



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE ENGENHARIA
ENGENHARIA DE ALIMENTOS



JANAINA MAYUMI HONMA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE *Saccharomyces cerevisiae*
CAT-1 E DE 4 LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE EM
DIFERENTES SUBSTRATOS COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO EM
ANAEROBIOSE**

DOURADOS-MS, 10 de Março de 2017

Janaina Mayumi Honma

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE *Saccharomyces cerevisiae*
CAT-1 E DE 4 LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE EM
DIFERENTES SUBSTRATOS COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO EM
ANAEROBIOSE

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à Universidade Federal da
Grande Dourados como parte dos
requisitos necessários para a obtenção do
Grau de Bacharel em Engenharia de
Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano
Fonseca

Co-orientadora: MSc. Cinthia Aparecida
de Andrade Silva

DOURADOS-MS, 10 de Março de 2017

Dedico este trabalho a todos que fizeram
parte da minha formação acadêmica,
apoiando e incentivando minhas decisões.
Em especial, a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a conclusão desse ciclo, em especial:

A minha família, por não medirem esforços sempre me inspirando e fazendo acreditar que tudo é possível. Pai, obrigado por toda sua dedicação e exemplo de força de vontade. Mãe, obrigado pelo carinho e por me ensinar a lutar pelos meus objetivos. Nê, você é um anjinho, obrigada por me animar e surpreender sempre.

Ao meu namorado, que me acompanhou ao longo dessa fase, sempre motivando e acreditando em meu potencial.

A esta universidade e seu corpo docente, que além da formação profissional contribuíram para uma formação cidadã.

Ao meu orientador Professor Gustavo Graciano Fonseca, pelo conhecimento transmitido durante os anos de orientação e por sempre se prontificar a fornecer todo suporte quando necessário, e a minha co-orientadora Cinthia A. A. Silva, por instruir de maneira essencial conduzindo nossos trabalhos ao sucesso. Ambos foram essenciais na minha formação, obrigado pela confiança e atenção.

Aos integrantes do grupo de pesquisa de Bioengenharia, pela rotina intensa e agradável que vivenciamos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

AValiação DOS PARâMETROS CINÉTICOS DE *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 E DE 4 LEVEDURAS ISOLADAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE EM DIFERENTES SUBSTRATOS COMO FONTE ÚNICA DE CARBONO EM ANAEROBIOSE

RESUMO. Objetivou-se com este trabalho comparar a fisiologia da levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 com 4 linhagens de leveduras isoladas da Região Centro-Oeste quanto aos parâmetros cinéticos e formação de metabólitos obtidos em cultivos com diferentes açúcares como fonte única de carbono em condições de anaerobiose. As linhagens foram cultivadas em meio mineral estéril, pH 6,0 e fonte de carbono (10 g L^{-1}), incubados a 30°C , com injeção contínua de gás nitrogênio (N_2). Os frascos de cultivos foram conectados com um segundo frasco com hidróxido de sódio ($\text{NaOH } 2\text{M}$), que foi utilizado para análises de dióxido carbônico (CO_2). Açúcares, etanol, glicerol e acetato foram separados por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC). Os parâmetros cinéticos avaliados foram velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), tempo de duplicação (TD), fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), fator de conversão de substrato a produtos ($Y_{P/S}$) (etanol, glicerol e acetato) e concentração celular máxima (X_{max}), além de dados de produtividade de etanol (P_{Eth}), de biomassa (P_X) e concentração de CO_2 . Como resultados, *Candida parapsilosis* Reol 37 foi a única linhagem isolada que não se desenvolveu eficientemente (o maior μ_{max} obtido foi $0,09 \text{ h}^{-1}$) nos substratos estudados. *C. glabrata* Reol 43 destacou-se dos demais isolados em cultivos utilizando glicose e frutose ($P_{\text{Eth}} = 0,57$ e $0,54 \text{ gEth.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente), mostrando boa adaptação a estes substratos. Entretanto, nos cultivos com sacarose não foi capaz de se desenvolver. Nessa condição apenas *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e BB9 conseguiram se adaptar.

Palavras-chave: Fisiologia; Leveduras, Mosto, Fermentação

ABSTRACT. The objective of the work was to compare the physiology of the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 with 4 strains of yeasts isolated from the Midwest region as the kinetic parameters and formation of metabolites obtained in cultivation with different sugars as sole carbon under anaerobic conditions. The strains were grown in sterile mineral medium, pH 6.0 and carbon source (10 g L^{-1}), incubated at 30°C with continuous injection of nitrogen gas (N_2). The cultivation flasks were connected with a second flask with sodium hydroxide (2M NaOH), which was used for carbon dioxide (CO_2) analysis. Sugars, ethanol, glycerol and acetate were separated by ultra performance liquid chromatography (UPLC). The kinetic parameters measured were substrate is specific consumption rate (μ_s), maximum specific growth rate (μ_{max}), doubling time (DT), cell substrate conversion factor ($Y_{X/S}$), substrate conversion products rate ($Y_{P/S}$) (ethanol, glycerol and acetate) and maximum concentration of cells formed (X_{max}), in addition to ethanol productivity (P_{Eth}), biomass productivity (P_X) and CO_2 concentration. As results, *Candida parapsilosis* Reol 37 was the only isolated strain that did not efficiently grow (the higher μ_{max} obtained was 0.09 h^{-1}) on the substrates studied. *C. glabrata* Reol 43 was distinguished from other isolates in glucose and fructose cultivations ($P_{\text{Eth}} = 0.57$ e $0.54 \text{ gEth.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectively), showing good adaptation to these substrates. However, in sucrose cultivation it was not able to develop. In this condition only the *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and BB9 were able to adapt.

Keywords: Physiology, Yeasts; Must; Fermentation

INTRODUÇÃO

O atual processo fermentativo de usinas sucroalcooleiras ainda necessita de otimizações que possam aumentar a produtividade e diminuir os custos nas aplicações industriais. Isso torna-se possível analisando o potencial fermentativo, que se baseia na determinação de fatores de produção específica entre a cepa testada e aqueles obtidos por uma cepa padrão. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente empregada em processos de fermentação alcoólica nas usinas de açúcar e álcool por converter a cana-de-açúcar eficientemente e pela sua adequação ao processo. 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 estes microrganismos (Banat et al. 1996; Okpokwasili e Nweke 2005; Basso et al. 2011). Além disso, é importante entender sobre a diversidade do metabolismo do açúcar (monossacarídeos, dissacarídeos), pois cada espécie de levedura pode usar rotas metabólicas diferentes inferindo na sua síntese pela levedura, e conseqüentemente, sua conversão a produtos.

Visser et al. (1990) agrupam as leveduras em três grupos no que diz respeito a capacidade fermentativa (fermentativas obrigatórias, fermentativas facultativas e não fermentativas), no qual, as fermentativas são capazes de crescer em anaerobiose. Van Dijken et al. (1993) fazem a classificação fisiológica das leveduras com base na ocorrência de fermentação alcoólica em fermentativa obrigatória (e.g. *Candida slooffi*), fermentativa facultativa (Crabtree-positiva: *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*; Crabtree-negativa: *Candida utilis* e *Kluyveromyces marxianus*) e não fermentativa (por exemplo, espécies de *Rhodotorula*). Acrescentam que a diversidade entre as leveduras fermentativas facultativas no que se refere à regulação da fermentação alcoólica é evidente a partir de fenômenos indicados por termos como “efeito Pasteur”, “efeito Crabtree”, “efeito Kluyver” e “efeito Custers”. Todos esses “efeitos” representam mecanismos reguladores que afetam o equilíbrio entre fermentação e respiração.

Várias cepas selvagens têm sido isoladas a partir de biorreatores industriais com o objetivo de reintroduzi-las no processo industrial (Basso et al. 2011). Cepas selvagens podem apresentar melhor desempenho no processo em termos de rendimento de substrato à etanol, robustez e compatibilidade geral com o processo industrial em comparação com linhagens de leveduras que têm sido tradicionalmente utilizada no setor industrial (Della-Bianca et al. 2013). Além disso, essas linhagens isoladas podem apresentar potencial para outras aplicações biotecnológicas, que não seja apenas a indústria de etanol.

A busca por novas linhagens potenciais é emergente. Assim, muitos destes novos isolados necessitam de estudos fisiológicos mais aprofundados. *Pichia kudriavzevii* é descrita como levedura termotolerante e capaz de produzir etanol a partir de resíduos de fruta, esta linhagem é um sinônimo de *Issatchenkia orientalis* (Kurtzman et al. 2008), então a espécie atribuída ao gênero *Issatchenkia* foi agrupada dentro de *Pichia* como entidade taxonomicamente válida (Sandhu et al. 2012). O gênero *Candida* compreende um grupo extremamente heterogêneo de organismos, normalmente as colônias de *Candida* são de cor creme a amarelo. A linhagem *Candida glabrata* foi descrita na literatura pela fermentação de glicose e trealose (Silva et al. 2012), além disso, é também relatada como levedura termotolerante e com uma relação evolutiva próxima a *S. cerevisiae* (Wang et al., 2013). *Candida parapsilosis* foi classificada primeiramente como espécies de *Monilia*, por ser incapaz de fermentar maltose (Odds 1988; Silva et al. 2012).

O oxigênio molecular é necessário em várias vias biosintéticas, *e.g.*, a biossíntese de esteróis. Segundo Parks e Casey (1995), as leveduras possuem esterol como componente da membrana plasmática, o mesmo tem finalidade de manter a estrutura da membrana, permeabilidade, fornecer rigidez, estabilidade e resistência ao estresse físico. Em condições de aerobiose a síntese de ergosterol é feita a partir de moléculas de oxigênio, entretanto, em anaerobiose as células não são capazes de sintetizar o ergosterol, havendo necessidade de ser adicionado nos cultivos. Além disso, em condições anaeróbicas o oleato é adicionado nos meios de crescimento na forma de Tween 80, pois nessas condições as leveduras não são capazes de sintetizar esteróis e ácidos graxos insaturados (Snoek e Steensma 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a fisiologia de 4 linhagens de leveduras isoladas da região Centro-Oeste com a linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, em termos de parâmetros cinéticos relativos ao crescimento, consumo de substrato e formação de metabólitos, utilizando diferentes fontes únicas de carbono (glicose, frutose e sacarose) em condições de anaerobiose.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e Manutenção

As linhagens de leveduras utilizadas para o estudo foram a linhagem de levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, cedida pela Usina São Fernando, Dourados – MS e 4 leveduras

isoladas da Região Centro-Oeste, das quais 2 leveduras isoladas de usina de açúcar e álcool do município de Barra do Bugres - MT, sendo os isolados BB1 e BB9 (Silva et al. 2011) e 2 leveduras isoladas do fruto pequi (*Caryocar brasiliensis*) denominadas Recol 37 e Recol 43 (Stefanello, 2010). Os isolados BB1, BB9, Recol 37 e Recol 43 foram identificadas como *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*, respectivamente (Silva, 2016). Alíquotas-estoque de 1 mL das leveduras utilizadas foram obtidas de culturas-estoque mantidas em glicerol 20% (p/v) a -80°C (Fonseca et al. 2013).

Biorreator para cultivos

Frascos de 250 mL foram utilizados como biorreatores, os quais possuíam tampas com duas conexões de aço inoxidável, sendo que em uma foi acoplada agulha para a injeção de gás nitrogênio (N₂) e retirada da amostra por meio de uma seringa estéril. A segunda conexão foi utilizada para interligar, por meio de mangueira de silicone estéril, o frasco do cultivo com um segundo frasco de 250 mL, este continha 200 mL hidróxido de sódio (NaOH 2M) que foi utilizado para posteriores análises de gás carbônico (CO₂) (Peixoto et al. 2012).

Condições de Cultivo

Para o preparo dos cultivos, uma alíquota-estoque foi transferida para 100 mL de meio YPD líquido (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%), e crescidos por 24 h a 30°C, posteriormente foi inoculada em placa contendo aproximadamente 20 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e ágar 2%) estéril, por 48 horas a 30°C. Os pré-cultivos foram realizados transferindo uma amostra da linhagem para um frasco tipo Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio mineral estéril (Verduyn et al. 1992) e 50 mL do substrato na concentração 10 g L⁻¹, com pH ajustado para 6,0. Em seguida os pré-cultivos foram incubados em agitador orbital (Marconi, Brasil) a 30°C e 200 rpm, em aerobiose. Uma alíquota do pré-cultivo foi transferida para os cultivos principais, de modo que a partir de uma alíquota de quantidade determinada do pré-cultivo para densidade óptica (DO) inicial (λ_{600nm}) de 1,0, os cultivos principais foram realizados a 30°C em estufa incubadora (Marconi, Brasil) em condições de anaerobiose, em meios idênticos ao do pré-cultivo e sem agitação. As condições de anaerobiose foram mantidas com a injeção de gás nitrogênio (N₂) ultrapuro 5.0 (99,999% de pureza) a 2 mL min⁻¹ ao longo de todo o cultivo (adaptado de Abbott et al. 2007). Para o crescimento anaeróbico (cultivo principal)

fez-se necessário o acréscimo de 10 mg L^{-1} ergosterol e 420 mg L^{-1} de Tween 80 dissolvidos ao meio, preparados asépticamente (Verduyn et al. 1990, 1992).

Os cultivos foram realizados em duplicata até o consumo total de açúcar ou até que atingissem 36 h de cultivo. As amostras foram recolhidas em intervalos de 0,5, 1 ou 1,5 h, dependendo do tempo de cultivo, e utilizadas para determinação de massa seca e concentração de metabólitos extracelulares.

Concentração de Metabólitos Extracelulares e Determinações de Biomassa

As amostras coletadas foram centrifugadas em micro centrífuga refrigerada (NT805, Brasil) (5 minutos, 17609 g , 5°C). O sobrenadante foi utilizado para determinar etanol, glicerol, acetato e açúcar residual por meio da cromatografia líquida de alta performance (UPLC) Agilent 1290, equipado com coluna Rezex ROA – Organic Acid H^+ (8%) (Phenomenex). A fase móvel utilizada foi ácido trifluoroacético (TFA) a $0,005 \text{ M}$, a uma vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, com temperatura de 55°C e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. Estes compostos foram detectados por um detector refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados (Nascimento et al. 2016).

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

Determinação de parâmetros cinéticos

A fase exponencial de crescimento foi identificada como a região linear da curva de cinética de crescimento pelo tempo. A velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}) foi determinada como a inclinação desta reta e o tempo de duplicação (TD) pelo quociente do $\ln(2)$ pelo μ_{max} . Avaliou-se a formação máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), obtida por curva de calibração.

O fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi determinado como a inclinação da reta obtida pela plotagem da concentração celular (X) em função da concentração de substrato (S). O fator de conversão de substrato a produtos (etanol, glicerol ou acetato) ($Y_{\text{Eth}/S}$, $Y_{\text{gli}/S}$, $Y_{\text{ac}/S}$) foi

determinado a partir da concentração do produto em relação à concentração do substrato. A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\mu_S = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y_{X/S}} \quad \text{Equação 1}$$

Produtividade de etanol (P_{Eth}) e Produtividade de biomassa (P_X) foram calculadas de acordo com as Equações 2 e 3, respectivamente (Ribeiro e Horii 1999):

$$P_{Eth} = \frac{P_f - P_i}{t} \quad \text{Equação 2}$$

$$P_X = \frac{X_f - X_i}{t} \quad \text{Equação 3}$$

No qual, P_f = produto final; P_i = produto inicial; t = tempo final; X_f = concentração celular final; X_i = concentração celular inicial.

Análise de CO₂ e balanço de carbono

A análise de CO₂ foi realizada por meio de titulação (Peixoto et al. 2012). Foram tituladas duas partes da solução de NaOH (2M), sendo uma controle, armazenada, e a outra utilizada para coleta de CO₂ no experimento. Esta última teve a quantidade de NaOH reduzida pela passagem de CO₂ (Reação 1). Assim, pela diferença entre o número de mols de OH⁻ presente na solução antes e após a coleta do gás, sua quantidade foi determinada.



Para a titulação foi adicionado à 20 mL da solução NaOH 2M, 2 gotas de fenolftaleína (1%) e titulado com solução de ácido clorídrico (HCl) 2M. A titulação ocorreu até mudança de coloração de rosa para incolor.

Balanço de carbono é apresentado em gramas por litro, levando em consideração a biomassa máxima obtida, metabólitos e CO₂ formados.

Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando a versão do software Statistica versão 6.0 (Statsoft, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cinéticos dos cultivos anaeróbios realizados em diferentes substratos utilizados como fontes de carbono com as linhagens isoladas da região Centro-Oeste e com a linhagem industrial *S. cerevisiae* CAT-1. Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas na metodologia, diferindo apenas com relação à variação da fonte de carbono (glicose, frutose e sacarose) e a linhagem de levedura.

C. parapsilosis Recol 37 foi a única linhagem isolada que não se desenvolveu em nenhum dos substratos estudados (glicose, frutose e sacarose), pois apresentou taxa nula de produtividades e sem formação de CO₂ após 36 h de cultivo. Segundo Chamilos et al. (2006), *C. parapsilosis* é uma levedura não fermentativa, apresentando uma grande resistência natural a várias drogas e agentes tóxicos, a qual atribui-se às suas duas vias alternativas de fluxo de elétrons. Aproximadamente 40% das espécies de leveduras são classificadas como não fermentativas (Barnett et al. 1983), nesse sentido, Van Dijken et al. (1993) reportaram que algumas linhagens não realizam fermentação alcoólica, possivelmente devido sua incapacidade de sintetizar enzimas chave da via fermentativa. Em relação ao substrato sacarose, ademais, as linhagens *C. glabrata* Recol 43 e *P. kudriavzevii* BB1 também não se desenvolveram, apresentando baixa μ_{max} e μ_s , conseqüentemente, cultivos longos que não diferiram significativamente entre si ($P < 0,05$). Silva et al. (2016) explica que é devido à falta de habilidade dessas cepas em fermentar certos dissacarídeos.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos dos cultivos realizado com 4 leveduras isoladas da Região Centro-Oeste e a linhagem industrial *S. cerevisiae* CAT-1, em condições de anaerobiose, utilizando diferentes substratos como fonte única de carbono.

Linhagem	S	μ_{max} (h ⁻¹)	TD (h)	μ_s (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (gMCS.gS ⁻¹)	$Y_{Eth/S}$ (gEth.gS ⁻¹)	$Y_{Gli/S}$ (gGli.gS ⁻¹)	$Y_{Ac/S}$ (gAc.gS ⁻¹)	X_{max} (g.L ⁻¹)	P_x (gMCS.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_{Eth} (gEth.L ⁻¹ .h ⁻¹)	T (h)
<i>S. c.</i> CAT-1		0,35 ^a ±0,03	1,95 ^c ±0,18	3,06 ^a ±0,20	0,11 ^{c,d} ±0,00	0,38 ^a ±0,00	0,02 ^{b,c,d} ±0,00	0,04 ^a ±0,00	1,76 ^{a,b,c} ±0,17	0,25 ^a ±0,03	0,69 ^a ±0,01	5,0
<i>P.k.</i> BB1		0,10 ^c ±0,00	6,55 ^c ±0,41	1,16 ^{e,f} ±0,07	0,10 ^{d,e} ±0,00	0,36 ^a ±0,00	0,02 ^{b,c} ±0,00	0 ^a ±0	1,61 ^{a,b,c,d} ±0,04	0,10 ^{d,e,f} ±0,00	0,41 ^{c,d} ±0,01	9,5
<i>S. c.</i> BB9	GLC	0,10 ^c ±0,00	6,76 ^c ±0,00	0,80 ^{f,g,h} ±0,05	0,08 ^{e,f} ±0,00	0,39 ^a ±0,02	0,03 ^{b,c} ±0,00	0 ^a ±0	1,57 ^{a,b,c,d} ±0,20	0,07 ^{e,f,g,h} ±0,00	0,34 ^d ±0,02	11,0
<i>C. p.</i> 37		0,02 ^e ±0,00	29,28 ^b ±0,57	0,35 ^{g,h} ±0,04	0,06 ^{f,g} ±0,00	0,27 ^b ±0,02	0,11 ^a ±0,00	0 ^a ±0	0,66 ^f ±0,05	0 ⁱ ±0	0,04 ^e ±0,00	36,0
<i>C. g.</i> 43		0,22 ^b ±0,02	3,14 ^c ±0,30	1,69 ^{b,c,d} ±0,23	0,13 ^{b,c} ±0,00	0,38 ^a ±0,01	0,02 ^{b,c} ±0,00	0 ^a ±0	1,91 ^{a,b} ±0,08	0,21 ^{a,b} ±0,00	0,57 ^{a,b} ±0,0	6,0
<i>S. c.</i> CAT-1		0,25 ^b ±0,02	2,77 ^c ±0,28	2,24 ^b ±0,20	0,11 ^{c,d} ±0,00	0,40 ^a ±0,00	0,02 ^{b,c} ±0,00	0 ^a ±0	1,39 ^{b,c,d,e} ±0,03	0,16 ^{b,c,d} ±0,01	0,60 ^{a,b} ±0,01	6,0
<i>P.k.</i> BB1		0,10 ^c ±0,00	6,68 ^c ±0,31	1,25 ^{d,e,f} ±0,03	0,08 ^{e,f,g} ±0,00	0,39 ^a ±0,00	0,04 ^b ±0,01	0,02 ^a ±0,00	1,39 ^{b,c,d,e} ±0,06	0,08 ^{e,f,g} ±0,00	0,48 ^{b,c,d} ±0,04	9,0
<i>S. c.</i> BB9	FRU	0,10 ^{c,d} ±0,00	6,72 ^c ±0,67	1,24 ^{d,e,f} ±0,07	0,08 ^{e,f,g} ±0,00	0,40 ^a ±0,01	0,03 ^{b,c} ±0,00	0,04 ^a ±0,00	1,12 ^{d,e,f} ±0,12	0,06 ^{f,g,h,i} ±0,01	0,35 ^d ±0,01	9,5
<i>C. p.</i> 37		0,04 ^{d,e} ±0,00	16,09 ^{b,c} ±0,24	0,70 ^{f,g,h} ±0,17	0,06 ^{g,h} ±0,00	0,40 ^a ±0,05	0,09 ^a ±0,01	0,05 ^a ±0,01	0,86 ^{e,f} ±0,00	0 ⁱ ±0	0,05 ^e ±0,00	36,0
<i>C. g.</i> 43		0,22 ^b ±0,00	3,11 ^c ±0,12	1,56 ^{c,d,e} ±0,13	0,14 ^{a,b} ±0,00	0,41 ^a ±0,00	0,01 ^{c,d} ±0,00	0 ^a ±0	1,90 ^{a,b} ±0,02	0,18 ^{a,b,c} ±0,00	0,54 ^{b,c} ±0,00	7,0
<i>S. c.</i> CAT-1		0,328 ^a ±0,01	2,11 ^c ±0,11	2,08 ^{b,c} ±0,15	0,15 ^a ±0,00	0,43 ^a ±0,02	0,03 ^{b,c} ±0,00	0,01 ^a ±0,00	2,06 ^a ±0,00	0,24 ^a ±0,01	0,72 ^a ±0,05	5,5
<i>P. k.</i> BB1		0,02 ^e ±0,00	24,93 ^b ±1,45	0,24 ^h ±0,02	0,11 ^{c,d} ±0,00	0,26 ^b ±0,02	0,01 ^{b,c,d} ±0,00	0 ^a ±0	1,29 ^{c,d,e} ±0,06	0,02 ^{g,h,i} ±0,00	0,06 ^e ±0,00	33,0
<i>S. c.</i> BB9	SAC	0,14 ^c ±0,00	4,62 ^c ±0,04	1,29 ^{d,e,f} ±0,11	0,11 ^{c,d} ±0,01	0,41 ^a ±0,02	0,03 ^{b,c} ±0,00	0,02 ^a ±0,00	1,70 ^{a,b,c} ±0,09	0,13 ^{c,d,e} ±0,04	0,51 ^{b,c} ±0,01	9,5
<i>C. p.</i> 37		0,004 ^e ±0,00	158,26 ^a ±1,50	0,73 ^{f,g,h} ±0,06	0 ⁱ ±0	0 ^c ±0	0 ^d ±0	0 ^a ±0	0,65 ^f ±0,01	0 ⁱ ±0	0 ^e ±0	34,0
<i>C. g.</i> 43		0,043 ^{d,e} ±0,0 0	16,13 ^{b,c} ±0,87	0,98 ^{e,f,g} ±0,19	0,04 ^h ±0,00	0,01 ^c ±0,00	0,01 ^{c,d} ±0,01	0,01 ^a ±0,01	0,86 ^{e,f} ±0,02	0,01 ^{h,i} ±0,00	0 ^e ±0	32,0

S: substrato, μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento, TD: tempo de duplicação, μ_s : velocidade específica de consumo de substrato, $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em célula, $Y_{Eth/S}$: fator de conversão de substrato a etanol, $Y_{Gli/S}$: fator de conversão de substrato a glicerol, $Y_{Ac/S}$: fator de conversão de substrato a acetato, X_{max} : concentração máxima de células formadas, MCS: massa celular seca, P_x : produtividade em células, P_{Eth} produtividade em etanol, T: tempo de cultivo; GLC : glicose, FRU: frutose, SAC: sacarose; *S. c.* CAT-1: *S. cerevisiae* CAT-1; *P. k.* BB1: *P. kudriavzevii* BB1; *S. c.* BB9: *S. cerevisiae* BB9; *C. p.* 37: *C. parapsilosis* Recl 37; *C. g.* 43: *C. glabrata* Recl 43.

*Letras iguais em uma mesma coluna não apresenta diferença significativa (P<0,05).

Defrontando os resultados obtidos nesse trabalho para velocidade específica máxima de crescimento da linhagem industrial *S. cerevisiae* CAT-1 em cultivos com glicose ($\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$) e frutose ($\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$) com as leveduras isoladas, observou-se que a linhagem de levedura isolada de fruto *C. glabrata* Recol 43 destacou-se (significativamente a $P > 0,05$) dos demais isolados alcançando uma μ_{\max} de $0,22 \text{ h}^{-1}$ tanto em cultivos utilizando glicose, como frutose, mostrando boa adaptação a estes substratos, como reportado por Honma et al. (2016). Em contraste, nos cultivos com sacarose *C. glabrata* Recol 43 não se desenvolveu, apresentando baixa μ_{\max} de $0,043 \text{ h}^{-1}$ em relação a *S. cerevisiae* CAT-1 ($\mu_{\max} = 0,328 \text{ h}^{-1}$) e também uma baixa μ_S , que levou a ter um cultivo de 32 h. Enquanto que com glicose e frutose o valor de μ_S alcançou $1,69 \text{ h}^{-1}$ e $1,56 \text{ h}^{-1}$ em 6 e 7 h de cultivo, respectivamente.

Em relação à fisiologia de espécies de *Candida*, foi exposto que *C. glabrata* fermenta e assimila apenas glicose e trealose (Silva et al. 2012), não metabolizando os substratos xilose e sacarose, portanto produz etanol apenas a partir de hexoses, glicose e frutose (Wang et al. 2013), assim como ocorreu nos cultivos com *C. glabrata* Recol 43 (Tabela 1).

Análogo à sua μ_{\max} , *S. cerevisiae* CAT-1 obteve os maiores valores de μ_S sendo $3,06 \text{ h}^{-1}$, $2,24 \text{ h}^{-1}$ e $2,08 \text{ h}^{-1}$ para glicose, frutose e sacarose, respectivamente, o que refletiu em menores tempos de cultivo, 5 a 6 h. Em glicose, a velocidade de consumo de substrato de *S. cerevisiae* CAT-1 apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparado aos demais substratos (frutose e sacarose). Entretanto, não diferiu em termos de conversão a produtos (Tabela 1), mostrando ser apta a metabolizar todos os substratos testados.

Della-Bianca e Gombert (2013) em cultivos anaeróbicos com meio sintético e fonte de carbono glicose (20 g L^{-1}), avaliando os parâmetros cinéticos de linhagem industrial e de laboratório de *S. cerevisiae*, encontraram valores similares de $\mu_{\max} 0,345 \pm 0,038 \text{ h}^{-1}$, corroborando os dados desse trabalho com *S. cerevisiae* CAT-1 ($\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$).

Ainda em referência ao trabalho de Della-Bianca e Gombert (2013), considerando todas as linhagens de *S. cerevisiae* cultivadas, foi encontrado $Y_{\text{Eth/S}} 0,363 \pm 0,016 \text{ g etanol por g biomassa}$, valor próximo ao obtido por *S. cerevisiae* BB9 do presente trabalho, a qual apresentou o maior $Y_{\text{Eth/S}}$ ($0,39 \text{ gEth.gS}^{-1}$) dentre as linhagens avaliadas. Entretanto, em termos de produtividade de etanol (P_{Eth}) *S. cerevisiae* CAT-1 e *C. glabrata* Recol 43 apresentaram melhor desempenho P_{Eth} ($0,69$ e $0,57 \text{ gEth.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente), pois com cerca de metade do tempo de cultivo de cinética com *S. cerevisiae* BB9, 11 h, houve conversão completa do substrato.

Semelhante aos cultivos com glicose, em frutose as linhagens *S. cerevisiae* CAT-1 e *C. glabrata* Recol 43 também apresentaram melhor performance em relação às demais, obtendo P_{Eth} de 0,60 e 0,54 $gEth.L^{-1}.h^{-1}$, ao final de 6 e 7 h de cultivo, respectivamente. Além disso, a linhagem *P. kudriavzevii* BB1 mostrou ser mais eficaz em frutose, pois consumiu e converteu mais efetivamente o substrato nessa condição, mesmo não diferindo significativamente ($P < 0,05$) do cultivo em glicose.

Sandhu et al. (2012) empregando *Pichia kudriavzevii* para produção de etanol a partir de cascas de tangerina Kinnow (*Citrus reticulata*) via sacarificação e fermentação simultâneas, observou fermentação rápida dos substratos (inclusive glicose, frutose e sacarose), pois no máximo 12 h de cultivo estes substratos foram esgotados, entretanto, não foi capaz de metabolizar xilose e arabinose. Essa fermentação rápida corrobora com o presente trabalho nos substratos glicose e frutose (Tabela 1), entretanto, para metabolizar sacarose *P. kudriavzevii* BB1 apresentou um cultivo longo (33 h) com presença de substrato residual (Tabela 2).

Apenas as leveduras *S. cerevisiae*, CAT-1 e BB9 foram capazes de assimilar e fermentar a sacarose como substrato. *S. cerevisiae* CAT-1, com μ_{max} $0,328 h^{-1}$, ao final de 5,5 h de cultivo obteve significativa produtividade de biomassa ($0,24 gMCS.L^{-1}.h^{-1}$) e de etanol ($0,72 gEth.L^{-1}.h^{-1}$) apresentando diferença significativa ($P > 0,05$) das demais linhagens, seguida pelo isolado *S. cerevisiae* BB9 com μ_{max} $0,328 h^{-1}$, que em 9,5 h de cultivo, obteve P_x $0,13 gMCS.L^{-1}.h^{-1}$ e P_{Eth} $0,51 gEth.L^{-1}.h^{-1}$.

Em cultivos com sacarose, as linhagens *P. kudriavzevii* BB1 e *C. glabrata* Recol 43 possivelmente estão representadas pelo efeito Kluyver (ocorre frequentemente em dissacarídeos), que apesar de difundido entre as leveduras, não ocorre em cultivos com *S. cerevisiae*. O mecanismo proposto para essa ausência de fermentação alcoólica envolve o controle da síntese e/ou atividade do transportador de açúcar. E quando o efeito é observado para os dissacarídeos, estes são hidrolisados intracelularmente (Pronk et al. 1996). A hidrólise intracelular de sacarose em *S. cerevisiae*, ocorre por transporte ativo (Lagunas 1992), no qual a sacarose é absorvida através do co-transporte com íons H^+ , pelos transportadores MalxT e AgT1, e hidrolisada internamente por ação da invertase (Stambuk et al. 2000) ou maltase (Basso et al. 2008). Além disso, leveduras podem apresentar efeito Kluyver para alguns açúcares e para outros não, ou seja o efeito Kluyver está associado a combinação de espécies de leveduras e de açúcares (Fukuhara 2003).

Houve formação de biomassa em todos os cultivos nos quais as linhagens se desenvolveram, mas a maior concentração foi observada com *S. cerevisiae* CAT-1 em sacarose (2,06 g L⁻¹).

Em relação ao fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), as linhagem que mostraram-se mais eficientes são *S. cerevisiae* CAT-1 em sacarose (0,15 gMCS.gS⁻¹) e *C. glabrata* Recol 43 em frutose (0,14 gMCS.gS⁻¹). É reportado por Basso et al. (2011) que a linhagem de laboratório *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D cultivada em meio sintético com sacarose (20 g L⁻¹) apresentou um valor inferior ($Y_{X/S} = 0,094$ g biomassa por g de sacarose) ao encontrado nesse estudo, mesmo com o dobro da concentração inicial de açúcar. Mas em relação ao $Y_{Eth/S}$ (0,38 g de etanol por g de sacarose), o estudo referido corrobora com os obtidos nas linhagens *S. cerevisiae* CAT-1 e *S. cerevisiae* BB9 (0,43 e 0,41 gEth.gS⁻¹, respectivamente) neste experimento, mostrando que como essas duas linhagens foram obtidas na indústria, podem estar mais adaptadas a converter efetivamente substrato a produtos.

Quanto ao fator de conversão de substrato a glicerol ($Y_{gli/S}$), *C. parapsilosis* Recol 37 foi a linhagem que mais produziu glicerol (0,11 g Gli.gS⁻¹ em glicose e 0,09 g Gli.gS⁻¹ em frutose), apresentando diferença significativa ($P > 0,05$) dos demais cultivos. Enquanto que para $Y_{ac/S}$ em todas condições estudadas, sua formação foi muito pequena quando comparado com $Y_{X/S}$, variando de 0 a 0,05 g Ac.gS⁻¹ para acetato, não diferindo significativamente ($P < 0,05$).

A Tabela 2 apresenta os dados de balanço de carbono e recuperação de carbono dos cultivos realizados com diferentes fontes única de carbono (glicose, frutose e sacarose).

Tabela 2. Balanço de carbono (g L^{-1}) e recuperação de carbono (%) com quatro leveduras isoladas da Região Centro-Oeste e com a linhagem industrial *S. cerevisiae* CAT-1, em condições de anaerobiose, utilizando diferentes substratos como fonte única de carbono.

Linhagem	S (10 g L^{-1})	Substrato residual (g L^{-1})	Biomassa (g L^{-1})	Metabólitos (g L^{-1})	CO_2 (g L^{-1})	Carbono recuperado (%)
<i>S. c.</i> CAT-1		0,16±0,01	1,76±0,17	4,07±0,08	3,28±0,17	92,70±1,40
<i>P. k.</i> BB1		0,36±0,00	1,61±0,04	5,09±0,04	3,32±0,28	103,80±1,95
<i>S. c.</i> BB9	GLC	0,15±0,03	1,57±0,20	2,90±0,10	3,99±0,21	86,10±3,09
<i>C. p.</i> 37		5,89±0,51	0,66±0,05	2,29±0,25	1,45±0,06	102,90±1,46
<i>C. g.</i> 43		0,15±0,03	1,91±0,08	4,47±0,11	3,34±0,24	98,70±0,13
<i>S. c.</i> CAT-1		0,21±0,02	1,39±0,03	4,35±0,07	3,54±0,09	94,90±0,03
<i>P. k.</i> BB1		0,17±0,02	1,39±0,06	5,31±0,47	3,32±0,09	101,90±3,23
<i>S. c.</i> BB9	FRU	0,67±0,12	1,12±0,12	4,41±0,39	3,49±0,03	96,90±2,02
<i>C. p.</i> 37		5,75±0,28	0,86±0,00	2,87±0,22	0,96±0,06	104,40±3,81
<i>C. g.</i> 43		0,31±0,05	1,90±0,02	4,07±0,01	3,45±0,09	97,30±1,44
<i>S. c.</i> CAT-1		0,41±0,12	2,06±0,00	4,62±0,02	3,87±0,18	109,60±1,21
<i>P. k.</i> BB1		2,96±0,69	1,29±0,06	2,28±0,14	2,68±0,18	92,10±2,97
<i>S. c.</i> BB9	SAC	0,18±0,03	1,70±0,09	5,36±0,27	3,49±0,03	107,30±1,24
<i>C. p.</i> 37		8,68±0,34	0,65±0,01	0,33±0,02	0,39±0,06	100,50±8,30
<i>C. g.</i> 43		7,31±0,34	0,86±0,02	0,14±0,06	1,06±0,00	103,70±2,71

S: substrato; GLC: glicose, FRU: frutose, SAC: sacarose; *S. c.* CAT-1: *S. cerevisiae* CAT-1; *P. k.* BB1: *Pichia kudriavzevii* BB1; *S. c.* BB9: *S. cerevisiae* BB9; *C. p.* 37: *C. parapsilosis* Recl 37; *C. glabrata* 43: *C. glabrata* Recl 43.

Uma análise geral da Tabela 2 indicou que, independente da linhagem de levedura, quanto maior a concentração de substrato residual no final do cultivo, menor foi a concentração de metabólitos extracelulares e CO_2 formada.

A concentração de metabólitos e o CO_2 formado, exceto nas condições de presença de substrato residual, apresentaram conteúdos de 2,90 a 5,36 g L^{-1} e 3,28 a 3,99 g L^{-1} , respectivamente.

O balanço de carbono dos cultivos fecharam entre 86,10% e 109,60%, e a variação correspondente ao carbono total consumido durante a fase exponencial de um cultivo, não é delimitada apenas para os principais produtos da fermentação (biomassa, etanol e CO_2), mas também para outros metabólitos. Além disso, se uma condição específica é desfavorável para determinada espécie de levedura ou o cultivo estiver sob algum tipo de estresse, também podem fazer com que altas percentagens de carbono sejam incorporadas em glicerol, ácidos orgânicos e outros compostos não quantificados, apontando para um provável mecanismo de resposta ao estresse (Della-Bianca e Gombert 2013).

CONCLUSÃO

Neste avaliou-se a fisiologia de linhagens de leveduras isoladas e da linhagem industrial *S. cerevisiae* CAT-1 em diferentes condições de cultivo. O desempenho dos processos mostrou-se dependente da linhagem e dos substratos utilizados como fonte única de carbono. A levedura *C. glabrata* Reol 43 destacou-se das demais nos cultivos utilizando glicose e frutose como fontes únicas de carbono, mostrando boa adaptação a estes substratos. Entretanto, nos cultivos com sacarose não foi capaz de se desenvolver. Nessa condição, apenas linhagens *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e BB9 mostraram-se adaptadas.

REFERÊNCIAS

Abbott DA, Knijnenburg TA, Poorter LML, Reinders MJT, Pronk JT, Van Maris AJA (2007) Generic and specific transcriptional responses to different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 7:819 – 833.

Banat IM, Marchant R (1996) The use of a thermotolerant fermentative *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast strain for ethanol production. *ACTA Biotechnologica* 16:215 – 223.

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1983) A guide to identifying and classifying yeasts. Cambridge University Press, Cambridge.

Basso LC, Amorim HV, Oliveira AJ, Lopes LM (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research* 8:1155 – 1163.

Basso TO, Kok S, Dario M, Espírito-Santo JCA, Muller G, Schlong PS, Silva CP, Tonso A, Daran J, Gombert AK, Van Maris AJA, Pronk JT, Stambuk BU (2011) Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. *Metabolic Engineering* 13:694–703.

Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Inhibition of *Candida parapsilosis* mitochondrial respiratory pathways enhances susceptibility to caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50:744 – 747.

Della-Bianca BE, Basso TO, Stambuk BU, Basso LC, Gombert AK (2013) What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:979-991.

Della-Bianca BE, Gombert AK (2013) Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie van Leeuwenhoek* 104:1083–1095.

Fonseca GG, De Carvalho NMB, Gombert AK (2013) Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:5055 – 5067.

Fukuhara H (2003) The Kluyver effect revisited. *FEMS Yeast Research* 3:327-331.

Honma JM, Oka ML, Silva PGP, Silva CAA, Fonseca GG (2016) Avaliação dos parâmetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* Cat-1 e de 13 leveduras isoladas da região Centro-Oeste utilizando glicose como fonte de carbono em anaerobiose. XI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages & V Simpósio de Engenharia e Ciência de Alimentos.

Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E (2008) Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindnera* gen.nov. and *Wickerhamomyces* gen.nov. *FEMS Yeast Res* 8:939–954.

Lagunas, R. (1992) Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 104:229 – 242.

Nascimento VM, da Silva LF, Gomez JGC, Fonseca GG (2016) Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. *Scientia Agricola* 73:429 – 433.

Odds F (1988) *Candida and Candidiasis*. 2nd ed. Bailliere Tindall, London.

Okpokwasili GC, Nweke CO (2005) Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology* 5:305 – 317.

Parks LW, Casey WM (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annual Review Microbiology* 49:95 – 116.

Peixoto CRM, Rosa GR, Silva CN, Santos BT, Engelmann TL (2012) Miniprojeto para ensino de química geral experimental baseado na fermentação do caldo de cana-de-açúcar. *Química Nova* 35:1686-1691.

Pronk JT, Steensmays HY, Van Dijken JP (1996) Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12:1607-1633.

Ribeiro CAF, Horii J (1999) Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. *Scientia Agricola* 56:255-263.

Sandhu SK, Oberoi HS, Dhaliwal SS, Babbar N, Kaur U, Nanda D, Kumar D (2012) Ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) peels via simultaneous saccharification and fermentation using crude enzyme produced by *Aspergillus oryzae* and the thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain. *Annals of Microbiology* 62:655–666.

Silva CAA (2016) Avaliação fisiológica de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e de 14 leveduras isoladas da região Centro-Oeste em diferentes condições de cultivo. 103p. Qualificação de Doutorado. (Biotecnologia e Biodiversidade) - Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Dourados.

Silva CAA, Oka ML, Honma JM, Silva PGP, Fonseca GG (2016) Physiological evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* Cat-1 and 3 isolated from must in the Brazilian Midwest Region, grown in anaerobiosis with sucrose as carbon source. III International Symposium on Microbiology and Biotechnonology.

Silva S, Negril M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology* 36: 288–305.

Silva RO, Batistote M, Cereda MP (2011) Wild strains of fermenting yeast isolated of sugar cane juice from an alcohol distillery from Mato Grosso, Brazil. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2:22 – 27.

Snoek ISI, Steensma HY (2007) Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26:545 – 551.

Stambuk BU, Batista AS, Araujo OS (2000) Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 2, p. 212-214.

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

Van Dijken JR, Weusthuis RA, Pronk JT (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 63, p. 343-352.

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

Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP (1990) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose limited chemostat cultures. *Journal of General Microbiology* 136:395 – 403.

Visser W, Scheffers WA, Van Der Vegte WHB, Van Dijken JP (1990) Oxygen requirements of yeasts. *Applied and environmental microbiology*, v. 56, p. 3785-3792.

Wang X, Ike M, Shiroma R, Tokuyasu K, Sakakibara Y (2013) Expression of neutral b-glucosidase from *Scytalidium thermophilum* in *Candida glabrata* for ethanol production from alkaline-pretreated rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 116:362 – 365.

Anexo 1. Normas do periódico “Antonie van Leeuwenhoek” - ISSN: 0003-6072 (Print) - 1572-9699 (Online), selecionado para formatação desse trabalho.