al., 2010), engenharia metabólica (LARSSON et al., 1997) ou engenharia evolutiva (BASSO et al., 2011).

Diferenças na fermentação e assimilação de fontes de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam variação na habilidade de fermentação de açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose como *Kluyveromyces*, *Torulaspota*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*, enquanto outros, como o *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não-fermentativos (WALT; YARROW, 1984).

A identificação e caracterização de leveduras apresentam grande importância para processos fermentativos industriais. A união de técnicas bioquímicas e moleculares permite a identificação de linhagens com maior capacidade fermentativa (BADOTTI et al., 2010). Várias metodologias de classificação taxonômica são utilizadas para leveduras, as quais são baseadas em características bioquímicas, morfológicas e fisiológicas em diferentes substratos. No entanto, a classificação e a

caracterização de microrganismos são complementadas por técnicas de biologia molecular, as quais permitem identificar o material genético (ANCHORENA-MATIENZO, 2002), contribuindo significativamente na taxonomia de leveduras, bem como na predição da similaridade evolutiva das mesmas (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fisiológica, morfológica e molecular de diferentes linhagens de leveduras industriais e isoladas na Região Centro-Oeste, visando à produção de etanol.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Microrganismo e manutenção

Foram estudadas 50 linhagens de leveduras: 46 isolados bioprospectados de frutos (1-16, de cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata*); 17-24, de jatobá (*Hymenaea courbaril*); 27-34 e 45-46, de uvaia (*Eugenia pyriformis*); 35 -36 de umbu (*Spondias tuberosa Arruda*); 39- 41 de acerola (*Malpighia glabra* L.); 37-38 de pêssego-do-mato (*Hexachlamys edulis*); 42-44, de pequi (*Caryocar brasiliense*)) e cama de frango (25 e 26) obtidos na Região Centro-Oeste (STEFANELLO, 2010), 3 isoladas da Usina Barralcool (BB1, BB2 e BB9) do município de Barra do Bugres - MT (SILVA, 2011) e a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, gentilmente cedida pela Usina São Fernando Açúcar e Álcool de Dourados - MS.

As leveduras BB1, BB2, BB9 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 leveduras 1-46 foram mantidas em ágar YPD (ágar 15 g/L, extrato de levedura, 10 g/L; peptona 20 g/L; glicose, 20 g/L) (STEFANELLO, 2010), *S. cerevisiae* CAT-1 foi recebida em meio YPD e mantida em ágar YPD.

2.2.2 Análises micromorfológica e macromorfológica

Para a análise micromorfológica, os isolados foram crescidos e plaqueados por esgotamento através do estriamento das colônias em meio YPD a 30°C por 24 h e em seguida submetidos à visualização em microscópio óptico com aumento de 1000 x, onde foram analisadas suas características externas, como o formato, a presença de brotamentos e a comparação do tamanho das células.

Para a análise macromorfológica, os isolados foram plaqueados por esgotamento em ágar YPD, incubados a 30°C por 72 h e posteriormente realizada a análise das colônias, considerando-se os parâmetros, pigmentação, borda e textura.

2.2.3 Extração de DNA genômico

O protocolo para extração de DNA foi adaptado de Sambrook e Rusell (2001). Quatro colônias de leveduras crescidas em ágar YPD a 30°C por 24 h, foram transferidas para um microtubo adicionado 2000 µL de tampão fosfato salina (PBS) gelado e centrifugado por 6 min. a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa em 200 µL de PBS, 50 µL de Proteinase K (20 mg mL⁻¹) e incubado a 65°C por 15 min. Os tubos foram removidos e acrescidos de 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, homogeneizados e incubados a 65°C por 6 min.

Aos tubos foram adicionados 800 µL de clorofórmio, sendo então agitados por 30 segundos no *vortex*, adicionados de 400 µL da solução de precipitação proteica (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial) e centrifugados por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e adicionada de 1 mL de etanol absoluto gelado, centrifugada e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com etanol 70% gelado e centrifugado por 2 min. Após a evaporação do etanol, os precipitados foram eluídos em 100 µL de água ultrapura, incubados a 65°C por 5 min. e estocados a -20°C.

2.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído das leveduras foi utilizado para amplificação por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos ITS1 (5´ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´) e ITS4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) que amplificam zonas variáveis e intergênicas do gene 5.8S do DNA ribossomal (DNAr) (WHITE et al., 1990).

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador *MyCyclertm Thermal Cycler 170-9701* (Biorad). A PCR foi realizada com volume final de 50 µL contendo 0,5 U de Taq DNA polimerase, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 10 mM de DNTP, 5 µL de tampão magnésio de reação diluído em 10 x, 1,5 mM MgCl₂ e 10 ng de DNA genômico (Sigma). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 95°C por 3 min., seguido pela desnaturação a 95°C por 1 min., anelamento a 52°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min com 35 ciclos, seguido

de uma extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-borato EDTA (TBE), corado com brometo de etídio (Sigma). Foi utilizado o marcador molecular de 100 bp DNA Ladder (Promega®).

2.2.5 Capacidade de assimilação e fermentação

As leveduras isoladas foram submetidas à análise de capacidade de assimilar e/ou fermentar glicose, frutose, galactose, sacarose, lactose, celobiose, maltose, rafinose, manitol, xilose e amido. Também foram testados em relação ao nitrato, meio YPD contendo 10% NaCl, 50% de glicose ou a temperatura de 37°C.

De acordo com o método, uma alçada de células de cada levedura estudada foi inoculada em tubo de ensaio contendo 10 mL do caldo YPD e incubada por 24 h a 30°C. A seguir, 0,1 mL foi retirado e inoculado em um tubo de ensaio, com 10 mL da seguinte solução basal em pH 5,0: 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% de NaH_2PO_4 , 0,05% de MgSO_4 , 2% do substrato testado, sendo esta solução esterilizada em autoclave por 15 min a 121°C. Em cada tubo de ensaio foi imerso um tubo de Durham invertido (ROSSI; ANDRIETTA, 2009).

Para cada substrato testado, foi considerado resultado positivo para a fermentação, as amostras que continham produção de gás, e positivo para a assimilação a presença de turbidez. Os testes foram realizados em duplicatas e as leituras realizadas em 24, 48, 72, 96 e 120 h. Uma linhagem de *S. cerevisiae* comercial *Fleischmann* foi utilizada como padrão positivo, exceto em xilose, quando empregou-se uma linhagem de *Pichia stipitis*. Um tubo com solução basal sem a fonte de carbono e/ou nitrogênio foi utilizado como padrão negativo.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Análise micro e macromorfológica

Um total de 46 linhagens de leveduras isoladas de frutos e cama de frango foi analisado quanto as suas micro- e macromorfologias, conforme a Tabela 2.1.

Macroscopicamente foram observadas colônias com borda regular (86,96%) ou irregular (13,04%), textura lisa (93,47%) ou rugosa (6,53%) e opaca (82,61%) ou brilhante (17,39%) e cor branca (76,09%), rosa (15,21%) ou creme (8,70%). A ausência de pigmentação foi a característica dominante entre os isolados, sendo esta característica comum às leveduras ascomicetas (SANTOS et al., 1996).

Tabela 2.1 Análise morfológica das linhagens de leveduras estudadas.

Isolado	Micromorfologia			Macromorfologia		
	Formato	Tamanho	Brotamento	Pigmentação	Borda	Textura
1	Alongada	Pequena	Sim	Branco	Irregular	Lisa/Opaca
2	Oval	Média	Sim	Rosa	Regular	Lisa/Brilhante
3	Redonda	Pequena	Sim	Rosa	Regular	Lisa/Brilhante
4	Oval	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Brilhante
5	Oval	Média	Sim	Branco	Irregular	Rugosa/Opaca
6	Alongada	Grande	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
7	Oval	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
8	Alongada	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
9	Oval	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
10	Alongada	Grande	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
11	Redonda	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
12	Alongada	Média	Sim	Branco	Irregular	Lisa/Opaca
13	Redonda	Pequena	Sim	Branco	Irregular	Rugosa/Opaca
14	Redonda	Pequena	Sim	Branco	Regular	Lisa/Brilhante
15	Oval	Grande	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
16	Redonda	Média	Não	Branco	Regular	Lisa/Opaca
17	Oval	Grande	Sim	Creme	Irregular	Rugosa/Opaca
18	Redonda	Pequena	Não	Branco	Regular	Lisa/Opaca
19	Oval	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
20	Alongada	Média	Não	Branco	Regular	Lisa/Opaca
21	Redonda	Grande	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
22	Oval	Grande	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
23	Redonda	Grande	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
24	Oval	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
25	Redonda	Grande	Sim	Creme	Regular	Lisa/Brilhante
26	Oval	Pequena	Sim	Rosa	Regular	Lisa/Brilhante
27	Alongada	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
28	Oval	Grande	Sim	Creme	Regular	Lisa/Brilhante
29	Redonda	Pequena	Não	Creme	Regular	Lisa/Opaca
30	Oval	Média	Sim	Rosa	Regular	Lisa/Opaca
31	Alongada	Grande	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
32	Oval	Média	Não	Rosa	Regular	Lisa/Opaca
33	Oval	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
34	Oval	Média	Não	Branco	Regular	Lisa/Opaca
35	Redonda	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
36	Oval	Média	Sim	Rosa	Irregular	Lisa/Opaca
37	Redonda	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
38	Redonda	Pequena	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
39	Redonda	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
40	Oval	Grande	Sim	Rosa	Regular	Lisa/Opaca
41	Oval	Média	Não	Branco	Regular	Lisa/Brilhante
42	Oval	Pequena	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
43	Oval	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
44	Redonda	Média	Não	Branco	Regular	Lisa/Opaca
45	Oval	Média	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca
46	Redonda	Grande	Sim	Branco	Regular	Lisa/Opaca

Estes resultados são similares aos obtidos em estudo prévio quanto a bordas regulares (81,30%) e pigmentação rosa (12,00%), entretanto houve uma maior ocorrência (75,00%) quando comparado a coloração creme (SILVA, 2011).

Microscopicamente as leveduras avaliadas apresentaram formato alongado (17,39%), arredondado (34,78%) ou oval (34,78%), tamanho pequeno (19,57%), médio (54,34%) ou grande (26,09%) e reprodução por brotamento (82,60%) ou fissão (17,40%). Foi reportado que as células de *S. cerevisiae* agrupam-se em cachos e são de tamanhos maiores em relação as de *K. marxianus* (COSTA, 2011).

A presença de brotamento e diferenças na morfologia como formas redondas, ovais ou apiculares são características de leveduras do gênero *Saccharomyces* (PELCZAR Jr. et al., 1996). Entretanto estas características não são suficientes para designar a nível taxonômico das linhagens. Para isto foi necessário a extração de DNA genômico e análise de PCR.

Estudos como o de Thorton e Bunker (1984) demonstraram que culturas puras de leveduras diferenciavam-se somente pelas suas características taxonômicas. Entretanto leveduras de laboratório e leveduras utilizadas em processos industriais, mesmo quando da mesma espécie, podem apresentar grandes diferenças, tanto em termos genéticos quanto fisiológicos. Em condições industriais, seja na produção de levedura de panificação, de cerveja, de vinho, de bebidas destiladas, de etanol combustível ou de outros produtos, as leveduras acabam sofrendo um processo de adaptação às condições particulares do processo, o que envolve fenômenos como, por exemplo, a multiplicação do número de genes ou até mesmo de cromossomos inteiros (BENITEZ et al., 1996; QUEROL et al., 2003; MARULLO et al., 2004). Assim, ao longo dos séculos, cada processo industrial leva à seleção as linhagens mais adaptadas às suas condições específicas.

Para as linhagens BB1, BB2, BB9 e *S. cerevisiae* CAT-1 também se realizaram as análises micro e macromorfológicas, bem como a análises moleculares (extração de DNA e PCR). Os resultados obtidos estão de acordo com os dados reportados (SILVA, 2011; OLIVEIRA, 2012 - comunicação pessoal) (Anexos A e B).

2.3.2 Extração de DNA e PCR

Foi possível visualizar a amplificação do DNA genômico das 46 leveduras avaliadas deste estudo. Foi realizado o PCR com o DNA genômico de todos os isolados de leveduras com os oligonucleotídeos indicadores específicos IT1 e ITS4.

Os oligonucleotídeos de região ITS são considerados a região de DNA amplamente sequenciada em fungos (leveduras). De acordo com Boekhout (2003) e Villa-Carvajal (2006), estes *primers* são específicos para seres eucariontes, onde é quantificado o DNA ribossomal 18S e 25S. Os mesmos têm sido tipicamente úteis para a sistemática molecular a nível de espécie, e até mesmo dentro da espécie (por exemplo, para identificar as raças geográficas). Estes *primers* são utilizados por vários autores, entretanto para identificação de uma levedura específica, como a *S. cerevisiae*, seria necessário utilizar o *primer* ITS 25, como descritos por Sabaté et al. (2000).

Estes iniciadores permitem a amplificação de um fragmento de 1170 pb compreendidos entre o nucleotídeo 161 da região intergênica ITS-1 e o nucleotídeo 585 do gene que codifica o RNAr 25S. Entretanto, todas as leveduras apresentaram amplificação específica da região intergênica ITS1 e ITS4.

Com base nos dados da Figura 2.1, verificou a amplificação dos fragmentos da região ITS do DNA ribossomal de todas leveduras. Constatou que as linhagens apresentaram um padrão de bandas bem definidas (89,14%), entretanto, 10,86% das leveduras, *i.e.* 5 isolados, apresentaram 2 tipos de perfis de bandas (PCR). Os isolados 13 e 16 apresentaram 400 e 500 pb, o isolado 2 apresentou 400 e 600 pb, o isolado 6 mostrou entre 400 e 700 pb e o isolado 10 obteve 500 e 800 pb.

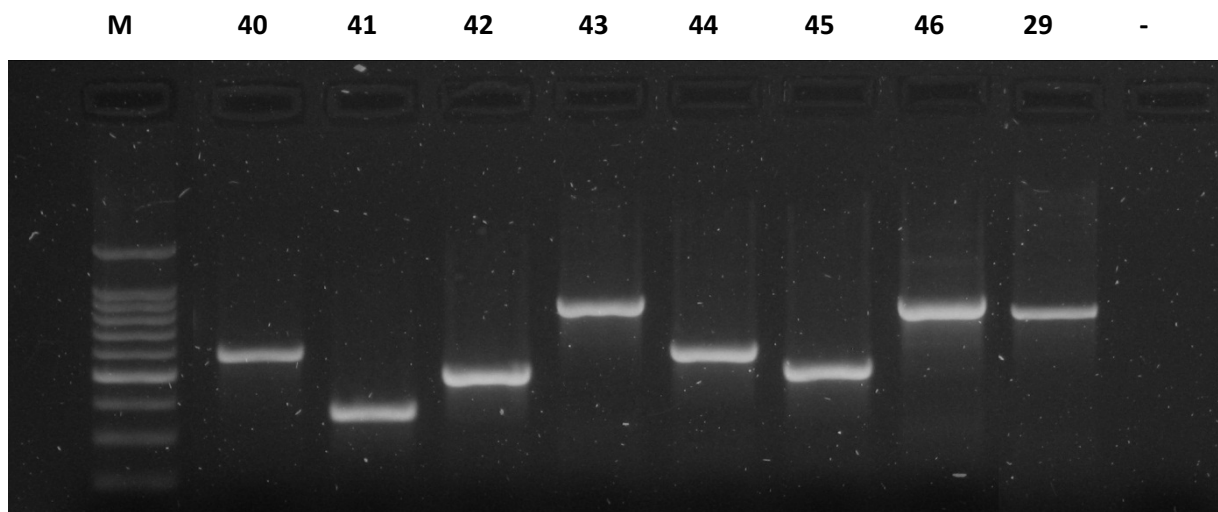


Figura 2.1 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do produto amplificado por PCR de oito leveduras avaliadas neste estudo. Coluna M, marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb (Promega); seguido pelas colunas de leveduras isoladas 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 29, respectivamente; e coluna 9 controle negativo da PCR.

Em estudo prévio foi demonstrado a presença de duas bandas durante a amplificação do material genético de leveduras. Após seu sequenciamento, as leveduras mostraram identidade com duas regiões ITS. Este perfil de bandas deve-se ao fato de duas regiões ITS estarem presentes a uma linhagem, além do *primer* ITS não ser específico para uma só espécie de levedura (CAPPELLO et al., 2010).

Porém outras metodologias de PCR revelaram que quando utilizado o *primer* EI-1, apesar de obtida a distinção entre as diferentes espécies, ocorreu um alto grau de polimorfismo quando leveduras nativas isoladas de fermentação alcoólica foram analisadas (COSTA-SILVA, 2010).

Neste trabalho, foi possível observar perfis de bandas entre 300 e 800 pb (Figura 2.2). *S. cerevisiae* CAT-1 foi utilizada como controle positivo.

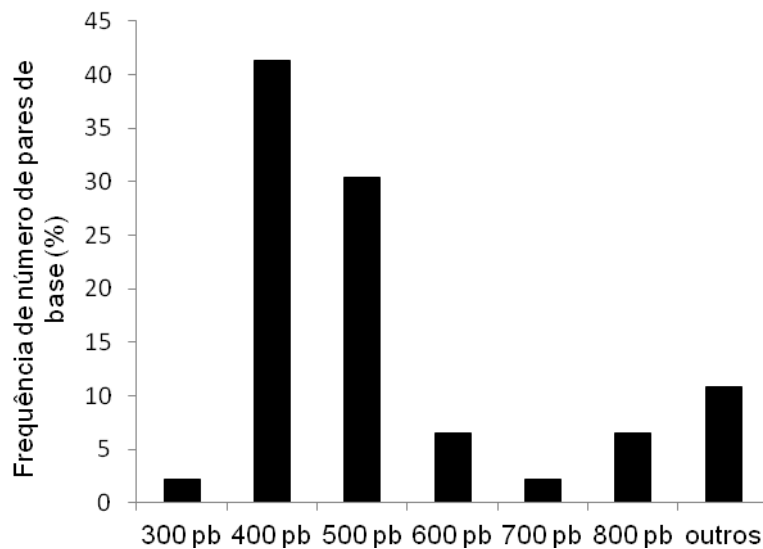


Figura 2.2 Tamanho dos produtos de PCR obtidos dos isolados de leveduras.

Pode-se verificar que 41,3% dos isolados apresentavam perfil com bandas de 400 pb. Álvarez-Martín et al. (2007) e Bockelmann et al. (2008) identificaram leveduras do gênero *Candida* com este número de pares de bases. Os mesmos autores reportaram que *S. cerevisiae* possui entre 800 a 850 pb. Em estudo prévio, a utilização do *primer* ITS1 permitiu a identificação das leveduras *Trichosporon debeurmannianum* e *Trichosporon jirovecii* com 446 pb e 503 pb, respectivamente (MARTINS-GUETHI, 2009).

Basílio et al. (2008) mostraram que existem leveduras contaminantes no processo de produção de etanol, sendo que estas apresentaram fragmentos ITS de 400 pb (*Candida intermedia* e *C. Lusitaniae*), 450 pb (*C. pararugosa*), 480 pb (*C. xylopsoci*), 540 pb (*Pichia fermentans*), 650 pb (*P. anomola* e *P. caribbica*) e 850 pb (*S. cerevisiae*), o que permitiu uma caracterização preliminar das leveduras.

Em outro estudo, as leveduras contaminantes encontradas durante as safras foram *Saccharomyces capensis*, *S. bayanus*, *Pichia ohmeri*, *Trichosporon brassicae*, *Torulaspota pretoriensis* e *Kluyveromyces vanudenii* (OLIVEIRA et al., 1996).

2.3.3 Testes bioquímicos

Para o uso adequado de carboidrato como única fonte de carbono é importante a diferenciação entre a capacidade microbiana de assimilar o carboidrato e sua capacidade de fermentar esse carboidrato (PRESCOTT, 1962). Essas diferenças na fermentação e assimilação da fonte de carbono são critérios importantes na classificação e identificação das leveduras, pois esses microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentar e assimilar os açúcares. Enquanto alguns gêneros apresentam e.g. fermentação eficiente da glicose, como *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*, outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não-fermentativos (WALT; YARROW, 1984).

Os testes de assimilação e fermentação dos substratos foram analisados em intervalos de 24 h durante 120 h, conforme mostrado na Tabela 2.2. Verificou-se que 8,69% das linhagens conseguiram fermentar a celobiose, estas apresentaram 500 pb nas análises de PCR. É conhecido que a celobiose por ser um dissacárido pode ser fermentado por aproximadamente 17% das leveduras, por exemplo, *C. lusitaniae*, *C. acidothermophilum* e *C. wickerhamii* (FERNANDES, 2008).

Tabela 2.2 Avaliação da capacidade de assimilação e fermentação dos isolados.

Amostra	Maltose assimilação	Galactose assimilação	Lactose assimilação	Nitrato assimilação	Amido assimilação	assimilação 37 °C	crescimento 50 % Glicose	crescimento 10 % NaCl	crescimento Sacarose	fermentação Galactose	fermentação Glicose	fermentação Amido	fermentação Celobiose	assimilação Manitol	assimilação Maltose	fermentação Rafinose	assimilação Celobiose	fermentação Xilose	assimilação Frutose	fermentação Lactose	fermentação Manitol	fermentação Rafinose	fermentação Xilose
1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
5	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
9	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
10	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
11	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
13	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
14	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
15	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
16	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
17	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
19	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
21	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
22	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
23	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
24	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
25	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
26	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
27	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
28	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
29	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
30	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
31	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
32	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
33	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
35	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
36	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
37	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
38	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
39	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
40	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
41	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
43	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
44	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
45	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
46	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Verificou-se que todas as leveduras tiveram a capacidade de assimilar glicose, frutose e sacarose em até 120 horas (Figura 2.3). Glicose foi a fonte de carbono que apresentou mais rápido crescimento e fermentação quando comparados aos outros substratos, sendo esta característica apreciável para um processo biotecnológico, sendo que 22% das leveduras a fermentaram em até 24 h. Isto era esperado, haja vista que a grande parte dos organismos possui as vias necessárias para o seu catabolismo (glicólise), além de ser um monossacarídeo cujo transporte para o interior da célula pode proceder por diferentes mecanismos, inclusive via difusão facilitada, o que não requer gasto de ATP (FONSECA, 2007). A D-glicose, é a forma comum da glicose na natureza e pode ser fermentada por cerca de 50% das leveduras (BARNETT et al., 1983).

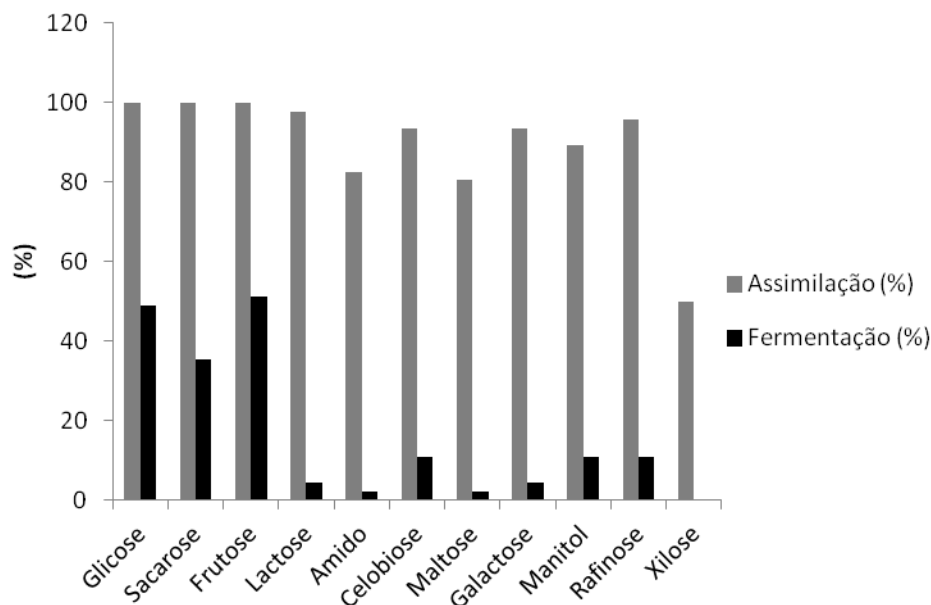


Figura 2.3 Assimilação e fermentação em diferentes substratos após 120 h de incubação.

Verificou-se ainda que nas primeiras 24 h os isolados conseguiram fermentar mais a sacarose (13,3%) do que a frutose (11,1%). Entretanto, nas 120 h finais os isolados foram capazes de fermentar mais a frutose (51,1%) do que a sacarose (35,5%). A sacarose é um dissacarídeo normalmente hidrolisado no ambiente extracelular pela enzima invertase, embora algumas linhagens possam transportar sacarose ativamente para o interior da célula (STAMBUK et al., 1999), o que provavelmente poderia diminuir a velocidade com que o substrato é metabolizado.

Sacarose pode ser fermentada por aproximadamente 23% das leveduras (BARNETT et al., 1983).

A lactose foi fermentada por apenas 4,4% das leveduras isoladas, valor próximo aos 2% de leveduras capazes de fermentar lactose encontrados na natureza (BARNETT et al., 1983). Os isolados 42 e 43 apresentaram assimilação de lactose, sendo uma fonte de carbono não assimilada por *S. cerevisiae* (CABALLERO et al., 1995), e assim um critério simples de exclusão, de acordo com a identificação proposta por Vaughan-Martini e Martini (1993). Fernandes (2008) relatou que as leveduras *K. lactis*, *K. marxianus* e *C. intermedia* possuem a capacidade de fermentar a lactose.

Dentro os isolados, 10,86% não fermentaram glicose e não assimilaram manitol. Os resultados de PCR deste estudo mostraram que estas leveduras apresentaram 400 pb, que em diversos estudos foram identificadas como *Candida* spp. (MEYER et al., 1998). Em um estudo anterior houve semelhança no teste bioquímico realizado com leveduras isoladas e após realizado o sequenciamento, estas foram identificadas como *Candida ernobii-similar* (MAUTONE, 2008).

Para o amido (2,1%), a galactose (4,3%) e a maltose (2,1%) também se obtiveram reduzido número de linhagens com capacidade fermentativa. Dentre espécies de leveduras, 23% possuem a capacidade de fermentar a galactose, entre as quais *C. pseudointermedia*, *Debaryomyces occidentalis* e *S. cerevisiae* (TOIVOLA et al., 1984).

Dentre as linhagens que fermentaram a galactose, a levedura 43 também fermentou os açúcares frutose, sacarose e glicose. Após a análise dos resultados moleculares desta levedura, verificou que a mesma possui 800 pb, correspondendo à espécie *S. cerevisiae* (ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2007; BOCKELMANN et al., 2008).

A xilose foi assimilada por 16 isolados, entretanto esse substrato foi fermentado apenas pelo isolado 28. O isolado 42 apresentou crescimento em meio com concentração de 50% de glicose, 10% de NaCl e a 37°C, características comuns em *S. cerevisiae*, porém apresentou fermentação da lactose. *S. cerevisiae* é capaz de assimilar diferentes fontes de carbono, como glicose, sacarose, maltose, rafinose, frutose e galactose (VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 1993). Isto leva a crer que ao menos 41,30% dos isolados pertençam a esta espécie.

As linhagens BB1, BB2, BB9 e *S. cerevisiae* CAT-1 foram testadas com as fontes de carbono glicose, sacarose, arabinose, trealose, amido, manose, manitol, maltose, celobiose, rafinose, galactose, frutose, xilose e lactose, conforme pode ser observado na Tabela 2.3. Estas linhagens assimilaram todas as fontes de carbono testadas nas primeiras 24 h. Porém, de acordo com os testes de fermentação estas leveduras foram capazes de fermentar apenas alguns dos açúcares testados e em tempos distintos (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Fermentação dos isolados BB1, BB2, BB9 e CAT-1 em diferentes intervalos de tempo.

Substrato	Fermentação				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Arabinose	BB9	BB9	BB9	BB9	BB9
Frutose	CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1
Galactose	-	BB9	BB9	BB9, CAT-1	BB9, CAT-1
Glicose	CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1
Manose	CAT-1, BB9	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1
Maltose	-	CAT-1	CAT-1	CAT-1	CAT-1
Rafinose	-	CAT-1	CAT-1	CAT-1	CAT-1
Sacarose	CAT-1	CAT-1, BB2, BB9	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1	BB1, BB2, BB9, CAT-1

S. cerevisiae CAT-1 fermentou nas primeiras 24 h os açúcares glicose, frutose e sacarose (presentes na cana-de-açúcar) e manose. Outros açúcares foram fermentados após tempos maiores: maltose (48 h), rafinose (48 h) e galactose (96 h). Cinco açúcares não foram fermentados: xilose, celobiose, trealose, manitol e lactose. Nenhum dos isolados fermentou o amido.

As leveduras BB1, BB2 e BB9 fermentaram glicose e frutose em 48 h. As leveduras BB2 e BB9 também fermentaram a sacarose em 48 h, entretanto, a linhagem BB1 fermentou em 72 h. Dentre as linhagens BB, somente a levedura BB9 fermentou os substratos arabinose e manose nas primeiras 24 h. Apenas após 48 h as leveduras BB1 e BB2 conseguiram fermentar a manose. Os açúcares manose e frutose são isômeros de glicose e por isto podem ser fermentados pela *S. cerevisiae*. Para a fermentação de xilose e arabinose, *S. cerevisiae* necessita de modificações

em suas vias metabólicas. Embora algumas linhagens consigam assimilar arabinose aerobicamente, estas são incapazes de fermentar a etanol (VAN MARIS et al., 2006).

O crescimento de *S. cerevisiae* CAT-1 em glicose, sacarose, maltose, galactose e rafinose está de acordo com o esperado, conforme reportado por Vaughan-Martini e Martini (1993). *S. cerevisiae* CAT-1 mostrou-se incapaz de fermentar a fonte de carbono lactose como outras linhagens desta espécie (CABALLERO et al., 1995). *S. cerevisiae* não assimila lactose diretamente porque não tem mecanismo de transporte de lactose através da membrana, precisando hidrolisar este açúcar antes em glicose e galactose. Contudo como é comum a ausência do gene estrutural β -3-galactosidase, não realiza esta hidrólise (STAMBUK et al., 1999).

Após os resultados de assimilação e fermentação foram selecionadas 14 isolados que foram capazes de fermentar alguns dos substratos como glicose, sacarose, frutose, para realização de estudos cinéticos.

2.4 Conclusões

O presente estudo permitiu uma diferenciação baseada em aspectos bioquímicos e morfológicos. Foi possível verificar que os isolados selecionados apresentaram maior habilidade em fermentar glicose e menor habilidade de fermentar lactose. A técnica de PCR foi utilizada como uma ferramenta preliminar da identificação dos isolados, porém técnicas já existentes de taxonomia e sistemática de leveduras serão necessárias para uma identificação final.

2.5 Referências

ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; FLÓREZ, A. B.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; MAYO, B. phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 961-967, 2007.

ANCHORENA-MATIENZO, P. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BADOTTI, F. et al. Caracterização bioquímica e molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de caldo de cana e melado para a produção de cachaça em Florianópolis-SC. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 13, n. 3, jul./set. p. 205-213, 2010.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. E YARROW, D., **Yeasts: Characteristics and identification**. Cambridge University Press, Cambridge, U. K. 1150 p. 1983.

BASÍLIO, A. C. M.; de ARAÚJO, P. R. L.; de MORAIS, J. O. F. da SILVA FILHO, E. A.; de MORAIS, M. A.; SIMÕES, D. A. Jr. Detection and Identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v.56, n. 4, p. 322-326, 2008.

BASSO, T. O.; STEFANDEKOK, A.; DARIO, M. C. D.; ESPIRITO-SANTO, J. C. A. do; TONSO A., JEAN-MARCDARAN, A.; GOMBERT, A. K.; ANTONIUS, J. A.; VANMARIS, A.; JACKT-PRONK, A.N.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, 694-703, 2011.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D.D.; ERNANDES, J. R. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar. **Ciência e Natura**, v. 32, n. 2, p. 83 - 95, 2010.

BENITEZ, T.; MARTINEZ, P.; CODON, A. C. Genetic constitution of industrial yeast. **Microbiologia**, v.12, p.371-84,1996.

BOCKELMANN, W.; HELLER, M.; HELLER, K. J. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **International Dairy Journal**, v. 18, p. 1066-1071, 2008.

BOEKHOUT, T., ROBERT, V. **Yeast in food**. Woodhead, Cambridge, 2003.

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. 141 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2008.

BUCKERIDGE, M. S. Rotas para o etanol celulósico em um cenário de mudanças climáticas. **Opiniões**, Ribeirão Preto, p. 62, 01 jul. 2008.

CABALLERO, R.; OLGUIN, P.; CRUZ-GUERRERO, A.; GALLARDO, F.; GARCIA-GARIBAY, M. E GÓMEZ-RUIZ, C.(1995), Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. **Food Research International**, v. 28, n. 1, p. 37-41.

CAPELLO, M.S.; POLTRONIERI, P.; BLAIOTTA, G.; ZACHEO, G. Molecular and physiological characteristics of a grape yeast strain containing atypical genetic material. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 72-80, 2010.

CARVALHO, G. B. M. et al. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro:1º Parte – As Leveduras. **Revista Analytica**, nº 25, p. 7, 2006.

COSTA, L. F. Leveduras na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, nº1, p.01-06, 2004.

COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico**. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro preto, Ouro Preto, MG, 2011.

COSTA-SILVA, R. B.; MELO-JÚNIOR, M. R.; MORAES JUNIOR, M. A. Utilização do Intron Splice Site *primer* EI-1 na discriminação de leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 761 – 765, 2010.

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática**. 2008. 201 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2008.

FONSECA, G. G. **Análise de Fluxos Metabólicos em *Kluyveromyces marxianus* utilizando substratos marcados com 13C**. 2007. 288 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, USP; 2007.

GONÇALVES, F. A.; PERDOMO. I. C.; STEFANELLO, I.; CAMARGO, J. Z.; FONSECA, G. G. Isolamento de leveduras de diferentes amostras e avaliação de suas propriedades de assimilação e fermentação de substratos visando à produção de etanol. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. **Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2011. p. 1-6.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARTINS, C.V.B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; Fusão de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por floculação e produção de H₂S. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.1, 1998.

MARTINS-GUETHI, G.G. **Caracterização de leveduras do gênero *trichosporon* isoladas de três regiões costeiras do estado de São Paulo**. 192 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2009.

MARULLO, P.; BELY, M.; MASNEUF-POMAREDE, I.; AIGLE, M.; DUBOURDIEU, D. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**. v. 4, p.711-719, 2004.

MAUTONE, J. N. **Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isoladas de folhas de figueiras do Parque de Itapuã, RS, Brasil**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) –

Instituto de Ciências básicas da saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

MEYER, S. A. et al. *Candida Berkhout*. In: Kurtzman, C., P, FELL, J. W. (Eds) *The yeast: a taxonomic study*. **Amsterdam: Elsevier Science Publishers**, 1998. P. 454-573.

OLIVEIRA, C. 2012. **Comunicação Pessoal**.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: ESALQ/Depto. de Química; FEALQ; FERMENTEC, 1996. 89p.

PELCZAR, Jr.; M.J.; CHAN, E.C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996.

PRESCOTT, S. C. **Microbiologia Industrial**. Ed. Aguilar, Espanha, 1962.

QUEROL, A.; BELLOCH, C.; FERNANDEZ-ESPINAR, M. T.; BARRIO, E. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. **International Microbiology**. v. 6, p. 201-205, 2003.

ROSSI, R. A.; ANDRIETTA, M. G. S. Isolamento de leveduras de bagaço da cana-de-açúcar: propriedades em assimilação e fermentação de açúcares. **Anais do XI Simpósio Nacional de Fermentações**, Natal, Brasil. 2009.

SABATÉ, J.; GUILLAMON, J.M.; CANO, J. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v.193, p. 255-259, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3rd ed., Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANTOS, E. A.; De OLIVEIRA, R. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Review of Microbiology**, v. 27, p. 33-40, 1996.

SILVA, R. O. **Isolamento e caracterização de linhagens de leveduras selvagens a partir do caldo de cana de usina no Mato Grosso**. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande, MS, 2011.

STAMBUK, B. U.; SILVA, M. A.; PANEK, A. D. E ARAUJO, P. S. Active -glycoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Letters**, v. 170, p. 105-110, 1999.

STEFANELLO I. **Isolamento de leveduras de diferentes substratos e avaliação de suas propriedades de assimilação e fermentação em açúcares visando à produção de etanol.** 2010. 37 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Dourados, 2010.

THORTON, R. J.; BUNKER, A. Characterization of wine yeasts for genetically modifiable properties. **Journal of the Institute of Brewing.** v. 90, n. 3, p. 134-145, 1984.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; BOSCH, E. V. D.; VAN-DIJKEN, J. P.; SCHEFFERSI, A. Alcoholic fermentation of D-Xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 47, n. 6, p. 1221-1223,. 1984.

VAN MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek.** v. 90, p.391-418, 2006.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology,** v. 16, p. 113-119, 1993.

VILLA-CARVAJAL, M.; QUEROL, A.; BELLOCH, C. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. **Antonie van Leeuwenhoek.** v. 90, p. 171-181, 2006.

WALT, J. P. V.; YARROW, D. **Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeast.** In: Kreger-Van Rij, N. S. W. (Ed). *The yeasts: a taxonomy study.* Amsterdam: Elsevier Science, 1984.

WHITE, T. J., BRIMS, T., LEE, S., AND TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White, Eds.), pp. 315-322, **Academic Press,** San Diego, 1990.

3 CRESCIMENTO, CONSUMO DE AÇÚCAR E FORMAÇÃO DE METABÓLITOS DURANTE CULTIVOS DE LEVEDURAS ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de etanol via processo fermentativo a partir da cana-de-açúcar, sendo o Estados Unidos o maior produtor mundial de etanol, utilizando milho como matéria prima. A produção de etanol é obtida pela fermentação alcoólica, que ocorre a partir de um microrganismo que sofre reações bioquímicas transformando glicose em etanol, CO₂ e ATP. Diversas linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm sido utilizadas industrialmente como agente da fermentação. Estas leveduras estão sendo obtidas por isolamento nas principais usinas e destilarias do Estado de São Paulo. Contudo as condições do Mato Grosso do Sul são diferentes, com colheitas precoces e temperaturas maiores. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o crescimento cinético de leveduras isoladas da Região Centro Oeste visando à obtenção do etanol. As leveduras 37 e BB2 apresentaram parâmetros cinéticos melhores que os resultados obtidos da *S. cerevisiae* CAT-1. Entretanto, a formação máxima de etanol foi inferior a mesma. Nas condições estudadas *S. cerevisiae* CAT-1 pode ser considerada a mais adequada para a utilização em processos fermentativos visando a produção de etanol. Estudos em sacarose e em mosto industrial são importantes para dar-se continuidade a este trabalho.

Palavras-chave: cinética, leveduras, etanol

3.1 Introdução

As leveduras são organismos de grande interesse industrial por possuírem capacidade de se desenvolver em substratos baratos e facilmente disponíveis, além da facilidade de multiplicação e formação de produtos. Estes microrganismos são utilizados no processo fermentativo para produção de diversos produtos, como etanol, cerveja e pão, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a maior responsável pela produção dos produtos obtidos pela fermentação (BOTHÁ, 2011; BELLAVÉR et al., 2004).

Desta forma, há uma crescente busca por novas linhagens que estejam mais adaptadas ao ambiente industrial, em tolerar as várias condições de estresse e com

características que melhorem o rendimento e produção em etanol, são de interesse para diversas destilarias (GARAY-ARROYO et al., 2004; GOMBERT, 2005).

O conhecimento fisiológico de uma levedura é de interesse para centros de pesquisas, tendo em vista seu potencial industrial e econômico (LIMA; MARCONDES, 2002), sendo essencial para o entendimento da dinâmica de população de leveduras nas dornas de fermentação (STAMBUK et al, 1999). Diversas linhagens de leveduras têm sido obtidas por isolamento nas usinas e destilarias do estado de São Paulo (TOSETTO, 2002) entretanto, as condições do Mato Grosso do Sul são bem diferentes, por exemplo, além de possuir condições de colheitas precoces, solo propícios para o cultivo de cana-de-açúcar e temperaturas maiores, possui um grande potencial para a produção de etanol devido a sua grande área territorial agriculturável.

O crescimento das leveduras durante o processo fermentativo é influenciado por fatores como o pH, concentração de substrato, viabilidade celular, fonte de carbono utilizada, concentração de SO_2 , conteúdo de álcool, contaminação bacteriana e ainda pela temperatura de fermentação (HEARD; FLEET, 1988).

A determinação do potencial fermentativo se baseia na determinação de fatores de produção específica entre a cepa testada e aqueles obtidos por uma cepa padrão. Produtividade de etanol, glicerol, ácidos orgânicos, consumo de substrato, velocidade específica de crescimento são parâmetros determinantes na seleção de linhagens de leveduras para processos biotecnológicos que utilizam este micro-organismo (BANAT et al., 1996; OKPOKWASILI; NWEKE, 2005; BASSO et al., 2011).

Com o presente trabalho teve-se como objetivo comparar a fisiologia das leveduras em termos do consumo de substrato, formação de metabólitos extracelulares e crescimento celular durante crescimento em meio definido contendo glicose como fonte única de carbono.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo consistiu em recolher uma colônia de uma placa de Petri contendo a linhagem desejada e transferi-la para um frasco tipo Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL do meio de cultura definido (com o pH ajustado para 6,0 com NaOH). Após tempo suficiente para que o final da fase exponencial de crescimento

fosse atingida (a 30°C e 200 rpm), certa quantidade deste inóculo foi transferida para o cultivo principal.

3.2.2 Meio de cultura

O meio mineral (VERDUYN et al., 1992) foi formulado com: 5,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1ml/L de elementos-traço (EDTA, 15 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2$, 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. Glicose foi esterilizada separadamente e adicionada à concentração final de 10 g/L.

3.2.3 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 250 mL de meio mineral estéril, com pH ajustado a 6,0. Glicose foi esterilizada separadamente e acrescida na concentração de 10% (p/v). Os pré-cultivos foram realizados em agitador orbital (Tecnal TE- 420 Incubadora) a 30°C e 200 rpm durante 12 h. 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.

3.2.4 Amostragens e preparo das amostras

Amostragens foram realizadas em média a cada 30 min. para a determinação do pH e da biomassa. Alíquotas foram filtradas com pressão positiva utilizando-se filtros de seringa de acetato celulose com membrana de 0,45 μm , para a retirada de células e obtenção de sobrenadante para a determinação da concentração de 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 da concentração de metabólitos extracelulares

O pH foi obtido por meio de aferições potenciostáticas (Hanna Instruments pH 21). Concentração de biomassa em termos de gramas de massa celular por volume de cultura foi indiretamente determinada via medidas de densidade óptica realizadas com um espectrofotômetro (Nova Optical Systems UV-VIS modelo LGS 53) a 600 nm. Para este propósito, os valores de absorvância 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).

Glicose, etanol e ácidos orgânicos foram determinados por HPLC Agilent 1290, em uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm; Bio-Rad, Hercules, EUA). Os compostos foram eluídos 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. Estes compostos foram detectados por absorvância 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 (EGP)

A EGP foi identificada como a região linear da plotagem do $\ln(X)$ em função do tempo para os dados de cultivo descontínuo. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max}) foi determinada como a inclinação desta reta. O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi determinado como a inclinação da linha obtida pela plotagem de X em função do S , incluindo exclusivamente pontos pertencentes a EGP. A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\mu_S = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \quad \text{Eq. 3.1}$$

onde μ_{\max} = velocidade específica de crescimento máxima (1/h); X = concentração celular (g MCS/L); μ_S = velocidade específica de consumo de substrato durante a EGP (g/(g MCS h)); S = concentração de substrato (g/L); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato a células durante a EGP (g MCS/g); MCS = massa celular seca.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Cinéticas das linhagens selecionadas

Os resultados foram obtidos por meio de cinéticas de crescimento em meio mineral com glicose como única fonte de carbono. Densidade óptica e variação de pH foram obtidas para as linhagens BB1, BB2, BB9, 3, 9, 10, 12, 29, 37, 39, 41, 42, 43, 44 e *S. cerevisiae* CAT-1, sendo mostrado para 12 delas (Anexo C). A Tabela 3.1 mostra os parâmetros cinéticos calculados a partir do presente estudo, em meio definido, utilizando-se glicose como única fonte de carbono.

Tabela 3.1 Parâmetros cinéticos de cultivo de diversas linhagens leveduras em meio mineral tendo glicose como fonte de carbono.

Linhagem	DO max	TD (h)	μ_{max} (1/h)	μ_s g/(g h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	EtOH max (g/L)
CAT-1	4,34	3,990±0,070	0,517± 0,001	2,801±0,059	0,241±0,001	0,872±0,021
BB1	4,89	2,322±0,003	0,570±0,001	5,949±0,211	0,197±0,026	0,373±0,051
BB2	9,58	2,214±0,001	0,563±0,001	3,293±0,130	0,418±0,003	0,395±0,006
BB9	3,40	8,675±0,076	0,179±0,001	0,962±0,084	0,177±0,002	0,485±0,011
3	4,52	4,730±0,020	0,282±0,001	1,980±0,053	0,241±0,009	0,088±0,019
9	8,50	4,518±0,016	0,449±0,002	1,121±0,020	0,511±0,000	0,238±0,043
10	6,51	4,541±0,090	0,306±0,002	2,269±0,078	0,323±0,001	0,345±0,026
12	5,32	3,566±0,050	0,408±0,005	1,354±0,061	0,280±0,003	0,165±0,025
29	6,04	2,828±0,007	0,485±0,001	1,127±0,086	0,364±0,001	0,130±0,020
37	8,11	3,363±0,156	0,526±0,002	1,711±0,197	0,415±0,007	0,434±0,016
39	8,10	4,059±0,005	0,444±0,004	1,738±0,055	0,400±0,003	0,191±0,023
41	4,26	2,684±0,141	0,464±0,005	1,711±0,071	0,364±0,001	0,384±0,024
42	7,43	4,127±0,267	0,416±0,001	1,236±0,002	0,403±0,008	0,106±0,021
43	8,79	4,427±0,021	0,372±0,012	0,85±0,015	0,498±0,010	0,199±0,016
44	6,77	3,600±0,128	0,349±0,008	1,054±0,072	0,289±0,005	0,349±0,053

Onde: DO max: densidade óptica máxima; TD (h): tempo de duplicação; μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento; μ_s : velocidade específica de consumo de substrato; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato a células; EtOH max: concentração máxima de etanol.

Observou-se diferenças entre as linhagens, considerando-se a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), a velocidade específica de consumo de substrato (μ_s) e o fator de conversão de substrato a células ($Y_{x/s}$) (Tabela 3.1).

Em relação ao fator de conversão de substrato a células ($Y_{x/s}$), os resultados obtidos mostraram-se relativamente altos, quando comparados aos da *S. cerevisiae*

CAT-1. Isto indica que estas linhagens apresentaram uma alta capacidade de consumir o açúcar presente no meio fermentativo (STROPPIA et al., 2009). Este resultado foi semelhante ao obtido por Andrietta et al. (2008), no qual estes autores mostraram que 99,5% dos isolados de processos industriais da fermentação alcoólica tiveram o nível de conversão em substratos elevados. Birol et al. (1998) demonstraram que 53,6 g/g foi convertido do substrato em células, entretanto sua produção de etanol (0,43 g/L) não foi tão acima dos resultados encontrados. Resultados anteriores reportados por Steckelberg (2001) utilizando levedura do Gênero *Saccharomyces* isolada de usina foi inferior (0,045 g g⁻¹) aos resultados encontrados neste estudo.

Valores de $Y_{X/S}$ acima de 0,04 g/g indicam um maior desvio de açúcares para produção de células em detrimento a produção de etanol (ANDRIETTA et al., 1999). Variações nos parâmetros cinéticos observados por diversas pesquisas podem ser atribuídas por fatores como temperatura, substrato e cepa de levedura (ALMEIDA et al., 2006).

A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) apresentou em média valores inferiores em relação aos resultados de Andrietta et al. (2008), onde os autores obtiveram um μ_S médio de 5,8 g/(g h). Banat e Marchant (1995) obtiveram um valor de μ_S comparável aos obtidos neste estudo (1,9 g/(g h)). Contudo a linhagem BB1 mostrou um μ_S bastante elevado (5,94 g/(g h)), mas seu fator de conversão de substrato a células e sua produção de EtOH_{máx} não acompanharam o bom desempenho deste parâmetro, sugerindo não ser tão boa para a utilização em processos industriais considerando-se estas condições, haja vista que quanto maior for sua produtividade e velocidade de consumo de substrato, mais adequado será a levedura para processos fermentativos (STECKELBERG, 2001).

Os valores de μ_S para a levedura *Kluyveromyces marxianus* pouco variaram ao compararem-se diferentes açúcares como fonte de carbono a 30 e 37 °C, havendo apenas um decréscimo no valor de μ_S com o aumento da temperatura (FONSECA, 2007), apresentando em média valores semelhantes aos do presente estudo.

Observa-se que as linhagens estudadas apresentaram valores de produção de etanol inferiores aos observados para levedura *S. cerevisiae* CAT-1 (Figura 3.1).

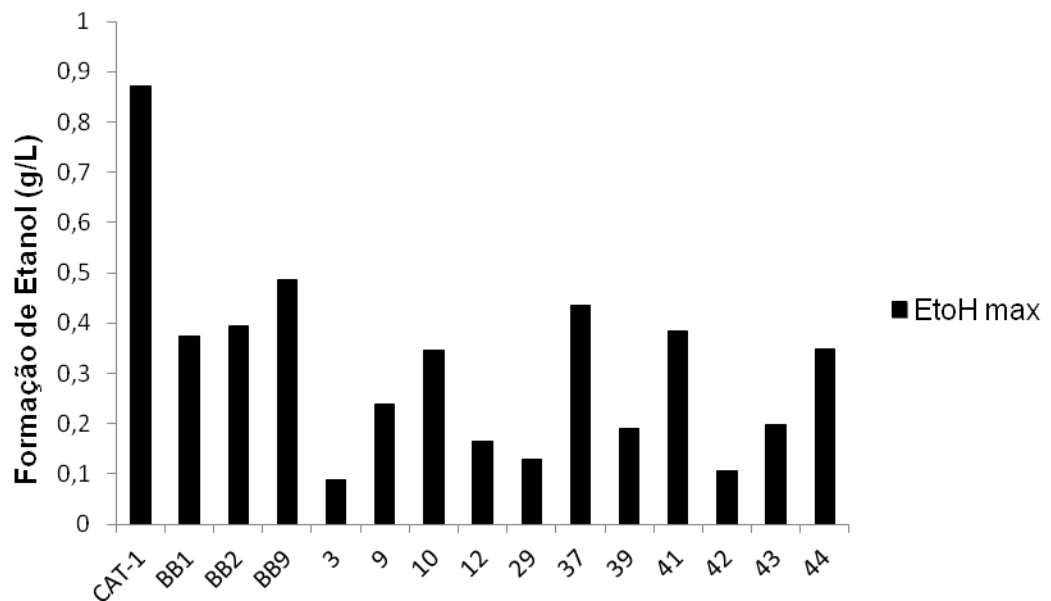


Figura 3.1 Produção máxima de etanol das linhagens estudadas.

Verificou-se que todas as linhagens produziram etanol mesmo em pequena quantidade, entretanto *S. cerevisiae* CAT-1 mostrou uma produção acima das demais linhagens (Fig. 3.1).

Em cinéticas realizadas com a levedura *S. cerevisiae* para fermentação alcoólica em caldo de cana, Andrietta e Stupiello (1990) observaram 0,44 g/L de rendimento de produto/etanol.

Quando verificado dados de etanol das leveduras isoladas (BB1, BB2 e BB9) a outro trabalho com leveduras isoladas de destilarias de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, os resultados mostraram-se similares, onde a produção de etanol variou entre 0,43 a 0,49 g/L (TOSETTO, 2002). O valor de produção de etanol reportado por Gombert et al. (2001) foi de 1,56 mol/mol em 4 litros de reação.

A linhagem BB1 apresentou resultados semelhantes aos observados por Andrietta et al. (2008), diferenciando-se apenas pelo seu $Y_{X/S}$ inferior. Os resultados também se aproximam daqueles observados para uma linhagem isolada da usina Santa Cruz, conforme o trabalho de Steckelberg (2001), onde obteve uma alta velocidade de consumo de substrato (6,51 g/(g h)), baixa produção de células (0,045 g/g) e baixa produção de etanol (0,45 g/L).

Os valores μ_{\max} observados para as leveduras isoladas mostraram-se inferiores em relação aos daquelas de ambiente industrial, exceto da BB9, que obteve um valor muito abaixo das demais. Leveduras isoladas de ambientes

industriais apresentaram valores de $\mu_{\text{máx}}$ de 0,5 1/h e 0,43 h⁻¹ (ANDRIETTA et al., 2008; STECKLEBERG, 2001). Entretanto Liu et al. (2011) encontraram um valor de $\mu_{\text{máx}}$ de (0,68 1/h), superior ao deste trabalho. Apesar deste valor ser específico para cada micro-organismo, este parâmetro é útil para determinar se uma cepa tem similaridade com outra (OKPOKWASILI; NWEKE, 2005).

Entre as leveduras avaliadas observou-se que a linhagem 10 obteve ao final do cultivo o pH 2,69 e a DO_{máx} de 6,51 após 15 h, enquanto o isolado 12 alcançou pH 2,82 e DO_{máx} de 5,32 após 14 h. Estas linhagens apresentaram diferenças no perfil fermentativo, sendo que a 12 obteve melhor desempenho, pois atingiu sua fase exponencial em menor tempo. Além disto, a linhagem 12 apresentou mais rápido crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,408 \pm 0,005$ 1/h; TD = 3,56 \pm 0,05 h) quando comparada à 10 ($\mu_{\text{máx}} = 0,306 \pm 0,002$ 1/h; TD = 4,54 \pm 0,09 h). Entretanto, quando comparados os resultados de fator de conversão de substrato a células e máxima formação de etanol, constatou que a levedura 12, apesar dos bons resultados obtidos, mostrou desempenho inferior ao observado para a levedura 10 (Tabela 3.1).

O isolado 43 atingiu ao final do cultivo pH 2,92 e DO_{máx} de 8,79 após 13,5 h de cultivo, enquanto o isolado 44 alcançou pH 2,78 e DO_{máx} de 4,26 após 11 h. Essa menor DO apresentada pelo isolado 44 indica menor produção de biomassa, o que seria um indicio de uma maior produção de etanol como confirmado na Figura 3.1. As leveduras 43 e 44 atingiram a fase exponencial de crescimento após 3 h e 3,5 h da inoculação (fase *lag*), respectivamente. A linhagem 44 apresentou mais rápido crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,349 \pm 0,008$ 1/h; TD = 3,60 \pm 0,128 h) quando comparada à 43 ($\mu_{\text{máx}} = 0,372 \pm 0,012$ 1/h; TD = 4,427 \pm 0,021 h). Os resultados de $Y_{X/S}$ e EtOH_{máx} confirmam que a levedura 44 possui melhor desempenho em relação ao 43 devido à maior velocidade de crescimento, menor tempo de fermentação e maior concentração de etanol produzido (STAMBUK et al., 1999).

Entre as leveduras avaliadas verificou-se que a linhagem 41 obteve ao final do cultivo o pH 2,52 e a DO_{máx} de 4,27 após 12 h, enquanto a levedura 42 alcançou o pH 2,78 e a DO_{máx} de 7,45 após 14 h. Estas linhagens apresentaram diferenças no perfil fermentativo, sendo que a 41 obteve melhor desempenho visando a produção de etanol, pois a DO_{máx} foi menor quando comparada ao levedura 42, além de ter apresentado menor tempo para atingir sua fase exponencial de crescimento. A linhagem 41 apresentou mais rápido crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,464 \pm 0,005$ 1/h; TD = 2,684 \pm 0,141 h) quando comparada à 42 ($\mu_{\text{máx}} = 0,416 \pm 0,001$ 1/h; TD = 4,127 \pm

0,267 h), sendo que a levedura 41 ainda apresentou melhor quanto a formação de etanol (Figura 3.1).

Os valores de pH decaem durante o processo de crescimento do microrganismo. Esta declínio esta relacionado a formação de ácidos orgânicos, como ácido acético, láctico e succínico e como consequência o aumento da acidez do meio durante o processo fermentativo (MULLER et al., 2007; BORTOLINI et al., 2001; TORRES NETO et al., 2006).

A Figura 3.2 apresenta a cinética de crescimento das linhagens isoladas em ambiente industrial.

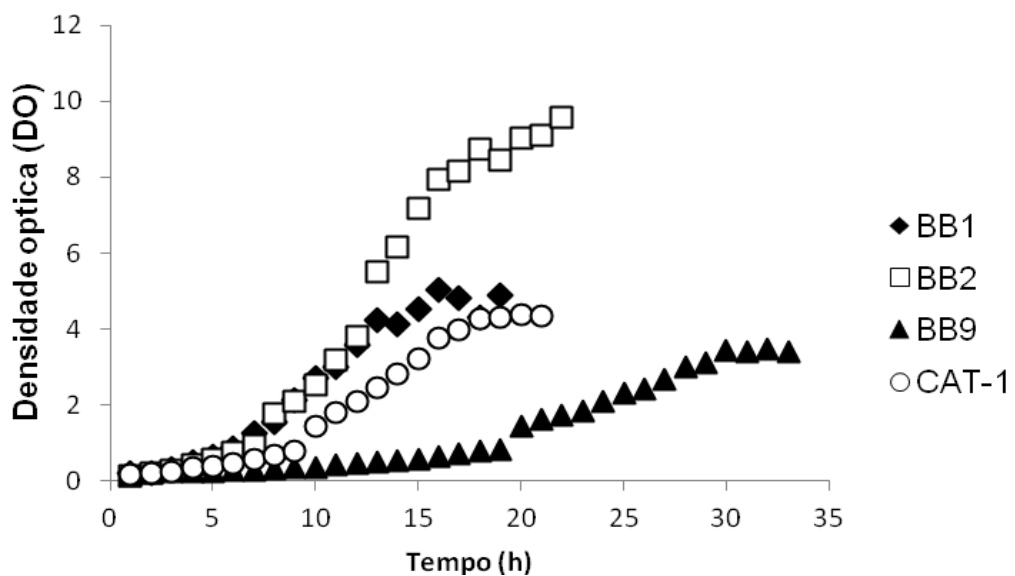


Figura 3.2 Cinéticas de crescimento das linhagens industriais BB1, BB2 e BB9 tendo glicose como única fonte de carbono. Dados obtidos são referentes às médias obtidas em dois experimentos.

Pode observar a fase *lag*, onde crescimento celular foi praticamente nulo devido à adaptação das células (Figura 3.2). Esta fase praticamente não foi observada entre estas linhagens, devido ao meio de cultivo ser idêntico ao utilizado no preparo do pré-inóculo e as células já estarem adaptadas. O pH das linhagens industriais nesta fase são similares sofrendo pequenas variações entre 5,98 a 5,87, visto que nessa fase o metabolismo celular é baixo, não havendo formação de ácidos orgânicos (MULLER et al., 2007; LIMA et al., 2001).

Na fase exponencial as linhagens CAT-1, BB1 e BB2 apresentaram uma curva acentuada, devido a condições favoráveis ao metabolismo, na qual, a formação de metabólitos celulares é máxima (SCHMIDELL; FACCIOTI, 2001).

A levedura BB2 apresentou um alto crescimento em relação às linhagens BB1 e BB9, obtendo $\mu_{\text{máx}} = 0,563 \pm 0,001$ 1/h e uma $DO_{\text{máx}}$ de 9,58, sugerindo que esta linhagem apresenta um bom mecanismo de replicação, porém quanto maior a biomassa formada, menor tende a ser a produção de etanol e/ou de ácidos orgânicos (Tabela 3.1).

Quando comparado os parâmetros cinéticos (Figuras 3.3) das linhagens isoladas de frutos com as isoladas de ambiente industrial, verificou que os isolados BB2 e 37 tiveram uma DO de 9,58 e 8,11, enquanto que *S. cerevisiae* CAT-1 obteve DO de 4,34. Em relação ao tempo duplicação e fator de conversão de substrato à células, a levedura BB2 apresentou melhores resultados entre as linhagens, $2,214 \pm 0,001$ h e $0,418 \pm 0,003$ g/g, respectivamente.

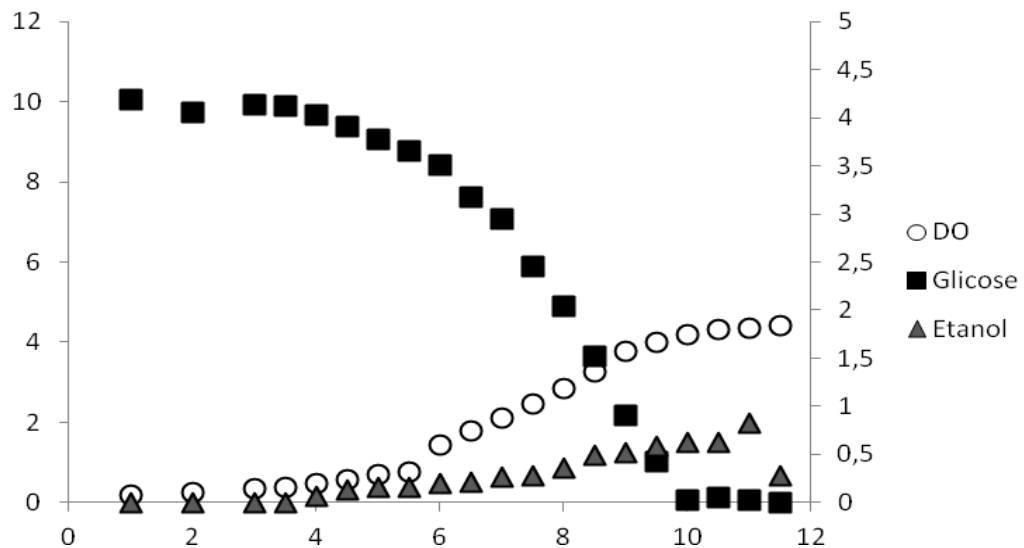


Figura 3.3 Cinéticas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de metabólitos da levedura *S. cerevisiae* CAT-1. Dados obtidos são referentes às médias obtidas em dois experimentos.

No que se refere ao máximo de etanol produzido (Figura 3.1), observou que mesmo a linhagem BB2 apresentando os maiores crescimento de células e consumo de substrato e a menor conversão de substrato em células, sua produção de etanol (0,37 g/L) foi inferior há observada para *S. cerevisiae* CAT-1 (0,872 g/L). Este valor está de acordo com resultados reportados para esta linhagem (STAMBUK et al., 1999; FONSECA, 2007).

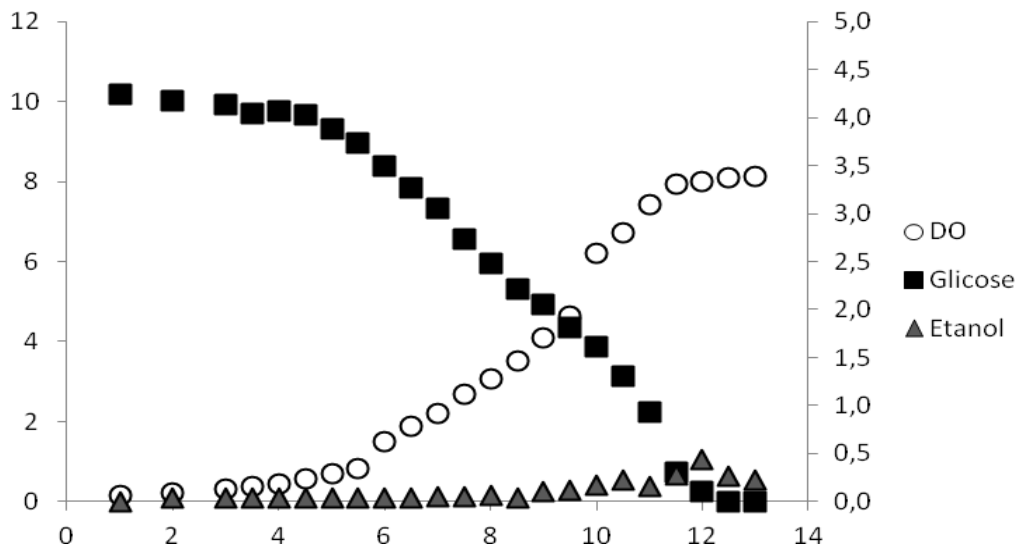


Figura 3.4 Cinéticas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de metabólitos da levedura 37. Dados obtidos são referentes às médias obtidas em dois experimentos.

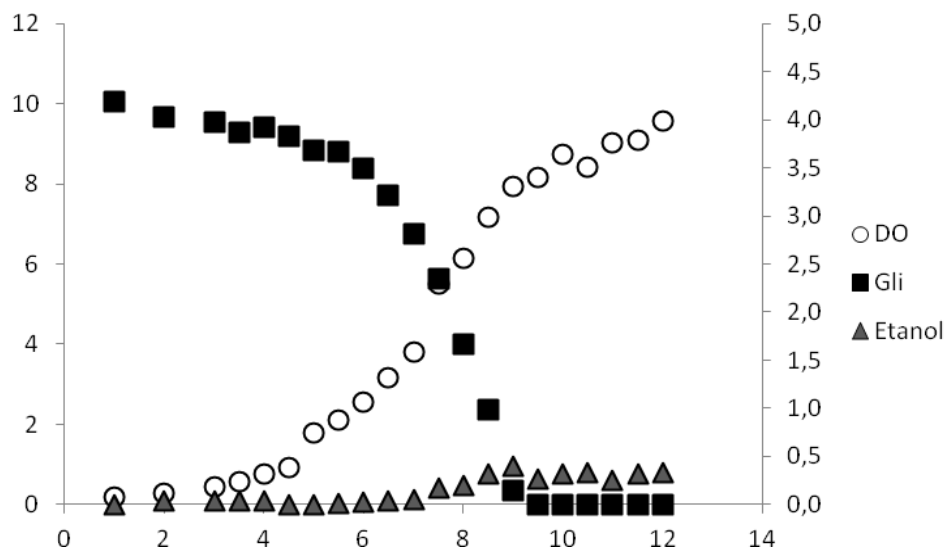


Figura 3.5 Cinéticas de crescimento, de consumo de glicose e de formação de etanol da levedura BB2. Dados obtidos são referentes às médias obtidas em dois experimentos.

Durante os cultivos verificou-se a formação de metabólitos em todas as linhagens (Anexo D), sendo o glicerol (86,6%) e o acetato (46,6%) os mais abundantes. Observou-se que o surgimento entre a maioria destes metabólitos ocorreu na fase exponencial. Haja vista que, nesta fase as condições estão favoráveis as metabolismo das leveduras (SCHMIDELL; FACCIOTI, 2001).

A linhagem BB9 foi a que mais produziu glicerol (0,4 g/L). Parazzi Jr. (2006) analisou a fermentação da CAT em meio YPD, e o autor verificou que houve a

produção de 0,11g/100ml de glicerol. Contudo, quanto maior for a produção de glicerol maior estresse a levedura sofreu durante o processo fermentativo (MYERS et al., 1997).

S. cerevisiae CAT-1 foi a levedura que obteve maior formação de acetato (0,16 g/L), as demais linhagens produziram acetato em pequenas quantidades que não excederam 0,08 g/L.

Dentre as linhagens 26,6% tiveram a formação de lactato, sendo a linhagem 29 a maior produtora deste metabólito (0,08 g/L). Apenas na linhagem BB1 foi observada a formação de succinato.

3.4 Conclusões

As leveduras 37 e BB2 apresentaram parâmetros cinéticos melhores que os resultados obtidos da *S. cerevisiae* CAT-1. Entretanto, a formação máxima de etanol foi inferior a mesma. Nas condições estudadas, *S. cerevisiae* CAT-1 pode ser considerada a mais adequada para a utilização em processos fermentativos visando a produção de etanol. Estudos em sacarose e em mosto industrial são importantes para dar-se continuidade a este trabalho.

3.5 Referências

- ALMEIDA, M. M. et al. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.8, p.35-42, 2006.
- ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M. G.S. Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB- Açúcar e Alcool e Subprodutos**, v.17, n.5, p.54-59, 1999.
- ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. **Bioresource Technology**. v. 99, p.3002–3008, 2008.
- ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processo de fermentação alcoólica (I) batelada alimentada. **STAB, Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 8, p. 36-40, 1990.
- BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Characterization and potential industrial applications of 5 novel, thermotolerant, fermentative yeast strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 304–306, 1995.

- BANAT, I. M.; MARCHANT, R. The use of a thermotolerant fermentative *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast strain for ethanol production. **ACTA Biotechnologica**, v. 16, p. 215-223, 1996.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. E LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BELLAVER, L. H.; CARVALHO, N. M. B.; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, v. 4, 691-698, 2004.
- BIROL, G.; DORUKER, P. KURDAR, B.; ONSAN, Z. I.; ULGE, K. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 33, 763-771, 1998.
- BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*); composição dos mostos e métodos de fermentação acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 236-243, 2001.
- BOTHA, A.; KOCK, J.L.F. Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p.39-51, 1993.
- ERASMUS, J. D.; VAN-DER-MERWE, I.; VAN-VUUREN, H. J. J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, p. 375-399, 2003.
- FONSECA, G. G. **Análise de Fluxos Metabólicos em *Kluyveromyces marxianus* utilizando substratos marcados com ¹³C**. 288 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, USP; 2007.
- GARAY-ARROYO, A.; COVARRUBIAS, A. A.; CLARK, I.; NINO, I.; GOSSET, G.; MARTINEZ, A. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 734-741, 2004.
- GOMBERT, A. K.; SANTOS, M. M.; CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1441-1451, 2001.
- GOMBERT, A. K. 2005. Fisiologia de diferentes leveduras industriais e de laboratório. Pedido de Auxílio à Pesquisa (Regular) FAPESP.
- GUILMAN, F.; BUZATO, J. B.; CELLICO, M. A. P. C. Comparação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em meio de melaço de cana-de-açúcar puro e pré-tratado com invertase. **Semina: Ciência, Biologia e Saúde**, Londrina, v. 20/21, p. 39-43, jun. 1999/2000.

HEARD, G.M.; FLEET, G.H. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. **Journal of Applied Bacteriology** 65, p. 23-88, 1988.

LIMA I. R.; MARCONDES, a. A. **Álcool carburante: uma estratégia brasileira**. Curitiba: Editora UFPR, 248 p., 2002.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, p. 66-71, 2001.

LIU, C.G.; LIN, Y. H.; BAI, F. W. A kinetic growth model for *Saccharomyces cerevisiae* grown under redox potential-controlled very-high-gravity environment **Biochemical Engineering Journal**. v. 56, p. 63– 68, 2011.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 688-693, 2007.

MYERS, D. K.; LAWLOR, D. T. M.; ATTFIELD, P. V. Influence activity and glicerol syntesis and retention on fermentation of media with a hig sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. Baltimore, v. 63, p. 145-1997.

OKPOKWASILI, G. C.; NWEKE, C. O. Microbial growth and substrate utilization kinetics. **African Journal of Biotechnology**. v.5, p. 305-317, 2005.

PARAZZI JUNIOR, O. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividade de invertase**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2006.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, cap. 8, p. 179-192, 2001.

STAMBUK, B. U.; SILVA, M. A.; PANEK, A. D. E ARAUJO, P. S. Active -glicoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Lett**. v. 170, p. 105-110, 1999.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2001.

STROPPIA, C. T. et al. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, edição especial, p. 1978-1983, 2009.

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

TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E.; SWARNAKAR, R.; HONORATO, F. L. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.) **Quim. Nova**, v. 29, p. 489-492, 2006.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2002.

4 ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CAT-1 COM GLICOSE ¹³C MARCADA

RESUMO

Cultivos com 100% de [1-¹³C] glicose foram conduzidos para a elucidação dos fluxos metabólicos em *S. cerevisiae* CAT-1. Para tal, utilizou-se a metodologia de análise de fluxos metabólicos (AFM) convencional, que é realizada de uma forma global, pela utilização de ajustes numéricos para toda uma rede metabólica definida. Os ensaios foram realizados em frascos agitados e as amostras obtidas durante o estado isotópico pseudo-estacionário durante o meio da fase exponencial de três cultivos distintos. A composição da biomassa foi obtida a partir de ensaios análogos com glicose normal para ser utilizada no cálculo dos fluxos. Foi observado um metabolismo respiro-fermentativo durante a fase exponencial. Enquanto que por um lado, frações de glicose desviadas para a via das pentoses fosfato e para a via fermentativa foram inferiores aos valores previamente reportados para outras linhagens de *S. cerevisiae*, por outro, o fluxo correspondente à enzima málica foi superior ao observada em estudos anteriores. O aumento da atividade desta enzima dá-se quando *S. cerevisiae* altera o metabolismo de puramente oxidativo para fermentativo. Além disso, o oxalacetato mitocondrial a partir de fumarato mitocondrial apresentou valor zero enquanto o acetaldeído formado foi completamente utilizado para a síntese de etanol e acetato. Estas constatações estão de acordo com o metabolismo fermentativo, embora a concentração de metabólitos excretados tenha sido baixa. Uma excelente concordância foi alcançada entre os padrões de marcação isotópica experimentalmente determinados e aqueles calculados pela modelagem matemática.

Palavras-chave: metabolismo, fluxômica, metabolômica, fermentação

4.1 Introdução

Os genomas de diferentes organismos têm sido sequenciados desde a última década, produzindo uma quantidade enorme de informação. No entanto, hoje em dia está evidente que informações somente no nível genômico não são suficientes para entender o funcionamento celular. É natural, portanto, que na era pós-genômica as atenções se voltem para os estudos que serão capazes de analisar, além do

genoma, o metaboloma - conjunto de metabólitos expressos por um organismo, e suas características fisiológicas, ou seja, das relações genótipo metabólico/fenótipo, e o fluxoma, onde a aplicação de ferramentas matemáticas permite a identificação de vias metabólicas e funções ainda não completamente esclarecidas, bem como a quantificação de seus fluxos metabólicos intracelulares.

A Análise de fluxos metabólicos (AFM) é uma metodologia baseada em medidas de velocidades específicas extracelulares, assumindo-se estado estacionário (ou pseudo-estacionário) para os metabólitos intracelulares e um modelo estequiométrico para o metabolismo examinado (WITTMANN; HEINZLE, 1999). Esta ferramenta tem sido amplamente utilizada para a quantificação de fluxos intracelulares no metabolismo central de microrganismos e células animais (GOMBERT; NIELSEN, 2000).

A AFM se baseia, numa primeira instância, num balanço dos fluxos de consumo e de excreção de metabólitos, dentro de um modelo estequiométrico reacional. Nesta técnica, substratos ^{13}C -marcados são utilizados e os produtos do metabolismo são analisados por métodos que distinguem diferentes padrões isotópicos de marcação. Esta interpretação global dos dados permite uma consideração integrada e quantitativa de todos dados fisiológicos e de ^{13}C -marcação (FONSECA, 2007). Com os modelos e *softwares* atualmente disponíveis, estes métodos de balanço isotopomérico têm atingido um nível elevado de precisão e aplicabilidade apesar de serem intensamente trabalhosos (SZYPERSKI, 1995; SAUER et al., 1999).

Sacharomyces cerevisiae tem sido o microrganismo modelo em pesquisas devido a uma série de vantagens: é geneticamente muito bem caracterizado (tendo sido o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado, por Goffeau et al., 1996), é reconhecido como seguro em processos biotecnológicos e permite fácil recuperação dos produtos devido ao seu sistema de secreção ser similar ao dos eucariotos superiores (NIELSEN, 1998).

Normalmente as modificações genéticas pretendidas são desenhadas levando em conta as características do processo de fermentação alcoólica tal como praticado nas unidades industriais brasileiras, de modo a gerar resultados passíveis de transferência ao setor produtivo. Neste sentido, pode-se introduzir uma série de modificações (inserções, deleções e expressão heteróloga) em linhagens industriais de *S. cerevisiae* isoladas como dominantes no processo fermentativo industrial para

alcançar três objetivos: a) redirecionar os fluxos metabólicos da levedura de forma a aumentar a produção de etanol, b) introduzir novas vias metabólicas heterólogas que permitam às células de levedura redirecionar os fluxos metabólicos originais com vistas ao aumento na produção de etanol, e c) introduzir novas vias metabólicas que tornem as células de *S. cerevisiae* aptas a fermentar fontes alternativas de carbono a etanol. Inicialmente a AFM de diferentes linhagens industriais, como *S. cerevisiae* CAT-1, seguido pela investigação dos fluxos de linhagens recombinantes já construídas ou em construção, permitirá localizar as ramificações do metabolismo onde diferenças nos fluxos de carbono possam ser observadas. Desta forma será possível identificar aquelas linhagens mais adequadas a alterações genéticas não só em função do etanol produzido, mas também pelo fluxo de carbono em função das vias metabólicas.

O objetivo deste trabalho foi investigar o metabolismo de *S. cerevisiae* CAT-1 através do uso da AFM utilizando glicose 1-¹³C marcada.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Levedura e preservação

Uma cultura pura de *S. cerevisiae* CAT-1 foi gentilmente cedida pela Usina São Fernando Açúcar e Álcool (USFAA) e preservada na forma liofilizada. A mesma cultura foi cultivada em meio YPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L¹; glicose, 20 g/L) até o fim da fase exponencial; glicerol foi adicionado a uma concentração final de 15% (p/v) e alíquotas de 1 mL desta cultura foram estocadas a -20°C. Para o preparo dos experimentos, uma alíquota-estoque foi utilizada para inocular uma placa contendo ágar extrato de levedura e malte (YMA), que foi armazenada a 4°C por até 3 meses.

4.2.2 Meio de cultura

O meio mineral (VERDUYN et al., 1992) continha por litro de água destilada: (NH₄)₂SO₄, 5,0 g; KH₂PO₄, 3,0 g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; elementos-traço (EDTA, 15 mg; ZnSO₄.7H₂O, 4,5 mg; MnCl₂.2H₂O, 0,84 mg; CoCl₂.6H₂O, 0,3 mg; CuSO₄.5H₂O, 0,3 mg; Na₂.MoO₄.2H₂O, 0,4 mg; CaCl₂.2H₂O, 4,5 mg; FeSO₄.7H₂O, 3,0 mg ;H₃BO₃, 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. Glicose foi esterilizada separadamente e adicionada à concentração final de 10 g/L.

4.2.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo consistiu em recolher uma colônia de uma placa de Petri contendo a linhagem desejada e transferi-la para um frasco tipo Erlenmeyer de 500 ml, contendo 250 ml do meio de cultura definido (com o pH ajustado para 6,0 com NaOH). Após tempo suficiente para que o final da fase exponencial de crescimento fosse atingida (a 30°C e 200 rpm), certa quantidade deste inóculo foi transferida para o cultivo principal.

4.2.4 Cultivos em incubador rotativo

Os cultivos principais foram realizados em duplicada em condições idênticas aos pré-cultivos, a partir de uma alíquota, tendo-se utilizado uma densidade óptica (DO) inicial ($\lambda = 600\text{nm}$) de 0,1. Para a análise de fluxos metabólicos, cultivos foram realizados de maneira análoga, exceto pela substituição da glicose normal por uma concentração equimolar de 99% [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glicose (Sigma-Aldrich). Além disso, utilizou-se frasco tipo Erlenmeyer de 25 mL, contendo 5 ml do meio de cultura definido.

4.2.5 Amostragens e preparo das amostras

Amostragens foram realizadas quando atingido o estado pseudo-estacionário, no tempo e na DO_{600} correspondentes ao meio da fase exponencial, de acordo com cultivos prévios com *S. cerevisiae* CAT-1 (Capítulo 3). Alíquotas foram filtradas com pressão positiva utilizando-se filtros de seringa de acetato celulose com membrana de 0,45 μm , para a retirada de células e obtenção de sobrenadante para a determinação da concentração de metabólitos extracelulares. Os sobrenadantes foram acondicionados em microtubos revestidos com filme plástico do tipo parafilm e armazenados a -20°C até sua utilização. Para a obtenção de biomassa para a determinação de proteínas e de cinzas, volumes conhecidos de meio foram filtrados a vácuo com membrana de 0,45 μm e secos em forno de microondas (80 W, 5 min). Os pellets celulares dos cultivos realizados com carbono ^{13}C marcado foram obtidos por centrifugação (4°C, 16.000 g por 5 min), ressuspensos em água MilliQ e

novamente centrifugados. Finalmente, as amostras foram congeladas a -80°C , para depois serem utilizadas nas análises de marcação com ^{13}C por espectrometria de massa.

4.2.6 Determinação do pH, da concentração de biomassa e da concentração de metabólitos extracelulares

pH foi obtido por meio de aferições potenciostáticas (Hanna Instruments pH 21) através da inserção do eletrodo no meio de cultivo. Concentração de biomassa em termos de gramas de massa celular por volume de cultura foi indiretamente determinada via medidas de densidade óptica realizadas com um espectrofotômetro (Nova Optical Systems UV-VIS modelo LGS 53) a 600 nm. Para este propósito, 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).

Glicose, etanol e ácidos orgânicos foram determinados por HPLC 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. 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).

4.2.7 Determinação da composição da biomassa

Conteúdo de proteína celular foi medido através do método microkjeldahl (AOAC, 1995). Conteúdo de carboidratos foi determinado utilizando o método fenol-ácido sulfúrico, como descrito por Dubois et al. (1956). Lipídeos foram extraídos das células utilizando uma mistura de clorofórmio e metanol, de acordo com Bligh e Dyer (1959). RNA foi quantificado de acordo com Benthin et al. (1991). Medidas de DNA realizadas de acordo com o método de Burton, como descrito por Herbert et al. (1971). Cinzas foram expressas como o percentual de resíduo restante após oxidação a seco, de acordo com a norma ASTM E1755-01 (2003).

4.2.8 Determinação de parâmetros durante fase exponencial de crescimento (EGP)

A EGP foi identificada como a região linear da plotagem do $\ln(X)$ em função do tempo para os dados de cultivo descontínuo. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max}) foi determinada como a inclinação desta reta. O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi determinado como a inclinação da linha obtida pela plotagem de X em função do S , incluindo exclusivamente pontos pertencentes a EGP. A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\mu_S = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

onde μ_{\max} = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}); X = concentração celular (g MCS L^{-1}); μ_S = velocidade específica de consumo de substrato durante a EGP (g (g MCS h)^{-1}); S = concentração de substrato (g/L); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato a células durante a EGP (g MCS g^{-1}); MCS = massa celular seca.

4.2.9 Análises de marcação com ^{13}C por espectrometria de massa

Frações de massa isotopoméricas de aminoácidos de células foram determinadas por cromatografia gasosa - espectroscopia de massa (GC-MS) (WITTMANN et al., 2002). Para este propósito, células (cerca de 1 mg de massa celular seca) foram coletadas da cultura e lavadas duas vezes com água deionizada e uma vez com solução de 0,9% (p v^{-1}) NaCl. O *pellet* foi então incubado com 50 μl de 6 M HCl por 24 h a 105°C, subsequentemente neutralizado com 6 M NaOH, e separado da matéria insolúvel por centrifugação (5 min; unidades filtrantes Ultrafree-MC, tamanho do poro de 0,22- μm , membrana Durapore; Millipore). A solução clara remanescente foi liofilizada. Análises de aminoácidos foram conduzidas após derivatização com 50 μl de dimetilformamida (DMF), contendo 0,1% de piridina e 50 μl de N-(terbutildimetilsilil)-N-metil-trifluoroacetamida (MBDSTFA) (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) (WITTMANN et al., 2002). Todas amostras foram primeiramente medidas em modo *scan* para checar uma interferência isobárica em potencial entre analitos e outros componentes da amostra. Os padrões de marcação de aminoácidos foram então determinados em triplicata via monitoramento de grupos

de íons selecionados, representando fragmentos com esqueletos carbônicos completos de aminoácidos. Espectros de impacto de elétrons (EI) foram analisados pelo uso de um *software* (FONSECA, 2007).

4.2.10 Somatória das marcações fracionárias (SFL)

A somatória das marcações fracionárias (SFL) de um fragmento de metabólito corresponde à soma da marcação fracionária de cada C-átomo individual presente naquele fragmento. Uma vez que os dados de saída das medições de GC-MS consistem da distribuição isotopomérica de massa de um dado fragmento de metabólito, é interessante expressar a SFL do fragmento como a função de sua distribuição isotopomérica de massa, de acordo com a seguinte fórmula:

$$SFL = \frac{0.m_0 + 1.m_1 + \dots + n.m_n}{m_0 + m_1 + \dots + m_n} \times 100 \quad \text{Eq. 4.2}$$

onde m_n indica a intensidade corrigida da fração isotopomérica de massa com n C-átomos marcados.

Para facilitar a comparação entre os estados de marcação de dois metabólitos com um diferente número de átomos de carbono, a marcação normalizada de carbono (CNL) foi calculada de acordo com a Eq. 4.3, onde SFL é a soma das frações marcadas de todos os carbonos no fragmento e n é o número de átomos de carbono no fragmento (BORODINA et al., 2005).

$$CNL = \frac{SFL}{n} \quad \text{Eq. 4.3}$$

7.2.11 Modelagem matemática

As SFLs, como descritas no subitem anterior, foram utilizadas como dados de entrada para uma rotina matemática numérica, que foi utilizada para quantificar os fluxos no metabolismo central de *S. cerevisiae* CAT-1. A construção matemática foi descrita previamente (CHRISTENSEN; NIELSEN, 2000) e não será mostrada em detalhes aqui. Em resumo, para cada iteração da rotina numérica, uma estimativa é feita para o conjunto de fluxos e é utilizada para calcular as SFLs através de um modelo matemático que representa as vias metabólicas centrais do microrganismo.

Em seguida, dois erros são gerados: o primeiro comparando-se os valores das SFLs calculadas com os valores medidos experimentalmente (via GC-MS, como descrito anteriormente); e o segundo comparando-se os valores dos fluxos calculados com os fluxos medidos experimentalmente. Se a soma destes dois erros é menor que o erro armazenado, a estimativa para o conjunto de fluxos utilizada nesta iteração é considerada a melhor. Caso contrário, esta estimativa é descartada. Em seguida, uma nova iteração é iniciada e o processo segue até que um erro aceitável seja atingido, o que significa que os fluxos estimados são suficientemente próximos da melhor distribuição de fluxos na rede metabólica investigada (FONSECA, 2007).

Em termos da drenagem de precursores para biossíntese (o que corresponde a uma parte dos chamados fluxos medidos), foi considerada a composição em termos de macromoléculas, para o estado pseudo-estacionário do cultivo de *S. cerevisiae*. Demandas anabólicas foram calculadas de acordo com Frick e Wittmann (2005), exceto C1, calculada de acordo com Gombert et al. (2001).

4.3 Resultados e discussão

Cultivos aeróbios em frascos agitados com glicose natural e [1-¹³C] glicose como substrato foram realizados para a elucidação dos fluxos metabólicos de *S. cerevisiae* durante o estado pseudo-estacionário de cultivo. A técnica para análise de fluxos metabólicos (AFM) utilizada foi a AFM convencional (FONSECA, 2007), realizada de modo global pela utilização de ajustes numéricos para todos os fluxos na rede metabólica (CHRISTENSEN; NIELSEN, 2000).

A partir dos cultivos com glicose natural não marcada obteve-se a seguinte composição para as células de *S. cerevisiae* CAT-1: 49,6% de proteínas, 8,0% de lipídios, 0,5% de DNA, 11,9% de RNA, 27,0% de carboidratos e 3,0% de cinzas. Estes valores estão de acordo com aqueles reportados na literatura para *S. cerevisiae* cultivadas em condições semelhantes (GOMBERT et al., 2001). Estes dados foram utilizados para a AFM.

A reprodutibilidade na determinação dos padrões de marcação de aminoácidos derivados da hidrólise da proteína celular foi primeiro verificada pela comparação dos resultados obtidos a partir de três cultivos independentes com [1-¹³C] glicose em estado pseudo-estacionário. O erro relativo para as frações isotopoméricas de massa para todos os fragmentos analisados foi inferior a 1%, confirmando o estado estacionário isotópico. A média das abundâncias corrigidas dos isotopômeros de massa correspondentes a diferentes fragmentos de aminoácidos e SFLs obtidas a partir de cultivos de *S. cerevisiae* CAT-1 em [1-¹³C] glicose são mostrados na Tabela 4.1. Para assegurar o ajuste do modelo, utilizaram-se as SFLs de diferentes aminoácidos derivados de mais de um metabólito precursor (GOMBERT et al., 2001; FONSECA, 2007).

A partir destes dados foi feita uma análise de fluxos metabólicos (AFM) conforme pode ser observada na Figura 4.1. Destaca-se que maior fluxo através da piruvato carboxilase em relação ao fluxo através da piruvato descarboxilase foi dirigido por maior demanda anabólica de oxalacetato citosólico ao invés do metabolismo fermentativo (Figura 4.1). O piruvato citosólico que é convertido em acetaldeído foi utilizado para formar tanto etanol como acetato, apesar do primeiro ter prevalecido. Apesar da formação de produtos fermentativos, os fluxos relacionados à formação destes produtos foram baixos quando comparados àqueles obtidos em trabalho anterior com *S. cerevisiae* em cultivo descontínuo (GOMBERT et al., 2001). Contudo os valores se assemelham aos fluxos que levam à formação destes produtos, obtidos em cultivos contínuos em taxas de diluição, que correspondem ao metabolismo respiro-fermentativo de *S. cerevisiae* (GOMBERT et al., 2001; ZHANG et al. 2003; FRICK; WITTMANN, 2005), apesar de que o oxalacetato mitocondrial a partir de fumarato mitocondrial apresentou valor zero, revelando um metabolismo tendente ao fermentativo em detrimento ao respiratório (Figura 4.1). Conforme reportado, uma produção de etanol não significativa pode ocorrer por conta de taxas de evaporação elevadas nos frascos agitados, que podem comprometer uma análise completa quantitativa dos fluxos (BLANK; SAUER, 2004).

Tabela 4.1 Abundâncias corrigidas dos isotopômeros de massa correspondentes a diferentes fragmentos de aminoácidos e SFLs obtidas a partir de cultivos de *S. cerevisiae* CAT-1 em [1-¹³C] glicose.

Metabólito	m/z	SFL	m ₀	m ₁	m ₂	m ₃	m ₄	m ₅	m ₆	m ₇	m ₈	m ₉
Ser	362	0,23	0,554	0,433	0,013							
Ser	390	0,16	0,547	0,431	0,015	0,007						
Ala	260	0,16	0,535	0,447	0,013	0,005						
Ala	232	0,23	0,578	0,383	0,039							
Val	288	0,19	0,333	0,412	0,216	0,033	0,001	0,005				
Leu	344	0,24	0,170	0,379	0,330	0,113	0,006	0,001	0,001			
Asp	302	0,05	0,927	0,042	0,031							
Asp	418	0,14	0,529	0,405	0,034	0,027	0,005					
Thr	376	0,18	0,503	0,454	0,039	0,004						
Thr	404	0,14	0,525	0,410	0,034	0,027	0,004					
Ile	200	0,20	0,311	0,420	0,238	0,024	0,006	0,001				
Glu	330	0,23	0,304	0,468	0,215	0,011	0,002					
Glu	432	0,20	0,324	0,413	0,227	0,029	0,006	0,001				
Lys	329	0,28	0,172	0,380	0,339	0,103	0,006	0,000				
Lys	431	0,23	0,170	0,379	0,339	0,105	0,007	0,000	0,000			
Arg	442	0,18	0,272	0,455	0,235	0,029	0,005	0,003	0,001			
Phe	234	0,16	0,214	0,419	0,290	0,066	0,007	0,002	0,001	0,000	0,001	
Phe	336	0,14	0,217	0,418	0,282	0,070	0,009	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000
Tyr	466	0,14	0,214	0,413	0,282	0,076	0,010	0,002	0,001	0,001	0,001	0,000
His	338	0,09	0,607	0,348	0,027	0,010	0,005	0,003				

Ser: serina; Ala: alanina; Val: valina, Leu: leucina; Asp: aspartato; Thr: treonina; Ile: isoleucina; Glu: glutamato; Lys: lisina; Arg: arginina; Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina; His: histidina

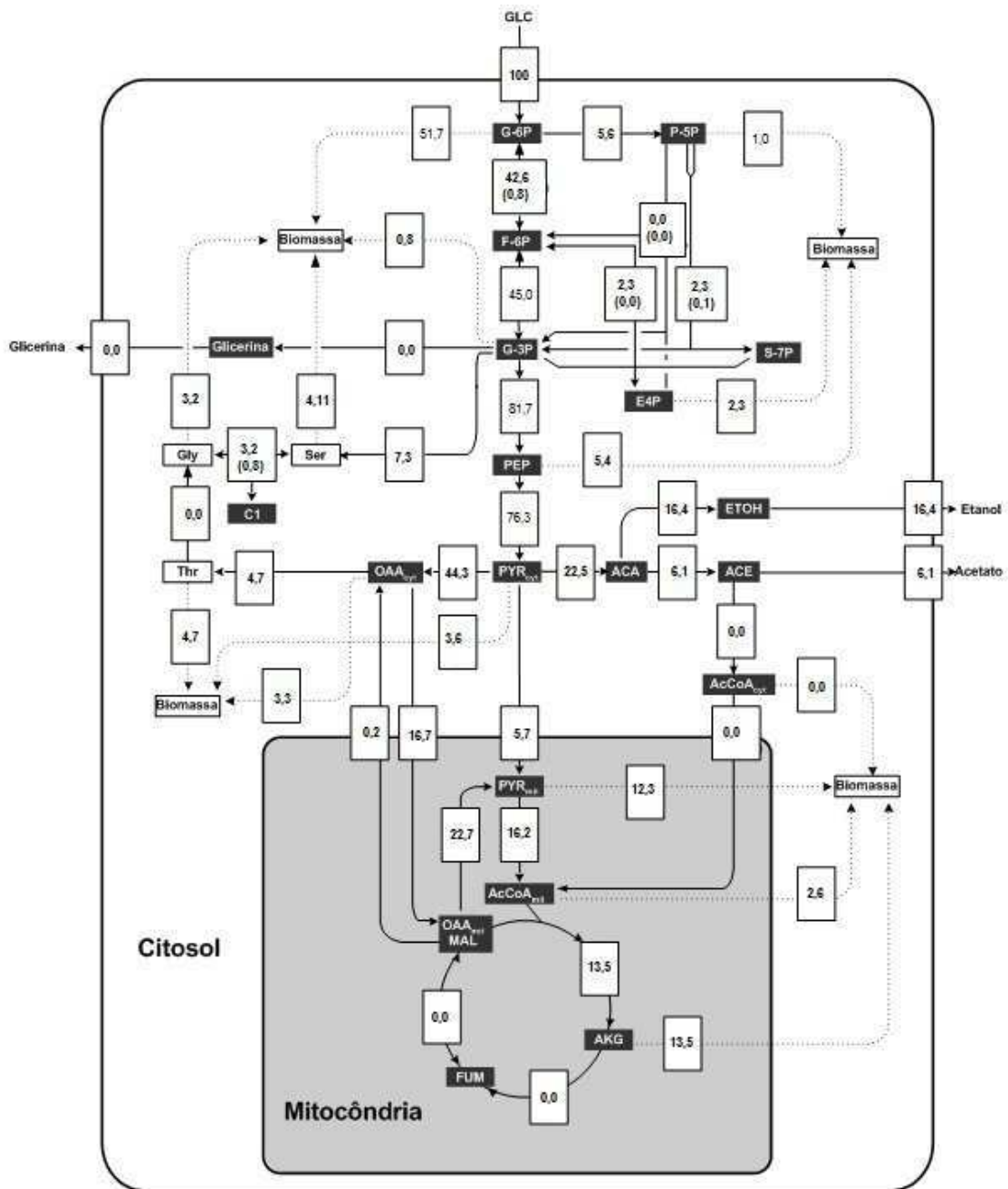


Figura 4.1 Distribuição de fluxos metabólicos em *S. cerevisiae* CAT-1 cultivada em frasco agitado com $[1-^{13}\text{C}]$ glicose como substrato limitante, sob condições aeróbias, com os dados de marcação e metabólitos extracelulares medidos durante o estado pseudo-estacionário. Todos os fluxos são relativos ao consumo de 100 unidades arbitrárias de glicose. Os valores dos fluxos para reações reversíveis estão indicados entre parênteses, representando uma fração do fluxo no sentido oposto da reação.

A concentração de glicose (YIN et al., 2003; MEIJER et al., 1998), sua velocidade de consumo (BLANK; SAUER, 2004) ou a velocidade específica de crescimento do microrganismo (FONSECA et al., 2007) são fatores responsáveis por desencadear fermentação aeróbia em leveduras aeróbio-respiratórias e aeróbio-fermentativas. Baseando-se nos demais fluxos que indiretamente levam a formação de etanol, acredita-se que a concentração de glicose no meio de cultivos pode não ter sido suficientemente alta para causar uma elevada fermentação alcoólica, apesar de *S. cerevisiae* CAT-1 ser reconhecidamente uma das principais leveduras utilizadas em processos industriais, sua produção de etanol ocorre em ambiente de alta pressão osmótica (SALVATO, 2010). Um rendimento de etanol alto requer alta concentração inicial de açúcar que gera uma alta pressão osmótica dos meios sobre as células. O efeito da pressão osmótica pode ser observado em destilarias brasileiras quando a concentração de açúcar no mosto é maior ou igual a 250 g/L (SOUZA, 2009). Deste modo, é possível que o metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* precise de concentrações de glicose ainda maiores para desencadear uma alta formação de etanol.

No metabolismo puramente oxidativo, o acetaldeído formado é completamente convertido em acetil CoA citosólico, que é tanto utilizado para anabolismo no citossol, como transportado para a mitocôndria (POSTMA et al., 1989; BELLAVER et al., 2004; FRICK; WITTMANN, 2005). Neste estudo, o acetaldeído formado foi completamente utilizado para a síntese de etanol e acetato (Figura 4.1).

Grande parte do carbono proveniente do fluxo através da piruvato carboxilase foi transportado para a mitocôndria pelo fluxo de oxalacetato (Figura 4.1). Isto supriu em grande parte a demanda por proteína e ácidos nucleicos na biomassa celular, exigida principalmente devido à aceleração do metabolismo oxidativo da fase exponencial, haja vista que este carbono seguiu tanto para a formação de α -cetoglutarato ou piruvato mitocondrial, via atividade da enzima málica ($OAA_{mit} \rightarrow PYR_{mit}$), ambos culminando em biomassa (Figura 4.1). Contudo a drenagem de oxaloacetato citossólico ou mesmo do próprio piruvato citosólico diretamente para a formação de biomassa pouco ocorreu (Tabela 4.1). A atividade da enzima málica foi superior à observada em estudos anteriores para *S. cerevisiae* (GOMBERT et al., 2001; FRICK; WITTMANN, 2005). O aumento da atividade desta enzima dá-se quando *S. cerevisiae* altera o metabolismo de puramente oxidativo para fermentativo

(FRICK; WITTMANN, 2005), que está associado ao fluxo através da piruvato carboxilase citosólica e o transportador de oxalacetato (FONSECA, 2007).

De acordo com Frick e Wittmann (2005), a partição de fluxo entre glicólise e PPP não se relaciona à capacidade de glicose 6-fosfato desidrogenase, mas à velocidade específica de crescimento. Este fluxo estaria relacionando com a demanda por NADPH, bem como na demanda por precursores como R5P e E4P (FONSECA, 2007). Assim, o baixo fluxo relativo através da PPP (Figura 4.1) pode ser relacionado à baixa demanda de NADPH para as várias reações anabólicas (Tabela 4.2). Neste mesmo nó da G6P, existe um fluxo referente à fração deste composto que mostra que grande parte do carbono foi desviada para a formação de biomassa (carboidratos).

Uma excelente concordância foi alcançada entre os padrões de marcação isotópica experimentalmente determinados e aqueles calculados pela modelagem matemática (CNL) (Tabela 4.3). A mesma afirmação vale para os fluxos metabólicos (Tabela 4.4). O erro entre fluxos medidos e calculados foi sempre inferior a 1,7% enquanto o erro entre isotopômeros de massa (CNL) foi sempre inferior a 4,6%.

A atual demanda precursora para a biossíntese de glicina depende da contribuição da via de serina (a partir de fosfoglicerato) e treonina aldolase (a partir de oxalacetato). Baseando-se na atividade relativa de ambas vias, a demanda correspondente foi adicionada apropriadamente para fosfoglicerato e oxaloacetato, respectivamente. A demanda de piruvato citosólico e mitocondrial para a síntese de alanina depende da contribuição relativa da rota citosólica e mitocondrial para a síntese de alanina. Composição de proteínas, lipídeos e RNA em termos de aminoácidos, fosfolipídeos e nucleotídeos, respectivamente, foram calculadas de acordo com Frick e Wittmann (2005). Demandas anabólicas foram calculadas de acordo com Frick e Wittmann (2005), exceto C1, calculada de acordo com Gombert et al. (2001).

Tabela 4.2 Demanda anabólica de *S. cerevisiae* CAT-1 durante cultivos em frascos agitados. Os dados são expressos em $\mu\text{mol}/(\text{g MCS})$ e foram calculados a partir da composição celular.

Composto	Demanda anabólica
Glicose 6-fosfato	1746
Eritrose 4-fosfato	290
Pentose 5-fosfato	131
Gliceraldeído 3-fosfato	88
Fosfoglicerato (para lipídios, nucleotídeos)	32
Fosfoglicerato (para serina + cisteína)	410
Fosfoglicerato/Oxalacetato (para glicina) ^a	282
Oxaloacetato (para treonina, metionina, isoleucina)	346
Oxaloacetato (para outros)	470
Fosfoenolpiruvato	546
Piruvato (para alanina) ^b	363
Piruvato (mitocondrial, para outros)	1172
Acetil-CoA (citosólico)	2420
Acetil-CoA (mitocondrial)	258
2-Oxoglutarato	1205
C-1	390
NADPH	12095

Tabela 4.3 CNLs a partir de cultivos de *S. cerevisiae* CAT-1 em frascos agitados

Metabólito	m/z	C átomos no fragmento	Precursor reportado	Correspondência C-átomo reportada	CNL (%) medida	CNL (%) calculada
Ser	362	2,3	G3P	2,3	46,0	46,8
Ser	390	1,2,3	G3P	1,2,3	48,3	48,5
Ala	260	1,2,3	PYR	1,2,3	48,8	48,5
Ala	232	2,3	PYR	2,3	46,0	46,8
Val	288	1,2,3,4,5	PYR	1,2,3,4,5	97,3	98,6
Leu	344	1,2,3,4,5,6	PYR + AcCoA	2,2,3,3 + 1,2	141,2	140,4
Asp	302	1,2	OAA	1,2	10,3	10,9
Asp	418	1,2,3,4	OAA	1,2,3,4	57,3	56,5
Thr	376	2,3,4	OAA	2,3,4	54,3	56,5
Thr	404	1,2,3,4	OAA	1,2,3,4	57,6	59,6
Ile	200	2,3,4,5,6	OAA + PYR	2,3,4 + 2,3	99,8	103,3
Glu	330	2,3,4,5	AKG	2,3,4,5	93,8	93,6
Glu	432	1,2,3,4,5	AKG	1,2,3,4,5	98,5	100,5
Lys	329	2,3,4,5,6	AKG + AcCoA	2,3,4,5 + 2	139,0	138,9
Lys	431	1,2,3,4,5,6	AKG + AcCoA	2,3,4,5 + 1,2	140,0	140,4
Arg	442	1,2,3,4,5,6	AKG + AcCoA	1,2,3,4,5 + 2	105,2	100,6
Phe	234	2,3,4,5,6,7,8,9	E4P + PEP	1,2,3,4 + 2,2,3,3	125,0	124,8
Phe	336	1,2,3,4,5,6,7,8,9	E4P + PEP	1,2,3,4 + 1,2,2,3,3	125,5	126,4
Tyr	466	1,2,3,4,5,6,7,8,9	E4P + PEP	1,2,3,4 + 1,2,2,3,3	127,5	126,4
His	338	2,3,4,5	P5P + CO	1,2,3,4 + 1	46,7	46,8

Ser: serina; Ala: alanina; Val: valina, Leu: leucina; Asp: aspartato; Thr: treonina; Ile: isoleucina; Glu: glutamato; Lys: lisina; Arg: arginina; Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina; His: histidina; G3P: gliceraldeído-3-fosfato; PYR: piruvato; P5P: pentose-5-fosfato; E4P: eritrose-4-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; AcCoA: acetilCoA; AKG: α -cetogluturato; OAA: oxalacetato; OGA: oxoglutarato; CO: carbono; CNL: marcação de carbono normalizada.

Tabela 4.4 Fluxos metabólicos medidos e calculados (moles por 100 moles de glicose consumidos) de *S. cerevisiae* CAT-1 durante cultivos em frascos agitados

Fluxo	Medido	Calculado
v31: P5P \leftrightarrow P5P _{OUT}	1.3	1.0
v32: E4P \leftrightarrow E4P _{OUT}	2.9	2.3
v33: G3P \leftrightarrow G3P _{OUT}	0.9	0.9
v34: PEP \leftrightarrow PEP _{OUT}	5.5	5.4
v35: PYR ^{MIT} \leftrightarrow PYRMIT _{OUT}	11.7	12.3
v36: PYR ^{CYT} \leftrightarrow PYRCYT _{OUT}	3.6	3.6
v37: OAA ^{CYT} \leftrightarrow OAACYT _{OUT}	3.5	3.4
v38: AKG \leftrightarrow AKG _{OUT}	12.0	13.5
v39: ACCOA ^{CYT} \leftrightarrow ACCOA ^{CYT} _{OUT}	0.0	0.0
v40: ACCOA ^{MIT} \leftrightarrow ACCOA ^{MIT} _{OUT}	2.6	2.7
v41: SER \leftrightarrow SER _{OUT}	4.1	4.1
v42: GLY \leftrightarrow GLY _{OUT}	2.8	3.2
v43: C1 \leftrightarrow C1 _{OUT}	3.9	3.2
v44: THR \leftrightarrow THR _{OUT}	4.7	4.7

v: fluxo metabólico; G6P: glicose-6-fosfato; P5P: pentose-5-fosfato; G3P: gliceraldeído-3-fosfato; E4P: eritrose-4-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PYR: piruvato; ACCOA: acetilCoA; AKG: α -cetoglutarato; OAA: oxalacetato; GLY: glicerina; C1: carbono; GLY: glicina; SER: serina; THR: treonina; ^{CYT}, citosólico; ^{MIT}, mitocondrial; _{OUT}, para formação de biomassa

4.4 Conclusões

O mapa metabólico de *S. cerevisiae* CAT-1 obtido demonstra um metabolismo respiro-fermentativo. De forma interessante, o fluxo correspondente à enzima málica foi superior ao observada em estudos anteriores, alterando o metabolismo de puramente oxidativo para fermentativo, porém a concentração de metabólitos excretados, como o etanol, não refletiu sobre isto, pois foi baixa. A excelente concordância entre os padrões de marcação isotópica experimentalmente determinados e aqueles calculados pela modelagem matemática indica que esta ferramenta analítica pode ser utilizada com segurança para a investigação do metabolismo. Contudo, no caso deste estudo seria preciso inserir novas vias não contempladas no modelo reacional, como aquela que conduz a formação de trealose, bem como utilizar outras demanda anabólicas reportadas na literatura para *S. cerevisiae* que permitam um ajuste ainda melhor do modelo.

4.5 Referências

BELLAVER, L. H.; DE CARVALHO, N. M. B.; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 691-698, 2004.

BENTHIN, S.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. A simple and reliable method for the determination of cellular RNA content. **Biotechnology Techniques**. v. 5, p. 39-42, 1991.

BLANK, L. M.; SAUER, U. TCA cycle activity in *Saccharomyces cerevisiae* is a function of the environmentally determined specific growth and glucose uptake rates. **Microbiology**. v. 150, p. 1085-1093, 2004.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p. 911-917, 1959.

BORODINA, I.; SCHÖLLER, C.; ELIASSON, A.; NIELSEN, J. Metabolic network analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* species with an active Entner-Doudoroff Pathway. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2294–2302, 2005.

CHRISTENSEN, B.; NIELSEN J. Metabolic network analysis on *Penicillium chrysogenum* using ¹³C-labeled glucose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p.652-659, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** v. 28, p. 350-356, 1956.

FONSECA, G. G. **Análise de Fluxos Metabólicos em *Kluyveromyces marxianus* utilizando substratos marcados com 13C**. 2007. 288 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, USP; 2007.

FRICK, O.; WITTMANN, C. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C. **Microbial Cell Factories**, v. 30, p. 30-45, 2005.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 546, p. 563-567, 1996.

GOMBERT, A. K.; NIELSEN, J. Mathematical modelling of metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.11, p.180-186, 2000.

GOMBERT, A. K.; DOS SANTOS, M. M.; CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p.1441-1451, 2001.

HERBERT, D.; PHIPPS, P. J.; STRANGE, R. E. **Chemical analysis of microbial cells**. Methods in Microbiology, v. 5B. (Norris JR , Ribbons DW, eds), pp. 210-344. Academic Press, London. 1971.

MEIJER, M. M. C.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to glucose concentration rather than the glucose flux. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 24102-24107, 1998.

NIELSEN, J. Metabolic Engineering: Techniques for analysis of targets for genetic manipulations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 125-132, 1998.

POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. **Yeast**. v. 5, p. 159-165, 1989.

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 468-477, 1989.

SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa**. 93 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.

SAUER, U.; LASKO, D. R.; FIAUX, J.; HOCHULI, M.; GLASER, R.; SZYPERSKI, T.; WÜTHRICH, K.; BAILEY, J. E. Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 6679-6688, 1999.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 155f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, USP; 2009.

SZYPERSKI, T. Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, p. 433-448, 1995.

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

WITTMANN, C.; HEINZLE, E. Mass spectrometry for metabolic flux analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p. 739-750, 1999.

WITTMANN, C.; HANS, M.; BLUEMKE, W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. **Yeast**. v. 19, p. 1351-1363, 2002.

YIN, Z.; WILSON, S.; HAUSER, N.C.; TOURNU, H.; HOHEISEL, J. D.; BROWN, A. J. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 713-724, 2003.

ZHANG J, YUAN H, WEN T, XU F, DI Y, HUO K, LI YY. Cloning of the KcURA3 gene and development of a transformation system for *Kluyveromyces cicerisporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, 4, p. 387-391, 2003.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Das 50 leveduras analisadas, 15 leveduras apresentaram características apropriadas para atender as condições empregadas para a caracterização bioquímica.

Quanto a caracterização molecular, as leveduras apresentaram amplificação de diversos tamanhos, sendo necessário a realização de análise molecular por PCR-RFLP onde o perfil de bandas gerado será utilizado para determinar o grau de similaridade entre as linhagens de leveduras através da construção de um dendograma. O produto amplificado por PCR será submetido ao sequenciamento de DNA, o que possibilitará identificar a sequência nucleotídica de cada isolado, bem como estudos filogenéticos para determinar a relação evolutiva entre os isolados.

As leveduras selecionadas foram capazes de realizar a fermentação, com produção de etanol variando de 0,13 a 0,87 g/L, e formação de metabólicos. As linhagens 37 e BB2 apresentaram parâmetros cinéticos melhores que os resultados obtidos da *S. cerevisiae* CAT-1. Entretanto, a formação máxima de etanol foi inferior a mesma. Nas condições estudadas *S. cerevisiae* CAT-1 pode ser considerada a mais adequada para a utilização em processos fermentativos visando a produção de etanol. Estudos em sacarose e em mosto industrial são importantes para dar-se continuidade a este trabalho.

6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados em anais de congressos

CAMARGO, J. Z. ; MACIEL, W. G.; SIMIONATTO, S.; FONSECA, G. G. Caracterização bioquímica, morfológica e molecular de 46 linhagens de leveduras isoladas da região centro oeste brasileira. In: 7º Congresso Internacional de Bioenergia, 2012, São Paulo, SP. Anais do 7º Congresso Internacional de Bioenergia, 2012.

GONCALVES, F. A.; PERDOMO, I. C.; STEFANELLO, I.; CAMARGO, J. Z.; FONSECA, G. G. Isolamento de leveduras de diferentes amostras e avaliação de suas propriedades de assimilação e fermentação de substratos visando à produção de etanol. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011. p. 1-6.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

CAMARGO, J. Z. ; FONSECA, G. G. Cinéticas de leveduras isoladas da Cereja do Rio Grande visando à obtenção do etanol. In: II Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina -II SIMBBTEC 2012, 2012, Londrina. II SIMBBTEC 2012 - Biotecnologia e Desenvolvimento Sustentável, 2012.

CAMARGO, J. Z.; FONSECA, G. G. Avaliação da capacidade de assimilação e fermentação da levedura CAT-1 em diferentes açúcares. In: II Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina -II SIMBBTEC 2012, 2012, Londrina. II SIMBBTEC 2012 - Biotecnologia e Desenvolvimento Sustentável, 2012.

PERDOMO, I. C.; CAMARGO, J. Z.; FONSECA, G. G. Análise Micromorfológica e Macromorfológica de Leveduras Bioprospectadas do Cerrado Brasileiro. In: 4º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul e 4º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, 2011, Cascavel. Anais do 4º Congresso de

Ciências Farmacêuticas do Mercosul e 4º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, 2011.

CAMARGO, J. Z.; FONSECA, G. G. Avaliação do crescimento cinético de duas leveduras isoladas a partir de frutos visando à obtenção do etanol. In: I Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - I SIMBBTEC, 2011, Londrina - Pr. I Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - I SIMBBTEC, 2011.

Resumos publicados em anais de congressos

CAMARGO, J. Z.; GONCALVES, F. A.; PERDOMO, I. C.; FONSECA, G. G. Evaluation of the Capacities os assimilation and fermentation of several yeasts strains isolated from exotic frutis from the Brazilian Savannah. In: Environmental Microbiology & Biotechnology Conference - EMB2012, 2012, Bologna. Anais do EMB2012, 2012.

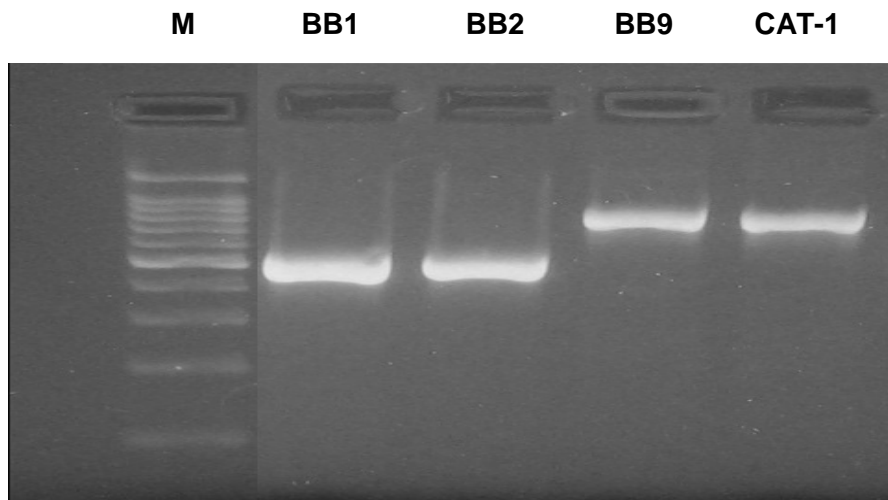
PERDOMO, I. C.; CAMARGO, J. Z.; FONSECA, G. G. Morphological analysis of yeasts bioprospected from the brazilian savannah. In: Environmental Microbiology & Biotechnology Conference - EMB2012, 2012, Bologna. Anais do EMB2012, 2012.

CAMARGO, J. Z.; PERDOMO, I. C.; SILVA, R. O.; CEREDA, M. P.; FONSECA, G. G. Growth kinetics of yeast strain isolated from the Brazilian savannah. In: Environmental Microbiology & Biotechnology Conference - EMB2012, 2012, Bologna. Anais do EMB2012, 2012.

CAMARGO, J. Z.; FONSECA, G. G. Avaliação das cinéticas de crescimento de duas leveduras isoladas a partir do pequi (*Caryocar brasiliense*) na região Centro Oeste, visando à produção do etanol. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.

ANEXOS

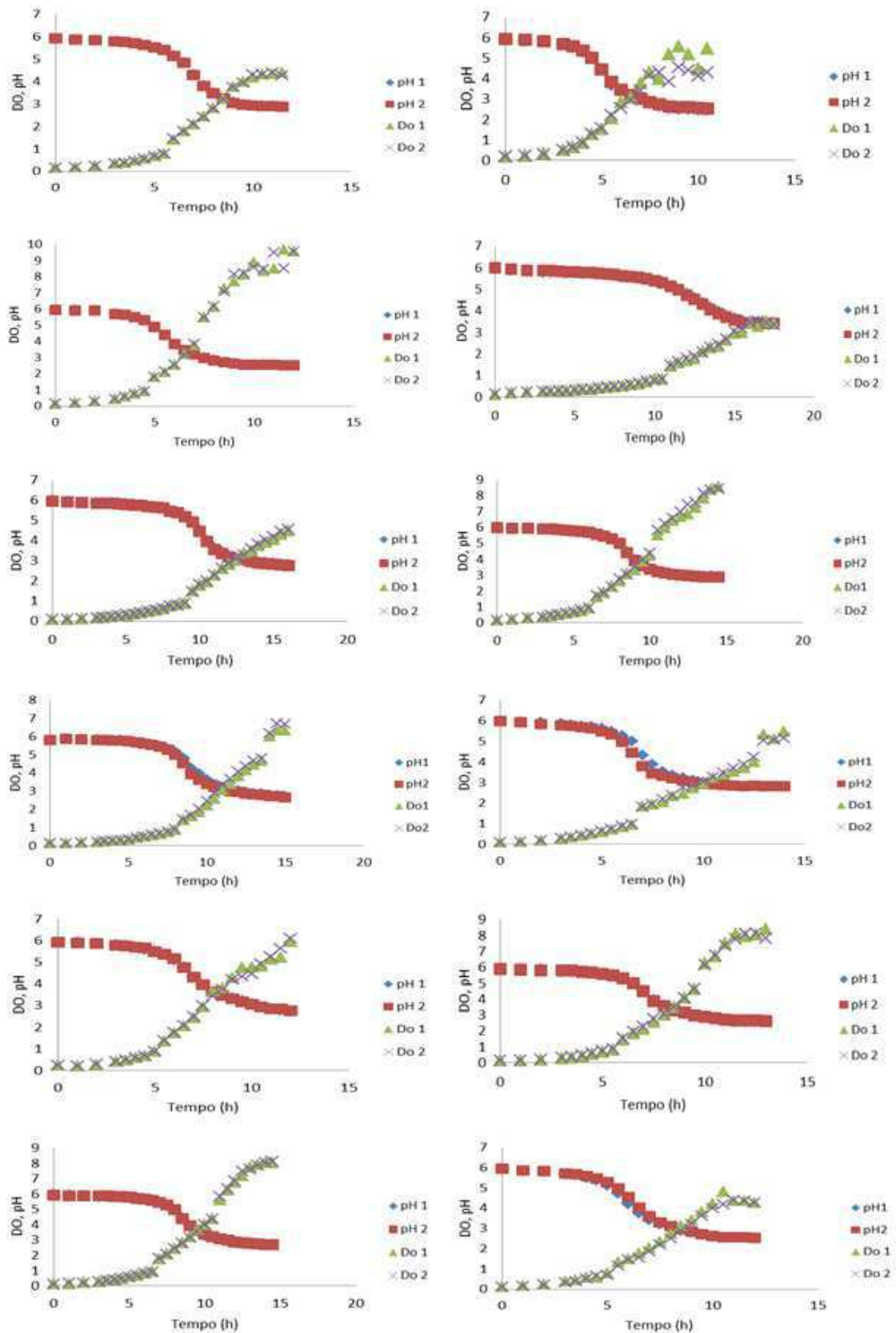
Anexo 1 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do produto amplificado por PCR de leveduras isoladas industrialmente. Coluna M, marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb (Promega); seguido das colunas das respectivas leveduras BB1, BB2, BB9 e CAT-1.



Anexo 2 Caracterização morfológica das linhagens avaliadas.

Linhagens	Textura	Cor	Superfície	Bordo
BB1	Rugosa	Creme	Plana	Irregular
BB2	Rugosa	Creme	Plana	Irregular
BB9	Lisa	Creme	Plana	Regular

Anexo 3 Cinéticas de crescimento em glicose (linhagens *S. cerevisiae* Cat-1, BB1, BB2, BB9, 3, 9, 10, 12, 29, 37, 39, 41, da direita para a esquerda, de cima para baixo).



Anexo 4 Dados experimentais referentes às cinéticas de crescimento.

Linhagem CAT-1 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,189	10,2562	0	0	0	0	0
2	0,247	10,0707	0	0	0	0	0
3	0,335	9,3854	0	0	0	0	0
3,5	0,379	9,6682	0	0	0	0	0
4	0,47	9,8286	0,0013	0	0	0	0
4,5	0,559	9,6098	0,1316	0	0,0376	0	0
5	0,683	9,2970	0,1505	0	0	0	0
5,5	0,778	8,9707	0,1619	0	0,0315	0	0
6	1,42	8,8762	0,1932	0	0,0134	0	0
6,5	1,795	8,4816	0,2129	0	0,1363	0	0
7	2,1	7,6248	0,2604	0	0,0657	0	0
7,5	2,455	7,1185	0,3023	0	0,0677	0	0,0064
8	2,835	6,1746	0,3556	0	0,1848	0	0,0192
8,5	3,245	5,0692	0,5507	0	0,0599	0	0,0084
9	3,765	3,6803	0,5139	0	0,0998	0	0,0167
9,5	3,985	2,2664	0,5817	0	0,0705	0	0,0111
10	4,195	1,0771	0,6146	0	0,0992	0	0,0149
10,5	4,32	0,0075	0,6562	0	0,0945	0	0,0139
11	4,345	0,1274	0,8127	0	0,1001	0	0
11,5	4,415	0,0226	0	0	0	0	0

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,188	10,0703	0	0	0	0	0
2	0,246	10,0569	0	0	0	0	0
3	0,338	10,0697	0	0	0	0	0
3,5	0,384	10,1866	0	0	0,0847	0	0
4	0,467	9,9458	0,1223	0	0,0332	0	0
4,5	0,556	9,7316	0,1284	0	0,0326	0	0
5	0,665	9,4827	0,1523	0	0,0497	0	0
5,5	0,777	9,1238	0,1508	0	0,0481	0	0
6	1,45	8,6770	0,1986	0	0,0550	0	0
6,5	1,8	8,3442	0,2200	0	0,1375	0	0
7	2,105	7,6206	0,2593	0	0,1426	0	0
7,5	2,42	7,0536	0,2655	0	0,1526	0	0
8	2,81	5,6074	0,3539	0	0,0338	0	0,0272
8,5	3,195	4,6884	0,4260	0	0,0864	0	0,0139
9	3,75	3,5883	0,5202	0	0,0930	0	0,0159
9,5	3,94	2,0946	0,5791	0	0,0890	0	0,0161
10	4,32	0,9669	0,6263	0	0,0655	0	0,0138
10,5	4,325	0,1326	0,5855	0	0,0936	0	0,0136
11	4,415	0,1350	0,8421	0	0,0993	0	0
11,5	4,265	0,1239	0,5590	0	0,0987	0	0

Linhagem 3 (A)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACEt (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,105	10,1405	0	0	0	0	0
2	0,128	10,0380	0	0	0	0	0
3	0,164	10,1004	0	0	0	0	0
3,5	0,195	10,0542	0	0	0	0	0
4	0,231	10,0051	0	0	0	0	0
4,5	0,263	10,0151	0	0	0	0	0
5	0,309	9,7879	0	0	0	0	0
5,5	0,362	9,7601	0	0	0	0	0
6	0,413	9,5289	0	0	0	0	0
6,5	0,478	8,9236	0	0	0	0	0
7	0,556	8,8009	0	0	0	0	0
7,5	0,617	8,1560	0	0	0	0	0
8	0,754	7,6274	0	0,0087	0	0	0
8,5	0,811	7,2650	0	0	0	0	0
9	0,908	6,8210	0	0,0115	0	0	0
9,5	1,530	6,8921	0	0,0098	0	0	0
10	1,795	6,0310	0	0,0115	0	0	0
10,5	1,975	5,7831	0	0,0081	0	0	0
11	2,300	5,3192	0	0,0100	0	0	0
11,5	2,625	5,1587	0	0,0122	0	0	0
12	2,835	5,0360	0,0374	0,0147	0	0	0
12,5	3,010	4,5560	0,0003	0,0132	0	0	0
13	3,395	4,4991	0,0538	0,0251	0	0	0
13,5	3,505	3,6061	0,0366	0,0225	0	0	0
14	3,745	2,6952	0,0344	0,0175	0	0	0
14,5	3,935	2,0209	0,0602	0,0245	0	0	0
15	4,055	1,3507	0,0479	0,0246	0	0	0
15,5	4,340	0,3807	0,0533	0,0245	0	0	0
16	4,485	0	0,1027	0,0403	0	0	0

Linhagem 3 (B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACEt (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,1014	10,0000	0	0	0	0	0
2	0,127	10,2298	0	0	0	0	0
3	0,163	10,1724	0	0	0	0	0
3,5	0,195	10,0984	0	0	0	0	0
4	0,233	10,2014	0	0	0	0	0
4,5	0,264	10,0120	0	0	0	0	0
5	0,311	10,0252	0	0	0	0	0
5,5	0,357	9,7003	0	0	0	0	0
6	0,412	9,6298	0	0	0	0	0
6,5	0,482	8,9397	0	0	0	0	0
7	0,551	8,3555	0	0	0	0	0
7,5	0,618	7,9680	0	0	0	0	0
8	0,748	7,6185	0	0	0	0	0
8,5	0,807	7,5669	0	0	0	0	0
9	0,906	7,1000	0	0,0094	0	0	0
9,5	1,465	6,7168	0	0,0094	0	0	0
10	1,825	6,5027	0	0,0108	0	0	0
10,5	2,005	6,4098	0	0,0117	0	0	0
11	2,300	5,5272	0	0,0089	0	0	0
11,5	2,635	5,1302	0,0140	0,0138	0	0	0
12	2,885	5,0120	0,0073	0,0147	0	0	0
12,5	3,12	4,7104	0,0153	0,0149	0	0	0
13	3,285	4,4132	0,0142	0,0174	0	0	0
13,5	3,59	4,0002	0,0303	0,0204	0	0	0
14	3,82	3,1113	0,0171	0,0109	0	0	0
14,5	4,04	2,8773	0,0575	0,0174	0	0	0
15	4,18	2,4287	0,0746	0,0245	0	0	0
15,5	4,45	1,8539	0,0405	0,0182	0	0	0
16	4,56	1,2645	0,0525	0,0185	0	0	0

Linhagem 9 (A)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,206	10,0389	0	0	0	0	0
2	0,314	10,3283	0	0	0	0	0
3	0,358	10,2732	0	0	0	0	0
3,5	0,414	9,8948	0	0	0	0	0
4	0,491	9,6289	0	0	0	0	0
4,5	0,588	9,5343	0,0079	0	0	0	0
5	0,672	9,0162	0,0054	0	0	0	0
5,5	0,759	9,0910	0,0051	0	0	0	0
6	0,898	8,6025	0,0147	0	0	0	0
6,5	1,635	8,6719	0,0277	0,0078	0	0	0
7	1,91	8,6193	0,0106	0,0134	0	0	0
7,5	2,285	8,1285	0,0074	0,0105	0	0	0
8	2,62	6,6742	0,0181	0,0089	0	0	0
8,5	3,085	7,2645	0,0204	0,0123	0	0	0
9	3,34	6,2260	0,0342	0,0181	0	0	0
9,5	3,855	0	0	0	0	0	0
10	4,265	5,8526	0,0280	0,0168	0	0	0
10,5	5,52	5,1251	0,0362	0,0179	0	0	0
11	5,98	4,7509	0,0475	0,0168	0	0	0
11,5	6,44	4,6631	0,0863	0,0306	0	0	0
12	6,69	4,0193	0,0874	0,0249	0	0	0
12,5	6,87	3,2404	0,1032	0,0270	0	0	0
13	7,26	2,9285	0,1262	0,0296	0	0	0
13,5	7,88	2,9398	0,1996	0,0401	0	0	0
14	8,4	1,9195	0,1277	0,0308	0	0	0
14,5	8,55	1,3360	0,2690	0,0496	0	0	0

Linhagem 9 (B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,201	10,0636	0	0	0	0	0
2	0,298	10,4063	0	0,0058	0	0	0
3	0,356	10,1077	0	0	0	0	0
3,5	0,44	10,3202	0	0	0	0	0
4	0,488	9,8003	0	0	0	0	0
4,5	0,576	9,5924	0	0	0	0	0
5	0,678	9,4061	0	0	0	0	0
5,5	0,783	8,8324	0	0	0	0	0
6	0,913	8,4762	0	0,0075	0	0	0
6,5	1,71	8,3465	0	0,0092	0	0	0
7	1,86	8,1971	0,0045	0,0091	0	0	0
7,5	2,23	7,7637	0,0049	0,0097	0	0	0
8	2,73	7,5622	0,0069	0,0107	0	0	0
8,5	3,025	7,0793	0,0086	0,0122	0	0	0
9	3,52	7,0822	0,0101	0,0125	0	0	0
9,5	3,94	0	0	0	0	0	0
10	4,36	6,4462	0,0173	0,0179	0	0	0
10,5	5,81	6,1540	0,0447	0,0203	0	0	0
11	6,25	5,5505	0,0520	0,0190	0	0	0
11,5	6,56	4,9136	0,0956	0,0277	0	0	0
12	6,98	4,1490	0,0915	0,0257	0	0	0
12,5	7,44	3,3104	0,1169	0,0268	0	0	0
13	7,59	3,0802	0,0999	0,0318	0	0	0
13,5	8,17	1,6566	0,1125	0,0189	0	0	0
14	8,36	1,4260	0,1534	0,0281	0	0	0
14,5	8,45	1,3095	0,2075	0,0457	0	0	0

Linhagem 10 (A)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,129	10,1405	0,0309	0,0078	0	0	0
2	0,165	10,0380	0,0299	0,0125	0	0	0
3	0,214	10,1004	0,0365	0,0114	0	0	0
3,5	0,236	10,0542	0,0345	0,0158	0	0	0
4	0,262	9,7879	0,0351	0,0193	0	0	0
4,5	0,299	9,5903	0,0395	0,0222	0	0	0
5	0,334	10,0051	0,0435	0,0236	0	0	0
5,5	0,418	9,7601	0,0525	0,0299	0	0	0
6	0,5	8,8009	0,0393	0,0252	0	0	0
6,5	0,563	8,4876	0,0498	0,0347	0	0	0
7	0,646	8,3484	0,0492	0,0270	0	0	0
7,5	0,749	8,1560	0,0496	0,0328	0	0	0
8	0,863	7,5289	0,0441	0,0563	0,0062	0	0
8,5	1,41	7,4498	0,0816	0,0648	0	0	0
9	1,615	7,0883	0,1124	0,0707	0	0	0
9,5	1,86	6,8921	0,1255	0,0777	0,0056	0	0
10	2,215	6,6274	0,1139	0,0663	0	0	0
10,5	2,57	5,8324	0,1220	0,0602	0	0	0
11	3,045	5,0360	0,0916	0,0570	0	0	0
11,5	3,39	4,9859	0,1235	0,0589	0	0	0
12	3,83	4,6977	0,1752	0,0802	0	0	0
12,5	4,145	4,2227	0,1571	0,0642	0	0	0
13	4,455	3,5983	0,2057	0,1426	0	0	0
13,5	4,68	3,0571	0,0911	0,1505	0	0	0
14	6	1,7611	0,3648	0,1583	0	0	0
14,5	6,33	0,4208	0,1676	0,0859	0	0	0
15	6,34	0,3606	0,2032	0,0727	0	0	0

Linhagem 10 (B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,128	10,1286	0,0301	0,0054	0	0	0
2	0,157	10,2224	0,0271	0,0058	0	0	0
3	0,206	10,1702	0,0330	0,0121	0	0	0
3,5	0,23	10,2279	0,0382	0,0125	0	0	0
4	0,269	10,2451	0,0386	0,0154	0	0	0
4,5	0,308	10,0617	0,0376	0,0165	0	0	0
5	0,346	9,7659	0,0410	0,0185	0	0	0
5,5	0,426	9,8216	0,0332	0,0242	0	0	0
6	0,496	9,9724	0,0371	0,0249	0	0	0
6,5	0,587	9,4766	0,0473	0,0282	0	0	0
7	0,668	9,2884	0,0590	0,0261	0	0	0
7,5	0,778	8,8342	0,0569	0,0267	0	0	0
8	0,899	8,4660	0,0748	0,0522	0	0	0
8,5	1,44	7,9979	0,0920	0,0523	0	0	0
9	1,66	7,5340	0,1189	0,0663	0	0	0
9,5	2,01	7,8537	0,1410	0,0719	0	0	0
10	2,46	5,8736	0,1320	0,0622	0	0	0
10,5	2,875	5,2639	0,1110	0,0451	0	0	0
11	3,355	4,8887	0,1084	0,0537	0	0	0
11,5	3,67	3,9743	0,1348	0,0859	0	0	0
12	4,05	3,0834	0,2243	0,0865	0	0	0
12,5	4,37	2,9180	0,2296	0,0835	0	0	0
13	4,66	2,4395	0,3271	0,1213	0	0	0
13,5	4,81	2,3235	0,3152	0,1172	0	0	0
14	6,19	1,4278	0,1147	0,1353	0	0	0
14,5	6,7	0,5230	0,0136	0,0684	0	0	0
15	6,68	0,4215	0,1736	0,0789	0	0	0

Linhagem 12 (A)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,124	10,2324	0	0	0	0	0
2	0,183	9,8115	0	0	0	0	0
3	0,276	9,7241	0	0	0	0	0
3,5	0,33	9,9308	0	0	0	0	0
4	0,431	9,4335	0	0	0	0	0
4,5	0,506	9,0469	0	0	0	0	0
5	0,615	8,4434	0	0	0	0	0
5,5	0,727	8,0986	0	0	0	0	0
6	0,852	7,4271	0,0049	0	0	0	0
6,5	0,949	7,2866	0,0053	0	0	0	0
7	1,84	6,8002	0,0081	0,0091	0	0	0
7,5	1,94	6,6947	0,0052	0,0082	0	0	0
8	2,055	6,6146	0,0172	0	0	0	0
8,5	2,335	6,6136	0,0319	0,0116	0	0	0
9	2,47	5,7620	0,0513	0,0169	0	0	0
10	2,74	5,4693	0,0721	0,0222	0	0	0
10,5	2,965	5,0476	0,0591	0,0209	0	0	0
11	3,22	4,5021	0,0969	0,0177	0	0	0
11,5	3,375	3,9312	0,1241	0,0225	0	0	0
12	3,54	2,7082	0,0456	0,0142	0	0	0
12,5	3,715	1,9337	0,1559	0,0255	0	0	0
13	4,01	1,9154	0,1050	0,0175	0	0	0
13,5	5,32	1,5532	0,1393	0,0181	0	0	0
14	5,13	1,4506	0,1803	0,0247	0	0	0
14,5	5,48	1,1382	0,1149	0,0160	0	0	0

Linhagem 12 (B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,143	8,1180	0	0	0	0	0
2	0,196	9,9547	0	0	0	0	0
3	0,294	10,4172	0	0	0	0	0
3,5	0,355	10,3338	0	0	0	0	0
4	0,468	10,4577	0	0	0	0	0
4,5	0,534	10,1861	0	0	0	0	0
5	0,651	7,8331	0	0	0	0	0
5,5	0,765	8,5608	0	0	0	0	0
6	0,896	8,1690	0	0	0	0	0
6,5	0,994	6,1171	0	0	0	0	0
7	1,825	7,7136	0	0,0088	0	0	0
7,5	1,95	5,8176	0,0072	0	0	0	0
8	2,195	5,8393	0,0080	0,0088	0	0	0
8,5	2,375	5,4409	0,0252	0,0087	0	0	0
9	2,75	7,6738	0,0324	0,0156	0	0	0
10	2,845	7,6086	0,0525	0,0177	0	0	0
10,5	3,05	6,5972	0,0914	0,0201	0	0	0
11	3,27	2,4571	0,0508	0,0098	0	0	0
11,5	3,465	4,7048	0,0927	0,0233	0	0	0
12	3,7	2,6445	0,0599	0,0143	0	0	0
12,5	3,875	2,4219	0,1228	0,0174	0	0	0
13	4,24	1,5386	0,1060	0,0122	0	0	0
13,5	5,05	2,3494	0,1512	0,0201	0	0	0
14	5,06	2,0025	0,1072	0,0179	0	0	0
14,5	5,17	1,1672	0,0706	0,0105	0	0	0

Linhagem 29 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,211	9,8691	0	0	0	0	0,0485
2	0,276	9,5418	0	0	0	0	0,0685
3	0,398	9,1359	0	0	0	0	0,0675
3,5	0,473	8,8573	0	0	0	0	0,0441
4	0,588	8,5190	0	0	0	0	0,0491
4,5	0,671	8,0771	0	0,0048	0	0	0,0514
5	0,885	7,8615	0	0	0	0	0
5,5	1,355	7,8346	0	0,0080	0,0130	0	0,0731
6	1,745	7,5562	0	0,0083	0,0126	0	0,0615
6,5	2,045	6,7719	0	0,0080	0,0105	0	0,0527
7	2,435	6,6381	0	0,0109	0,0108	0	0,0716
7,5	2,94	6,5560	0	0,0108	0,0203	0	0,0704
8	3,66	6,1075	0,0257	0,0125	0,0227	0	0,0713
8,5	3,815	6,0426	0,0329	0,0144	0,0229	0	0,0754
9	4,295	5,4560	0	0	0	0	0
9,5	4,77	4,9905	0,0418	0,0152	0,0228	0	0,0666
10	4,79	4,5627	0,0634	0,0155	0,0242	0	0,0617
10,5	4,81	3,9340	0,0472	0,0156	0,0182	0	0,0547
11	5,15	3,2610	0,0989	0,0254	0,0287	0	0,0797
11,5	5,23	1,6972	0,1140	0,0299	0,0296	0	0,0822
12	5,97	0,2545	0,1458	0,0337	0,0306	0	0,0860

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,215	10,0128	0	0	0	0	0,0485
2	0,279	10,0861	0	0	0	0	0,0685
3	0,399	9,4630	0	0,0047	0	0	0,0675
3,5	0,485	9,1649	0	0,0046	0	0	0,0441
4	0,594	8,9159	0	0,0061	0	0	0,0491
4,5	0,672	8,6904	0	0,0048	0	0	0,0514
5	0,887	8,1656	0	0	0	0	0
5,5	1,365	8,0049	0	0,0076	0,0130	0	0,0731
6	1,75	7,8925	0	0,0095	0,0126	0	0,0615
6,5	2,08	7,8512	0	0,0073	0,0105	0	0,0527
7	2,505	7,4290	0	0,0140	0,0108	0	0,0716
7,5	2,99	6,9014	0	0,0112	0,0203	0	0,0704
8	3,445	6,5228	0	0,0143	0,0227	0	0,0713
8,5	3,745	6,2967	0,0260	0,0083	0,0229	0	0,0754
9	4,21	5,7401	0,0320	0,0135	0	0	0
9,5	4,34	5,4600	0,0495	0,0164	0,0228	0	0,0666
10	4,47	4,9858	0,0557	0,0191	0,0242	0	0,0617
10,5	4,92	4,1921	0,0684	0,0254	0,0182	0	0,0547
11	5,25	3,5818	0,0943	0,0266	0,0287	0	0,0797
11,5	5,63	1,9198	0,1162	0,0367	0,0296	0	0,0822
12	6,12	0,3804	0,1088	0,0345	0,0306	0	0,0860

Linhagem 37 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,17	10,2113	0	0	0	0	0
2	0,206	9,9887	0,0363	0	0	0	0
3	0,293	9,8956	0,0387	0,0050	0	0	0
3,5	0,355	9,5259	0,0354	0,0048	0	0	0
4	0,429	9,7428	0,0352	0,0077	0	0	0
4,5	0,563	9,6521	0,0416	0,0080	0	0	0
5	0,698	9,3533	0,0380	0,0093	0	0	0
5,5	0,822	9,0416	0,0385	0,0089	0	0	0
6	1,45	8,5807	0,0338	0,0113	0	0	0
6,5	1,84	8,2962	0,0373	0,0111	0	0	0
7	2,11	7,5855	0,0526	0,0114	0	0	0
7,5	2,595	6,6173	0,0432	0,0135	0	0	0
8	3,045	6,0289	0,0729	0,0156	0	0	0
8,5	3,535	5,1634	0,0522	0,0137	0	0	0
9	4,09	4,8190	0,1057	0,0172	0	0	0
9,5	4,62	4,3072	0,1290	0,0194	0	0	0
10	6,23	3,7295	0,2078	0,0327	0	0	0
10,5	6,71	3,2228	0,1634	0,0426	0	0	0
11	7,49	1,9496	0,3028	0,0507	0	0	0
11,5	8,1	0,0553	0,2321	0,0197	0	0	0
12	7,94	0,0123	0,4227	0,0507	0	0	0
12,5	8,04	0	0,1779	0,0139	0	0	0
13	8,39	0	0,2316	0,0205	0	0	0
Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,163	10,1570	0	0	0	0	0
2	0,217	10,0425	0,0341	0	0	0	0
3	0,324	9,9307	0,0314	0	0	0	0
3,5	0,383	9,8809	0,0318	0,0055	0	0	0
4	0,471	9,7683	0,0398	0,0067	0	0	0
4,5	0,595	9,6665	0,0308	0,0065	0	0	0
5	0,724	9,2663	0,0374	0,0079	0	0	0
5,5	0,853	8,8692	0,0347	0,0074	0	0	0
6	1,55	8,2006	0,0329	0,0086	0	0	0
6,5	1,93	7,3636	0,0408	0,0097	0	0	0
7	2,275	7,0619	0,0401	0,0082	0	0	0
7,5	2,75	6,5064	0,0454	0,0108	0	0	0
8	3,075	5,8997	0,0533	0,0102	0	0	0
8,5	3,525	5,4516	0,0196	0,0142	0	0	0
9	4,065	5,0088	0,1107	0,0163	0	0	0
9,5	4,63	4,3868	0,1015	0,0163	0	0	0
10	6,17	4,0356	0,1272	0,0352	0	0	0
10,5	6,76	3,0337	0,2889	0,0429	0	0	0
11	7,36	2,5066	0	0	0	0	0
11,5	7,76	1,4167	0,3267	0,0477	0	0	0
12	8,09	0,4755	0,4461	0,0537	0	0	0
12,5	8,14	0	0,3547	0,0359	0	0	0
13	7,84	0	0,2273	0,0185	0	0	0

Linhagem 39 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,132	10,7740	0	0	0	0	0
2	0,164	11,7286	0	0	0	0	0
3	0,208	9,8543	0	0	0	0	0
3,5	0,292	10,1485	0	0	0	0	0
4	0,359	11,4696	0	0	0	0	0
4,5	0,419	11,4791	0	0	0	0	0
5	0,495	11,6137	0	0	0	0	0
5,5	0,595	11,3428	0	0	0	0	0
6	0,706	11,2861	0	0	0	0	0
6,5	0,837	11,2017	0	0	0	0	0
7	0,961	11,0380	0,0238	0	0	0	0
7,5	1,74	10,8770	0,0263	0	0	0	0
8	2,095	10,6116	0,0408	0,0054	0	0	0
8,5	2,43	10,2618	0,0438	0,0075	0	0	0
9	2,81	10,0286	0,0463	0,0072	0	0	0
9,5	3,195	8,9448	0,0316	0,0088	0	0	0
10	3,67	5,3099	0,0551	0,0085	0	0	0
10,5	4,01	5,8005	0,0892	0,0188	0	0	0
11	4,41	7,1711	0,1227	0,0335	0	0	0
11,5	5,64	3,7773	0,0809	0,0246	0	0	0
12	6,28	4,4815	0,1933	0,0311	0	0	0
12,5	6,76	3,0874	0,1772	0,0349	0	0	0
13	7,2	1,5876	0,2083	0,0292	0	0	0

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,17	10,0095	0	0	0	0	0
2	0,206	10,5942	0	0	0	0	0
3	0,286	0,9000	0	0	0	0	0
3,5	0,353	12,8494	0	0	0	0	0
4	0,404	10,4751	0	0	0	0	0
4,5	0,502	10,4202	0	0	0	0	0
5	0,564	9,5246	0	0	0	0	0
5,5	0,694	10,3161	0	0	0	0	0
6	0,823	10,1942	0	0	0	0	0
6,5	0,928	10,1334	0	0	0	0	0
7	1,81	9,9989	0	0	0	0	0
7,5	2,065	9,7818	0	0	0	0	0
8	2,455	9,4912	0	0	0	0	0
8,5	2,76	9,4611	0,0340	0,0097	0	0	0
9	3,145	8,9910	0,0317	0,0060	0	0	0
9,5	3,56	4,8820	0,0417	0,0049	0	0	0
10	4,01	6,3759	0,0658	0,0131	0	0	0
10,5	4,35	4,4892	0,0675	0,0149	0	0	0
11	5,83	6,5280	0,1376	0,0268	0	0	0
11,5	6,34	3,2781	0,1260	0,0189	0	0	0
12	6,87	3,0588	0,1678	0,0193	0	0	0
12,5	7,48	1,7365	0,1757	0,0195	0	0	0
13	7,64	0,7783	0,1581	0,0186	0	0	0

Linhagem 41 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,171	10,1792	0	0,0047	0	0	0
2	0,237	10,0220	0	0,0058	0	0	0
3	0,376	9,9170	0	0,0064	0	0	0
3,5	0,449	9,7652	0	0,0063	0	0	0
4	0,568	9,6107	0	0,0068	0	0	0
4,5	0,571	9,5344	0	0,0077	0	0	0
5	0,792	9,2414	0,0627	0,0081	0	0	0
5,5	1,34	9,0558	0,0276	0,0082	0,0089	0	0
6	1,485	8,5883	0,0840	0,0113	0,0088	0	0
6,5	1,755	8,0378	0,0582	0,0135	0	0	0
7	2,05	7,3977	0,1154	0,0153	0	0	0
7,5	2,355	6,5320	0,0793	0,0193	0	0	0
8	2,74	5,6580	0,1911	0,0236	0	0	0
8,5	3,14	4,6449	0,1448	0,0297	0	0	0
9	3,415	3,5506	0,2860	0,0382	0	0	0
9,5	3,795	2,0624	0,0342	0,0484	0	0	0
10	4,22	0,3506	0,0150	0,0562	0	0	0
10,5	4,82	0,0390	0,3973	0,0509	0	0	0
11	4,35	0	0,3382	0,0391	0	0	0
11,5	4,37	0,0108	0,4012	0,0120	0	0	0
12	4,255	0,0045	0,1413	0	0	0	0

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,144	10,0000	0	0,0043	0	0	0
2	0,194	9,9218	0	0,0049	0	0	0
3	0,323	9,7652	0	0,0061	0	0	0
3,5	0,392	9,7037	0	0,0057	0	0	0
4	0,499	9,5728	0	0,0062	0	0	0
4,5	0,665	9,4247	0	0,0065	0	0	0
5	0,705	9,2382	0,0356	0,0071	0,0503	0	0
5,5	1,15	9,0073	0,0391	0,0099	0,0084	0	0
6	1,46	8,6648	0,0569	0,0110	0,0083	0	0
6,5	1,545	8,1261	0,0691	0,0109	0	0	0
7	1,85	7,6753	0,0661	0,0139	0	0	0
7,5	2,195	6,9512	0,0762	0,0180	0	0	0
8	2,485	6,1691	0,1513	0,0207	0	0	0
8,5	2,87	5,1791	0,1824	0,0262	0	0	0
9	3,185	4,1783	0,2469	0,0333	0	0	0
9,5	3,625	2,8056	0,1639	0,0412	0	0	0
10	3,98	1,1178	0,3678	0,0473	0	0	0
10,5	4,165	0,0866	0,3139	0,0532	0	0	0
11	4,39	0,0170	0,2657	0,0475	0	0	0
11,5	4,345	0	0,2171	0,0242	0	0	0
12	4,27	0	0,2199	0,0072	0	0	0

Linhagem 42 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (G/L)	LAC (G/L)
1	0,129	10,2308	0	0	0	0	0
2	0,175	10,0076	0	0	0	0	0
3	0,264	9,9115	0	0	0	0	0
3,5	0,312	9,8274	0	0	0	0	0
4	0,381	9,5164	0	0	0	0	0
4,5	0,459	9,4184	0	0	0	0	0
5	0,536	9,1156	0	0	0	0	0
5,5	0,632	8,8526	0	0	0	0	0
6	0,749	8,9851	0	0	0	0	0
6,5	0,846	8,4185	0	0	0	0	0
7	0,982	8,2754	0	0	0	0	0
7,5	1,935	8,0269	0	0	0	0	0
8	2,05	7,9686	0	0	0	0	0
8,5	2,505	7,8804	0	0	0	0	0
9	2,74	7,4271	0	0	0	0	0
9,5	3,2	7,0018	0,0307	0	0	0	0
10	3,5	6,9902	0,0416	0	0	0	0
10,5	3,7	6,5927	0,0446	0,0069	0	0	0
11	4,17	6,1448	0,0539	0,0078	0,0074	0	0
11,5	5,12	5,8185	0,0523	0	0	0	0
12	5,67	4,8031	0,0778	0,0115	0,0088	0	0
12,5	6,34	3,4240	0,0711	0,0133	0	0	0
13	6,38	2,4667	0,0359	0,0081	0	0	0
13,5	6,86	0,2091	0,0915	0,0122	0	0	0

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,133	10,6152	0	0	0	0	0
2	0,186	10,3721	0	0	0	0	0
3	0,26	10,2266	0	0	0	0	0
3,5	0,32	10,0190	0	0	0	0	0
4	0,377	9,9770	0	0	0	0	0
4,5	0,453	9,5698	0	0	0	0	0
5	0,535	9,3558	0	0	0	0	0
5,5	0,667	9,0240	0	0	0	0	0
6	0,79	8,7528	0	0	0	0	0
6,5	0,886	8,7507	0	0	0	0	0
7	0,998	8,7231	0	0	0	0	0
7,5	1,895	8,6036	0	0	0	0	0
8	2,015	8,4305	0	0	0	0	0
8,5	2,535	8,1842	0	0	0	0	0
9	2,825	7,8458	0	0	0	0	0
9,5	3,315	7,4833	0,0316	0	0	0	0
10	3,57	7,0993	0,0248	0	0	0	0
10,5	3,89	6,9199	0,0391	0,0078	0,0087	0	0
11	4,325	6,4637	0,0390	0,0084	0	0	0
11,5	5,62	5,9896	0,0578	0,0098	0,0074	0	0
12	5,73	5,0262	0,0793	0,0125	0,0081	0	0
12,5	6,67	3,6442	0,0531	0,0158	0	0	0
13	6,79	2,6173	0,1229	0,0150	0,0084	0	0
13,5	7,09	0,2608	0,0799	0,0137	0	0	0

Linhagem 43 (A)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,205	9,6524	0,0317	0,0104	0	0	0
2	0,395	9,2937	0,0262	0,0094	0	0	0
3	0,259	9,2484	0,0256	0,0079	0	0	0
3,5	0,318	9,0320	0,0078	0,0103	0	0	0
4	0,367	8,9558	0,0287	0,0113	0	0	0
4,5	0,431	8,8826	0,0347	0,0093	0	0	0
5	0,51	8,5104	0,0311	0,0156	0	0	0
5,5	0,605	8,3443	0,0378	0,0181	0	0	0
6	0,682	8,1770	0	0	0	0	0
6,5	0,806	7,9982	0	0	0	0	0
7	0,902	7,3567	0,0446	0,0196	0	0	0
7,5	1,455	7,0234	0,0392	0,0171	0	0	0
8	1,705	6,8685	0,0990	0,0237	0	0	0
8,5	1,865	6,3730	0	0	0	0	0
9	2	6,1755	0,0644	0,0273	0	0	0
9,5	2,98	5,8348	0	0	0	0	0
10	3,345	5,5985	0,1101	0,0527	0	0	0
10,5	3,61	5,2569	0,0861	0,0390	0	0	0
11	4,09	4,2993	0,0769	0,0324	0	0	0
11,5	4,405	3,8268	0,0939	0,0880	0	0	0
12	6,54	3,3123	0,1889	0,0859	0	0	0
12,5	6,86	2,8184	0,0981	0,0141	0	0	0
13	7,5	2,1899	0,0689	0,0814	0	0	0
13,5	8,09	1,7139	0,0788	0,0584	0	0	0
14	8,65	1,0917	0,1096	0,0417	0	0	0
14,5	8,87	0,4851	0,0869	0,0692	0	0	0
15	8,85	0,3501	0,1035	0,0320	0	0	0
15,5	8,86	0,2666	0,0917	0,0309	0	0	0

Linhagem 43 (B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,195	9,7694	0	0	0	0	0
2	0,375	9,7068	0	0	0	0	0
3	0,254	9,4452	0,0047	0,0062	0	0	0
3,5	0,309	9,1147	0,0389	0,0103	0	0	0
4	0,352	8,6879	0,0335	0,0104	0	0	0
4,5	0,422	8,5842	0,0294	0,0110	0	0	0
5	0,526	8,3261	0,0310	0,0145	0	0	0
5,5	0,589	8,0257	0	0	0	0	0
6	0,673	7,8852	0,0454	0,0181	0	0	0
6,5	0,778	7,5348	0,0355	0,0145	0	0	0
7	0,887	7,1266	0	0	0	0	0
7,5	1,355	6,7990	0,0519	0,0229	0	0	0
8	1,68	6,6058	0,0820	0,0240	0	0	0
8,5	1,76	6,0590	0,0586	0,0286	0	0	0
9	1,915	5,7964	0,0759	0,0369	0	0	0
9,5	2,5	5,5909	0,0604	0,0484	0	0	0
10	3,18	5,1615	0,1051	0,0550	0	0	0
10,5	3,41	4,6607	0,0982	0,0590	0	0	0
11	3,89	3,8551	0,1342	0,0682	0	0	0
11,5	4,38	3,3439	0,1560	0,0807	0	0	0
12	6,63	3,0396	0,2113	0,1047	0	0	0
12,5	6,87	2,8581	0,1264	0,0605	0	0	0
13	7,05	2,3343	0,0782	0,0588	0	0	0
13,5	7,95	1,6748	0,0928	0,0567	0	0	0
14	8,78	1,3467	0,1749	0,0642	0	0	0
14,5	8,76	0,4772	0,0522	0,0179	0	0	0
15	8,74	0,1392	0,0764	0,0356	0	0	0
15,5	8,76	0,0068	0,0989	0,0679	0	0	0

Linhagem 44 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,259	10,0552	0	0,0065	0	0	0
2	0,378	10,0410	0	0,0103	0	0	0
3	0,487	10,0293	0,0354	0,0138	0	0	0
3,5	0,503	9,6856	0,0277	0,0180	0	0	0
4	0,715	9,9188	0,0409	0,0159	0	0	0
4,5	0,816	9,6856	0,0259	0,0214	0	0	0
5	0,962	9,6559	0,0474	0,0249	0	0	0
5,5	1,36	9,6343	0,0475	0,0227	0	0	0
6	1,555	9,4129	0,0577	0,0253	0	0	0
6,5	2,015	9,1075	0,0396	0,0296	0	0	0
7	2,335	8,8256	0,0469	0,0343	0	0	0
7,5	2,835	7,5541	0,0802	0,0358	0	0	0
8	3,415	7,8592	0,0445	0,0452	0	0	0
8,5	3,79	7,0486	0,0599	0,0500	0	0	0
9	4,33	6,2183	0,1248	0,0542	0	0	0
9,5	3,63	5,9378	0,0700	0,0679	0	0	0
10	4,1	4,8710	0,0811	0,0655	0	0	0
10,5	4,18	4,5699	0,1423	0,0909	0	0	0
11	4,08	3,4509	0,3872	0	0	0	0
11,5	4,48	2,8021	0,1794	0,0959	0	0	0
12	5,52	1,9921	0,3256	0,1124	0	0	0
12,5	6,33	0,7444	0,1503	0,0619	0	0	0
13	6,49	0,3966	0,1740	0,0873	0	0	0
13,5	6,701	0	0,2172	0,0554	0	0	0

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,227	10,1952	0	0,0055	0	0	0
2	0,316	9,8881	0,0311	0,0094	0	0	0
3	0,466	9,7839	0,0371	0,0133	0	0	0
3,5	0,539	9,6778	0	0,0000	0	0	0
4	0,647	9,9581	0,0286	0,0151	0	0	0
4,5	0,778	9,6941	0,0424	0	0	0	0
5	0,892	9,6069	0,0333	0,0166	0	0	0
5,5	1,26	9,0337	0,0347	0,0188	0	0	0
6	1,48	8,6731	0,0497	0,0239	0	0	0
6,5	1,81	8,1798	0,0417	0,0273	0	0	0
7	2,18	8,1626	0,0523	0,0313	0	0	0
7,5	2,73	7,9871	0,0588	0,0398	0	0	0
8	3,055	7,1916	0,0607	0,0419	0	0	0
8,5	3,605	6,6776	0,0696	0,0478	0	0	0
9	4,285	6,0348	0,0502	0,0540	0	0	0
9,5	3,64	5,1191	0	0	0	0	0
10	4,08	4,9012	0,1912	0,0750	0	0	0
10,5	4,39	4,1678	0,1238	0,0868	0	0	0
11	4,44	2,7730	0,3100	0	0	0	0
11,5	4,25	1,6153	0,1459	0,0670	0	0	0
12	5,34	1,2892	0,3118	0,1067	0	0	0
12,5	5,7	0,0165	0,0000	0,0000	0	0	0
13	6,9	0,0811	0,2171	0,0626	0	0	0
13,5	6,84	0,0583	0,1908	0,0512	0	0	0

Linhagem BB1 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,228	10,0220	0,3371	0,0049	0	0	0
2	0,331	10,5348	0,3376	0,0065	0	0	0
3	0,514	10,0700	0,3067	0	0	0	0
3,5	0,636	10,2474	0,3112	0,0067	0	0	0
4	0,852	10,0008	0,3149	0	0	0	0
4,5	1,28	10,0187	0,3142	0,0075	0	0	0
5	1,53	9,1207	0,3129	0,0088	0	0	0
5,5	2,055	9,4051	0,2974	0,0129	0	0	0
6	2,855	8,8040	0,2859	0,0193	0	0	0
6,5	3,06	7,8599	0,2213	0,0340	0	0	0
7	3,78	6,6723	0,2544	0,0518	0	0	0
7,5	4,3	4,9884	0,1145	0,0754	0	0	0
8	3,98	2,9557	0,0843	0,1061	0	0	0
8,5	5,19	0,8719	0,1677	0,1225	0	0,0069	0
9	5,56	0	0,1644	0,1337	0	0,0133	0
9,5	5,19	0	0,2388	0,1271	0	0	0
10	4,46	0	0,2172	0,1027	0	0	0
10,5	5,47	0	0,1885	0,0963	0	0	0

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,209	10,2552	0,3376	0,0060	0	0	0
2	0,312	10,0402	0,3233	0	0	0	0
3	0,506	10,4318	0	0,0064	0	0	0
3,5	0,657	9,9801	0,3106	0,0064	0	0	0
4	0,853	9,8500	0,3183	0,0072	0	0	0
4,5	1,27	9,7942	0,4105	0,0549	0	0	0
5	1,565	9,3908	0,3098	0,0100	0	0	0
5,5	2,22	9,1901	0,3036	0,0163	0	0	0
6	2,55	8,5163	0,2563	0,2918	0	0	0
6,5	2,96	7,5776	0,2042	0,0426	0	0	0
7	3,41	6,3681	0,2107	0,0658	0	0	0
7,5	4,15	4,7745	0,1215	0,0917	0	0	0
8	4,28	2,9225	0,0635	0,0128	0	0	0
8,5	3,85	1,0104	0,1624	0,1645	0	0,012	0
9	4,53	0	0,2342	0,1797	0	0,014	0
9,5	4,41	0	0,2398	0,1724	0	0,008	0
10	4,12	0	0,0399	0,1288	0	0	0
10,5	4,31	0	0,1396	0,1400	0	0	0

Linhagem BB2 (A e B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,193	9,9030	0	0,0086	0	0	0
2	0,284	9,6049	0,0425	0,0030	0	0	0
3	0,429	9,5499	0,0308	0,0133	0,0120	0	0
3,5	0,581	9,2154	0,0365	0,0145	0,0149	0	0
4	0,756	9,3386	0,0448	0,0188	0,0227	0	0
4,5	0,936	9,1723	0	0	0	0	0
5	1,775	8,7627	0	0,0110	0,0149	0	0,0189
5,5	2,09	8,6588	0,0275	0,0144	0,0187	0	0,0179
6	2,55	8,2637	0,0289	0,0224	0,0200	0	0,0176
6,5	3,215	7,5762	0,0466	0,0335	0,0245	0	0,0180
7	3,75	6,6766	0,0135	0,0527	0,0204	0	0,0180
7,5	5,48	5,5359	0,1666	0,0826	0,0261	0	0,0183
8	6,13	4,1856	0,1798	0,1138	0,0246	0	0,0185
8,5	7,28	2,1062	0,3276	0,1601	0,0290	0	0,0174
9	7,73	0,2536	0,3883	0,1900	0,0281	0	0,0169
9,5	8,12	0	0,2885	0,1845	0,0185	0	0,0163
10	8,88	0,0042	0,3895	0,1738	0,0179	0	0,0173
10,5	8,38	0	0,3012	0,1353	0,0092	0	0,0146
11	8,52	0	0,1826	0,0504	0	0	0,0064
11,5	9,7	0,0049	0,3721	0,1212	0,0065	0	0,0140
12	9,58	0,0044	0,2760	0,0955	0	0	0,0123

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,187	10,1798	0	0,0090	0	0	0
2	0,293	9,7571	0,0382	0,0096	0	0	0
3	0,436	9,5512	0,0354	0,0118	0,0103	0	0
3,5	0,579	9,3462	0,0382	0,0127	0,0138	0	0
4	0,738	9,4635	0,0410	0,0151	0,0208	0	0
4,5	0,921	9,2133	0	0,0088	0,0113	0	0,0179
5	1,78	8,8985	0	0,0107	0,0135	0	0,0183
5,5	2,125	8,9291	0	0,0131	0,0157	0	0,0182
6	2,54	8,5105	0,0291	0,0178	0,0215	0	0,0181
6,5	3,135	7,8565	0,0380	0,0314	0,0238	0	0,0186
7	3,835	6,8195	0,0975	0,0499	0,0261	0	0,0183
7,5	5,51	5,7368	0,1633	0,0760	0,0254	0	0,0181
8	6,18	3,8176	0,2117	0,1153	0,0227	0	0,0173
8,5	7,07	2,6029	0,3040	0,1647	0,0312	0	0,0185
9	8,13	0,4487	0,3983	0,1945	0,0306	0	0,0156
9,5	8,21	0	0,2480	0,1529	0,0252	0	0,0125
10	8,58	0	0,2389	0,1257	0,0157	0	0,0107
10,5	8,48	0,0049	0,3512	0,1460	0,0136	0	0,0141
11	9,5	0	0,3145	0,1471	0,0113	0	0,0151
11,5	8,5	0	0,2546	0,1277	0	0	0,0139
12	9,58	0,0061	0,3964	0,1080	0	0	0,0174

Linhagem BB9 (A)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,203	9,6678	0,0398	0,0195	0	0	0
2	0,23	9,3931	0,0402	0,0309	0	0	0
3	0,252	9,3084	0,0505	0,0352	0	0	0
3,5	0,257	9,1950	0,0590	0,0376	0	0	0
4	0,283	9,1217	0,0538	0,0375	0	0	0
4,5	0,291	8,9894	0,0590	0,0451	0	0	0
5	0,327	8,8343	0,0218	0,0336	0	0	0
5,5	0,343	8,9028	0,0498	0,0463	0	0	0
6	0,368	8,7583	0,0512	0,0577	0	0	0
6,5	0,411	8,6060	0,0642	0,0665	0	0	0,0065
7	0,467	8,4478	0,0855	0,0719	0	0	0,0068
7,5	0,486	8,3953	0,0937	0,0806	0	0	0,0072
8	0,52	8,1312	0,0747	0,0867	0	0	0,0081
8,5	0,57	7,7943	0,0749	0,0732	0	0	0,0069
9	0,624	7,5947	0,0889	0,0582	0	0	0,0058
9,5	0,708	7,3338	0,0764	0,0633	0	0	0,0061
10	0,821	7,2544	0,1478	0,1369	0	0	0,0134
10,5	0,837	6,8689	0,1571	0,1512	0,0099	0	0,0137
11	1,425	6,5907	0,0770	0,0598	0	0	0
11,5	1,59	6,0891	0,1503	0,1847	0,0107	0	0,0185
12	1,68	5,6297	0,0935	0,1122	0	0	0,0114
12,5	1,78	5,1520	0,2123	0,2270	0,0146	0	0,0223
13	2,105	4,6587	0,1740	0,2455	0,0146	0	0,0240
13,5	2,305	4,0710	0,1813	0,2846	0,0164	0	0,0271
14	2,375	3,3580	0,3229	0,3040	0,8376	0	0,0294
14,5	2,665	2,6870	0,2996	0,3353	0,0179	0	0,0326
15	2,98	1,8338	0,3832	0,3527	0,0182	0	0,0354
15,5	2,99	1,0105	0,4051	0,3691	0,0178	0	0,0375
16	3,425	0,1749	0,3565	0,3112	0,0148	0	0,0347
16,5	3,3	0	0,4289	0,3953	0,0188	0	0,0400
17	3,515	0,0061	0,4773	0,3948	0,0208	0	0,0408
17,5	3,45	0,0060	0,3903	0,3977	0,0189	0	0,0405

Linhagem BB9 (B)

Tempo (h)	DO	GLC (g/L)	ETH (g/L)	GLI (g/L)	ACET (g/L)	SUC (g/L)	LAC (g/L)
1	0,209	9,8564	0,0326	0,0199	0	0	0
2	0,234	9,8085	0,0375	0,0247	0	0	0
3	0,25	9,2780	0,0445	0,0297	0	0	0
3,5	0,26	9,8964	0,0373	0,0333	0	0	0
4	0,282	9,5883	0,0367	0,0360	0	0	0
4,5	0,299	9,4867	0,0461	0,0409	0	0	0
5	0,317	9,3310	0	0	0	0	0
5,5	0,351	9,1754	0,0691	0,0493	0	0	0
6	0,365	9,2231	0,0556	0,0548	0	0	0
6,5	0,406	9,0532	0,0549	0,0622	0	0	0,0059
7	0,44	8,9014	0,0897	0,0697	0	0	0,0071
7,5	0,485	8,6646	0	0	0	0	0
8	0,522	8,4705	0,0683	0,0859	0	0	0,0080
8,5	0,581	8,4681	0,0904	0,0981	0	0	0,0093
9	0,635	7,9920	0,0883	0,1074	0	0	0,0103
9,5	0,732	7,7650	0,0631	0,0733	0	0	0,0080
10	0,773	7,4172	0,1438	0,1348	0,0082	0	0,0127
10,5	0,838	7,2374	0,1302	0,1213	0	0	0,0119
11	1,475	6,7709	0,1305	0,1707	0,0090	0	0,0167
11,5	1,645	6,1067	0,0868	0,0863	0	0	0,0088
12	1,79	5,7005	0,2193	0,2088	0,0120	0	0,0213
12,5	1,885	5,4150	0,2434	0,2828	0,0165	0	0,0555
13	2,07	4,7098	0,1923	0,2459	0,0124	0	0,0247
13,5	2,29	4,1143	0,3062	0,2811	0,0156	0	0,0280
14	2,445	3,4242	0,3185	0,3107	0,0169	0	0,0305
14,5	2,685	2,7364	0,2159	0,3394	0,0166	0	0,0343
15	3,03	1,7420	0,3664	0,0167	0,0181	0	0,0071
15,5	3,205	0,9665	0,4482	0,3787	0,0182	0	0,0399
16	3,46	0,1763	0,4845	0,4152	0,0190	0	0,0438
16,5	3,52	0,0067	0,4891	0,4018	0,0191	0	0,0419
17	3,45	0,0057	0,4575	0,3753	0,0189	0	0,0392
17,5	3,36	0,0062	0,4936	0,4026	0,0198	0	0,0422