

ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO E METABOLISMO DE LEVEDURA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO E METABOLISMO DE LEVEDURA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de julho de 2003

Dr.^a Virgínia Maria Chaves Alves.
(Conselheira)

Prof.^a. Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

Prof. Frederico José Vieira Passos

Prof.^a. Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A minha querida mãe Eunice Dias Queiroz

AGRADECIMENTOS

A Deus por conduzir sempre o meu caminho.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de estudo e desenvolvimento profissional.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pela concessão da bolsa de estudo

Aos Professores, Flávia Maria Lopes Passos, Célia Alencar de Moraes e Frederico José Viera Passos pelas orientações durante este trabalho.

Ao Otto Domenicci Mozzer pelo apoio e oportunidade de aprendizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica – LEB / VALLÉE S.A.

A todos os colegas do LEB, e aos amigos Igor Viana Brandi e Edson Vander Jorge pelo incentivo.

Ao colaboradores do SIT - VALLEE S.A.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de microrganismo e amigos de republica, pela amizade e companheirismo.

A minha mãe Eunice e meu pai Alcides e todos os meus familiares.

A Keoma pela confiança.

BIOGRAFIA

ALEX SANDER RODRIGUES CANGUSSU, filho de Alcides Rodrigues de Queiroz e Eunice Dias de Queiroz, nasceu em São Francisco, Estado de Minas Gerais, em 16 de agosto de 1974.

Em dezembro de 2000, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), em Montes Claros, Minas Gerais.

Em Abril de 2001, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de tese em Julho de 2003.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE QUADROS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVO GERAL.....	10
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. Microrganismo e meio de cultivo.....	11
4.2 Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em função da temperatura e pH.....	12
4.3 Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em função da aeração.....	12
4.3.1 Análise de substrato e metabólitos.....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5.1 Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em função da temperatura e pH.....	14
5.2 Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em função da aeração.....	20
5.2.1 Efeito da aeração na produção de etanol e glicerol.....	27
5.2.2 Efeito da aeração na produção de ácidos orgânicos.....	30
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
APÊNDICES.....	40
APÊNDICE A.....	41
APÊNDICE B.....	42
APÊNDICE C.....	44

LISTA DE FIGURAS

1	Micrografia da levedura UFV-3 tratadas com corante azul de metileno em microscópio Olympus Bx40 com aumento de 400x.....	15
2	Efeito das diferentes condições de temperatura e de pH na velocidade específica de crescimento da levedura UFV-3.....	16
3	Densidade celular máxima da levedura UFV-3 obtidas em diferentes condições de temperatura e pH.....	17
4	Efeito da temperatura na velocidade específica de crescimento da levedura UFV-3 em meio YPD no pH 4.7	18
5	Consumo de glicose e produção de biomassa pela levedura UFV-3 durante crescimento em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C, em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	22
6	Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C, em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	24
7	Produção de etanol e glicerol pela levedura UFV-3 em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C, em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	28
8	Produção de ácidos orgânicos pela levedura UFV-3 em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C, em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	32
9	Correlação entre densidade ótica e peso da matéria seca... ..	41
10	Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de substância padrão e para análise das amostras dos cultivos em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	42
11	Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) das amostras dos cultivos em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	43

LISTA DE QUADROS

1	Parâmetros cinéticos da levedura UFV-3 cultivados em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	25
2	Balanço de carbono da levedura UFV-3 cultivados em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose	33
3	Produção de ácidos orgânicos pela levedura UFV-3 cultivados em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	44
4	Produção de etanol, glicerol e consumo de glicose da levedura UFV-3 cultivados em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.....	45

RESUMO

CANGUSSU, Alex Sander Rodrigues, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2003. **Cinética de crescimento e metabolismo de Levedura potencialmente probiótica.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiros: Célia Alencar de Moraes e Virgínia Maria Chaves Alves.

A cinética de crescimento e metabolismo da levedura UFV-3 isolada da microbiota intestinal de leitões recém-nascidos foi estudada na perspectiva de sua utilização como probiótico. As principais condições de cultivo foram sugeridas em meio YPD. Temperatura e pH foram investigados na faixa de 28–45 °C e 3.8–5.5. A levedura UFV-3 apresentou pH ótimo de crescimento de 4.7 e temperatura de 40 °C. A cinética de crescimento foi avaliada em três níveis de aeração: aerobiose, microaerobiose e anaerobiose. O coeficiente de rendimento celular foi de 0.03 g.mmol⁻¹, 0.02g.mmol⁻¹ e 0.01g.mmol⁻¹ nas condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose respectivamente. Os efeitos dos níveis de aeração no metabolismo oxido-redutivo foram analisados pela produção de etanol, glicerol e ácidos orgânicos. A concentração final de etanol alcançou 120 mmol.L⁻¹, 174,03 mmol.L⁻¹ e 101 mmol.L⁻¹ para as condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose respectivamente. O coeficiente de rendimento de produto da conversão de glicose em etanol foram 1.1 mmol.mmol⁻¹, 1.6 mmol.mmol⁻¹ e 1.7 mmol.mmol⁻¹ para as respectivas condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose. Glicerol foi produzido em concentrações de 11 mmol.L⁻¹, 10mmol.L⁻¹ e 7 mmol.L⁻¹ nas condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose respectivamente. O coeficiente de rendimento de produto da conversão de glicose em glicerol foram 0.10 mmol.mmol⁻¹, 0.09 mmol.mmol⁻¹ e 0.11 mmol.mmol⁻¹ para as respectivas condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose. Traços de concentrações de metabólitos como ácido propiônico, ácido láctico, e ácido succínico foram detectados. Ácido acético não foi detectado em nenhum dos níveis de aeração estudados.

ABSTRACT

CANGUSSU, Alex Sander Rodrigues, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July of 2003. **Growth kinetics and metabolism of a potentially probiotic yeast.**
Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Committe members: Célia Alencar de Moraes and Virgínia Maria Chaves Alves.

Growth kinetics and metabolism of isolated yeast UFV-3 from intestinal microbiota of newly born pigs, was studied in the perspective of its use as probiotic. Main culture conditions were suggested in medium YPD. Temperature and pH were investigated respectively in the range of 28–45 °C and 3.8–5.5. The yeast UFV-3 has shown optimal growth at pH of 4.7 and temperature of 40 °C. Growth kinetics was evaluated in three aeration levels: aerobe, microaerobe and anaerobe. The cellular yield was 0.03 g.mmol⁻¹, 0.02g.mmol⁻¹ and 0.01g.mmol⁻¹ in aerobe, microaerobe and anaerobe respectively. Effects of the aeration levels on the oxide-reductive metabolism were analyzed by the ethanol, glycerol and organic acids production. Ethanol final concentration reached 120 mmol.L⁻¹, 174 mmol.L⁻¹, and 101 mmol.L⁻¹ respectively for aerobe, microaerobe and anaerobe conditions. Production yield coefficient for conversion of glucose into ethanol were 1.1 mmol.mmol⁻¹, 1.6 mmol.mmol⁻¹, and 1.7 mmol.mmol⁻¹ respectively for aerobe, microaerobe and anaerobe conditions. Glycerol was produced in concentrations of 11 mmol.L⁻¹ and 10 mmol.L⁻¹ and 7 mmol.L⁻¹ in aerobe, microaerobe and anaerobe respectively. Production yield coefficient for conversion of glucose into glycerol were 0.10 mmol.mmol⁻¹, 0.09 mmol.mmol⁻¹ and 0.11 mmol.mmol⁻¹ respectively for aerobe, microaerobe and anaerobe conditions. Metabolites as propionic, lactic and succinic acids were detected in trace concentrations. Acetic acid was not detected in none of the studied aeration levels.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o oitavo maior produtor de suínos do mundo, onde 6,86 milhões são produzidos na região sudeste o que equivale a 18,8% da produção total do país. Essa região é a terceira maior produtora e a segunda maior consumidora de suínos do país, sendo que no estado de Minas Gerais a região da zona da mata concentra a maior produção do estado e destaca-se no investimento da pesquisa e desenvolvimento da suinocultura. Em 2001 o mercado internacional de suínos obteve um crescimento de 2,4% em referência ao ano anterior, alavancado principalmente pelo excepcional crescimento do Brasil com 47%, acompanhado dos Estados Unidos e Canadá com 18% e 8%, respectivamente.

No caso de suínos, as enfermidades digestivas que acometem animais lactentes e logo após o desmame ocasionam perdas econômicas. Clinicamente ocorrem diarreia, diminuição de peso ou morte súbita, em virtude da modificação de sua microbiota intestinal, acarretando em diminuição na ingestão de alimentos, baixo desempenho animal e conseqüentemente a suscetibilidade para doenças. É prática comum a administração de antibióticos em doses terapêuticas e subterapêuticas como tratamento contra infecções. Entretanto, essa prática é condenável não só pela ineficiência no controle das disenteria, mas também, devido casos constantes de resistência bacteriana, além da possibilidade de incorporação de resíduos de antibióticos em produtos derivados de animais.

A administração de leveduras na alimentação de leitões em desmame tem sido uma alternativa que proporciona benefícios, como melhoria na adaptação da nova fase de crescimento, regularizando o consumo de alimentos e o ganho de peso. A ação probiótica de culturas de leveduras tem sido associada a diversos fatores, como a produção de substâncias antimicrobianas, a competição por sítios

para adesão no intestino, por nutrientes e a imunoestimulação, beneficiando o restabelecimento da relação ideal entre microrganismos benéficos e patogênicos, além da redução do estresse relacionado ao período de desmame e aos tratamentos com antibióticos.

Sant'ana (2002) em testes *in vitro* selecionou a levedura UFV-3 que apresentou ação inibitória no crescimento de patógeno de suínos, além de sua capacidade de crescimento em condições adversas que simulam o ambiente do trato digestivo animal. A possibilidade do emprego da levedura UFV-3 como probióticos de suínos depende de testes em animais.

Para testar o potencial *in vivo* da levedura UFV-3, é necessário a definição das condições de produção de biomassa. Portanto, este trabalho propõe determinar as condições ótimas de temperatura, pH e aeração da levedura UFV-3, já caracterizada como resistente às condições do trato digestivo animal, que possibilitem o desenvolvimento de sistemas de produção de massa celular para sua aplicação em animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A produção de biomassa de levedura para uso como suplemento na ração é uma alternativa para manter a saúde e o desempenho animal, contribuindo diretamente para uma melhor digestibilidade da matéria ingerida, maior produção de leite, e aumento no ganho de peso [12]. As culturas de leveduras ativas na ração animal constituem um probiótico, isto é, microrganismos vivos não patogênicos presentes em alimentos ou suplemento alimentar com efeito benéfico por melhorar o balanço microbiano de animais [18]. Leveduras do gênero *Saccharomyces*, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*, já foram usadas como probióticos de suínos e de bovinos [01, 06, 14].

A ação benéfica dos microrganismos probióticos pode ser devida à produção de substâncias antimicrobianas, a competição por sítios para adesão no intestino e por nutrientes e a imunoestimulação [34]. As perspectivas do emprego na alimentação animal, incluem o restabelecimento da relação ideal entre microrganismos benéficos e patogênicos, o combate a problemas associados ao estresse - falha na ingestão do colostro, no desmame, ao transporte para uma nova locação, à forte luminosidade em animais bem alimentados, e aos tratamentos com antibióticos [34].

A ingestão dos microrganismos probióticos é dificultada pela presença de substâncias existentes no trato digestivo animal, capazes de inibir seu crescimento. As espécies de probióticos possuem sensibilidades diferenciadas a tais condições. A presença de lisozimas, enzimas pancreáticas, baixo pH, ácidos orgânicos e sais biliares, têm sido identificadas como barreiras que dificultam a sobrevivência e colonização do probiótico e também têm sido usadas para os testes de seleção [01, 21]. No isolamento de um bom probiótico é importante considerar preferencialmente, a relação espécie específica, ou seja, direcionar o

isolamento e o desenvolvimento do probiótico em animais selecionados em perfeitas condições clínicas [44].

A determinação do potencial probiótico de leveduras da microbiota intestinal de leitões recém-nascidos, por Sant'ana [40], selecionou uma levedura potencialmente probiótica para suínos. A levedura codificada como UFV-3 apresentou ação inibitória no crescimento de patógeno de suínos *Cryptococcus laurentii*. Essa comprovada atividade *killer* e a capacidade de crescimento em condições adversas, que simulam o ambiente do trato digestivo animal, foram os critérios adotados para a seleção da levedura UFV-3.

Em ruminantes, as culturas de leveduras agem na fermentação ruminal, alterando o pH e o aumento da produção de ácidos graxos voláteis como acetato, propionato, butirato, usado como fonte energética para o animal. Entretanto, lactato e metano, também são produzidos durante o metabolismo no rumem, gerando um ambiente hostil ao animal. As culturas de leveduras contribuem para a diminuição dos níveis destes compostos, por estimular o crescimento de bactérias que os utilizam como fonte de carbono e energia e, conseqüentemente, contribuindo para maior produtividade animal [20, 30, 50]. Segundo McArthur & Miltimore [33], o rumem é considerado extremamente anaeróbico, mesmo em animais fistulados os níveis de oxigênio ficam entre 0,5 e 1%. Entretanto, esse baixo nível de oxigênio é letal para bactérias estritamente anaeróbica. O uso das culturas de leveduras tem contribuído na eliminação do oxigênio existente [38]. Além dos benefícios na fermentação ruminal, as culturas de leveduras podem apresentar efeitos pós-rumem [13, 30, 35, 48]. Trabalhos mostram que a presença de culturas viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* no intestino de ovelhas têm gerado benefícios, como a redução da temperatura retal de animais estressados ao calor.

Fiems [15], relata que a adição de *Saccharomyces cerevisiae* em animais gera em media aumento de 9,5% do peso vivo em bezerros, 7,8% de aumento no ganho de peso em machos adultos e 3,9% no rendimento de leite em vacas em lactação. Dann, et al., [12], verificaram que a adição de culturas de leveduras na dieta de vacas em lactação gerou resultados significativos quanto ao consumo e a

maior digestão da matéria seca ingerida, além de propiciar maior produção de leite nos primeiros 42 dias de tratamento.

Em leitões jovens observam-se modificações da microbiota intestinal durante o período de desmame. Essas modificações provocam estresse ao animal, afetando diretamente sua alimentação, acarretando baixo desempenho e, conseqüentemente, a suscetibilidade a doenças. O resultado é, portanto, uma retardação pós-desmame que é comumente tratada com doses subterapêuticas de antibióticos. No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos pode promover o desenvolvimento de bactérias resistentes, fato que tem gerado proibições por alguns países do emprego de tais tratamentos, com o fim de melhorar conversão alimentar e o ganho de peso. Além disso, o emprego de tais tratamentos pode acarretar também a contaminação de produtos de origem animal, desde ovos, carnes de aves, suínos e bovinos resultando em problemas para o consumidor [07, 09, 25, 32]. Uma alternativa para este problema é o desenvolvimento de aditivos que geram efeitos positivos no desempenho desses animais. Os microrganismos probióticos, incluindo culturas de leveduras e lactobacilos, têm contribuído na melhoria do desempenho reprodutivo e beneficiando os leitões na fase de desmame [17, 24, 27 31, 36]. Mathew et al., [31], verificaram que a ação de culturas de leveduras em leitões gerou aumentos significativos no consumo da matéria ingerida e no peso animal vivo.

A determinação das condições ótimas de temperatura e pH e oxigênio auxilia no melhor entendimento da fisiologia microbiana e possibilita sua aplicação para otimização de sistemas de bioprocessos, gerando aumentos na produção de substâncias de interesse industrial como biomassa microbiana.

A variação da velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}), como função da temperatura é comumente estudada pela equação de Arrhenius.

$$[K = A \exp (-e / RT)]$$

Onde;

K , velocidade específica de crescimento,

A , colisão ou fator de freqüência

e, temperatura característica que é similar à energia de ativação na equação de Arrhenius,

R , constante universal dos gases,

T , temperatura em Kelvin.

A equação de Arrhenius para muitos microrganismos demonstra uma relação linear na temperatura média, chamada de temperatura normal. Abaixo e acima da temperatura normal a velocidade específica de crescimento é menor do que o valor previsto pela extrapolação da curva, o que resulta na inabilidade dos microrganismos obterem sua taxa de crescimento ótimo [11]. Ratkowsky et al., [37], apresentou uma relação linear entre a raiz quadrada da velocidade específica de crescimento ($\mu \text{ h}^{-1}$) como função da temperatura.

$$\sqrt{\mu} = b (T - T_0)$$

Onde;

b , coeficiente de regressão

T_0 , temperatura hipotética, uma propriedade intrínseca dos microrganismos.

Embora esta relação apresente limitação para a extrapolação da temperatura mínima de crescimento, o emprego desse modelo tem principal objetivo prever valores intermediários da velocidade específica de crescimento com base em dados experimentais limitados.

O efeito do oxigênio no nível intracelular de muitas proteínas têm sido mostrados pela transcrição diferencial dos seus genes em condições culturais influenciadas pela oxigenação. Muitas dessas proteínas têm função na respiração, como os citocromos da cadeia transportadora de elétrons, síntese de esterol, grupo prostético heme ou ácidos graxos insaturados, além de proteínas de resposta ao estresse oxidativo. Na respiração tem duas principais funções, a oxidação e redução de cofatores e a geração de energia na forma de ATP, o que possibilita aumento do rendimento de biomassa, e a diminuição do rendimento de etanol [26].

Os genes regulados por oxigênio podem ser classificados em dois grupos - genes aeróbicos, transcritos otimamente em presença de ar, e genes hipóxicos, transcritos otimamente em padrões anóxicos ou condições de microaerofilia. Entretanto, não está bem claro como leveduras e outros eucariotos recebem o sinal da presença de oxigênio, e nem como a sensibilidade ao oxigênio é transmitida para a ativação ou repressão dos genes [08].

Em condições limitadas de oxigênio a energia celular de leveduras pode ser obtida pela fermentação alcoólica, no entanto, a conversão de glicose em etanol é redox neutra, não sendo possível a reoxidação do excesso de equivalentes reduzidos gerados na assimilação. A produção de glicerol pode servir como uma alternativa celular para o balanço redox, mas requer gasto de ATP [45]. A partir de etanol, leveduras podem excretar uma variedade de metabólitos, estes incluem polialcoois - glicerol, eritritol, arabinitol, xilitol, ribitol, ácidos monocarboxílicos - principalmente ácido acético e ácido pirúvico, ácidos dicarboxílicos e tricarboxílicos - ácido succínico, ácido cítrico e isocítrico. A produção desses metabólitos depende da espécie em particular, podendo ocorrer tanto em condição aeróbica ou anaeróbica. No entanto, a via de formação e o destino do poder redutor gerado não são completamente elucidados [45].

O oxigênio inibe os processos anaeróbicos e simultaneamente diminui a taxa de conversão de glicose. Esse efeito inibidor do oxigênio é um exemplo da regulação metabólica por um substrato. O oxigênio é fator limitante quando o nível de oxigênio dissolvido é menor que a concentração crítica de oxigênio. Neste caso, a velocidade específica de crescimento segue a equação de Monod em relação à concentração de oxigênio. Em culturas com altas concentrações de células, a taxa de consumo de oxigênio pode exceder a taxa de suprimento de oxigênio, acarretando na limitação por oxigênio [04].

A transferência da bolha de oxigênio para a célula é normalmente limitada pela transferência de oxigênio através do líquido que circunda a bolha. A taxa de transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida é representada por:

$$N_{O_2} = k_L \cdot a \cdot (C^* - C_L) = OTR \quad E1.$$

sendo k_L o coeficiente de transferência de oxigênio (cm/h), a é área da interface gás-líquido (cm^2/cm^3), C^* é a concentração de saturação de oxigênio dissolvido (mg/L), C_L é a concentração de oxigênio dissolvido (mg/L) e N_{O_2} é a taxa de transferência de oxigênio ($\text{mg O}_2/\text{L}\cdot\text{h}$). O termo taxa de oxigênio transferido (OTR) também é usado. A taxa de consumo de oxigênio, definida como OUR é expressa como:

$$\text{OUR} = q_{O_2} \cdot X = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/O_2}} \quad \text{E2.}$$

sendo q_{O_2} a taxa específica de consumo de oxigênio ($\text{mg O}_2/\text{g célula}\cdot\text{h}$), Y_{X/O_2} é o coeficiente de rendimento de oxigênio ($\text{g.célula}/\text{g}\cdot\text{O}_2$) e X é a concentração de célula ($\text{g.célula}/\text{L}$).

Quando oxigênio dissolvido é limitante, a taxa de consumo de oxigênio será igual à taxa de transferência de oxigênio do gás para o líquido. Se não for considerada desprezível a quantidade de O_2 para manutenção, comparado com a quantidade para crescimento, então:

$$\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/O_2}} = k_L \cdot a \cdot (C^* - C_L) \quad \text{E3.}$$

ou
$$\frac{dX}{dt} = Y_{X/O_2} \cdot k_L \cdot a \cdot (C^* - C_L)$$

O suplemento adequado de oxigênio é essencial para a fermentação aeróbica. Siegel e Gaden [41], atribuem o aumento do $K_L a$ durante a fermentação, às alterações metabólicas do meio, resultando na formação de pequenas bolhas, e por conseqüência, no aumento da área interfacial gás-líquido. Duas teorias têm sido propostas, sobre a respiração de células acumuladas na interface gás-líquido. Uma teoria assume que a transferência direta de oxigênio ocorre quando há o contato entre a célula e o líquido que circunda a bolha do gás, o que elimina a resistência de transferência do oxigênio [5]. A outra teoria baseia-se na saturação da concentração de oxigênio na interface gás-líquido [42, 43].

A definição das condições ótimas de oxigênio, temperatura e pH para crescimento de microrganismos de importância econômica, tem como finalidade otimizar a produção de substâncias de interesse econômico, possibilitando a sistematização para escala de produção industrial.

3. OBJETIVO GERAL

Determinar condições ótimas de crescimento, pH, temperatura e aeração da levedura UFV-3 isolada de leitões recém nascidos já caracterizada como levedura com potencial para uso como probióticos de suínos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.1.1 Determinar o efeito de diferentes valores pH e de temperatura no crescimento da levedura UFV-3 em meio de cultura YPD.

3.1.2 Ajustar um modelo matemático para justificar o efeito simultâneo de pH e temperatura no crescimento da levedura UFV-3.

3.1.3 Determinar o efeito de três condições de aeração: aerobiose, microaerobiose e anaerobiose no crescimento da levedura UFV-3 em valores de pH e temperatura previamente definidos.

3.1.4 Definir coeficientes cinéticos de consumo de substrato, produção de metabólitos e produção de biomassa da levedura UFV-3 nas condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia - UFV, instalado no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) e de Engenharia Bioquímica (LEB) da indústria de produtos veterinários VALLÉE S.A., situada em Montes Claros – MG.

4.1 Microrganismo e Meio de cultivo

A levedura UFV-3 objeto deste estudo foi isolada da microbiota intestinal de leitões recém-nascidos, da Suinocultura do Departamento de Zootecnia da UFV, e selecionada *in vitro* como resistentes às condições ambientais do trato digestivo [40]. A levedura UFV-3 foi encaminhada ao serviço de identificação de leveduras CBS-Holanda, para ser submetida à análise taxonômica. O estoque de culturas da levedura UFV-3 foi armazenado a -80 °C em meio YPD – 20 % de glicerol e ativadas a 30 °C 160 rpm por 12 h. O meio YPD constituído em g.L⁻¹ por extrato levedura, 10; Peptona, 20 e Dextrose, 20, foi esterilizado a 121 °C por 25min. usado em todos experimentos.

4.2 Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em função de pH e temperatura

Após ativação do inóculo em incubadores rotacionais 160 rpm a 30 °C por 12 h, a cultura foi centrifugada a 5000 g a 4 °C por 5 min, e o sedimento celular obtido, foi ressuspenso em meio YPD. A cinética de crescimento em função de temperatura e pH foi conduzido em sistema de batelada sob agitação, com velocidade rotacional a 160 rpm (New Brunswick Scientific Co., USA), em frasco erlenmeyer de 500 mL, contendo 150 mL de meio YPD, inoculados com D.O.₆₀₀ de 0.05. Os valores de temperatura e pH inicial estudados variaram de 28 a 45 °C e 3.8 a 5.5, respectivamente. Os valores de pH de estudos foram determinados considerando a relação de equidistância da concentração de [H⁺], fundamentado nos valores de pH usados para crescimento de leveduras. Para o ajuste dos valores iniciais de pH, foram adicionadas soluções de HCl 1N e NaOH 3N. Durante os cultivos foram coletadas amostras para leitura da D.O.₆₀₀ em espectrofotômetro (BECKMAN DU640). A correlação da densidade ótica com peso da matéria seca determinou que uma unidade de D.O.₆₀₀ é equivalente a 0,549 g.L⁻¹ de massa celular.

As velocidades específicas de crescimento foram calculadas pelo logaritmo natural (*ln*) dos dados de população versus tempo na fase exponencial de crescimento.

4.3 Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em função da aeração

O inóculo de 1% (v/v) de uma cultura pré-ativada foi transferido para um volume de 250 mL de meio YPD, incubado a 40 °C a 160 rpm. Atingido D.O.₆₀₀ de 0.5, todo esse volume foi transferido para o fermentador. O cultivo teve início com uma concentração celular inicial D.O.₆₀₀ 0.05. Os efeitos do oxigênio na cinética da

levedura UFV-3 foram avaliados no cultivo em batelada em fermentador (BIOFLO III, New Brunswick Scientific Co., USA) equipado com controles automáticos de temperatura a 40 °C e pH 4.7, pela adição de HCl 1N e NaOH 3N. Neste experimento foram estudados três níveis de aeração - anaerobiose, microaerobiose e aerobiose. Para o cultivo em anaerobiose, eliminou-se inicialmente o oxigênio dissolvido no meio. Para isso, realizou-se a esterilização da dorna contendo meio YPD a 121 °C por 25 min, seguido de injeção de N₂ sob agitação de 300 rpm por 20 min. Alcançada a condição de anaerobiose, o cultivo teve início com entrada constante de N₂ na interface gás-líquido do fermentador, sob agitação de 50 rpm. No cultivo em microaerobiose, o sistema não recebeu nenhuma entrada de gás, apenas agitação de 150 rpm. No cultivo em aerobiose, o sistema recebeu a entrada de ar na interface gás-líquido do fermentador, com agitação constante de 300 rpm. Em todos os experimentos foram coletadas amostras em intervalos de uma hora para monitoramento do aumento de biomassa e análises cromatográficas.

4.3.1 Análise de substrato e metabólitos

As concentrações de açúcar consumidos e ácidos orgânicos, álcoois formados durante o cultivo foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Cada amostra foi previamente diluída a 1:10 em H₂SO₄ 10 mM e filtrada em filtro 0,45 µm. Foi utilizada uma coluna Aminex HPX-87H (BIO-RAD Laboratories, Richmond Califórnia) e um detector de índice de refração (WATERS 410 Differential Refractometer Detector). Esse detector possui índices refrativos de 1 a 1,75 e faixa de medida compreendida entre 5×10^{-8} a 5×10^{-3} unidade de índice refrativo (RIU). A coluna usada na quantificação foi eluída com H₂SO₄ 5 mM, a 65 °C e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. As concentrações de glicose, ácidos orgânicos e etanol foram obtidos pela regressão linear de padrões externos e pela integração dos picos de cada substância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em função de pH e temperatura

A levedura UFV-3 em cultura foi observada sob microscopia ótica revelando-se grupos de células em estágio de brotamento e com formato elipsoidal (Figura 1). Os efeitos da temperatura e do pH na cinética de crescimento da levedura UFV-3 foram determinados pela variação da velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) (Figura 2). Observa-se que 28 °C foi a temperatura estudada que apresentou os menores valores de μ . No cultivo a 40 °C observou-se os maiores valores da μ e de massa celular (Figura 2 e 3). Esta condição apresentou diferenças significativas tanto para a μ , quanto de massa celular, comparado ao cultivo a 35 °C. A μ a 40 °C, foi o dobro da μ obtida no cultivo a 35 °C. Quanto aos valores de pH de cultivo nenhum efeito significativo foram observado na μ , bem como para a produção de massa celular (Figura 2 e 3). A 45 °C é verificada queda significativa da μ comparado ao cultivo a 40 °C. Na Figura 4 está apresentado a variação da μ em função das temperaturas de cultivo em pH 4.7.

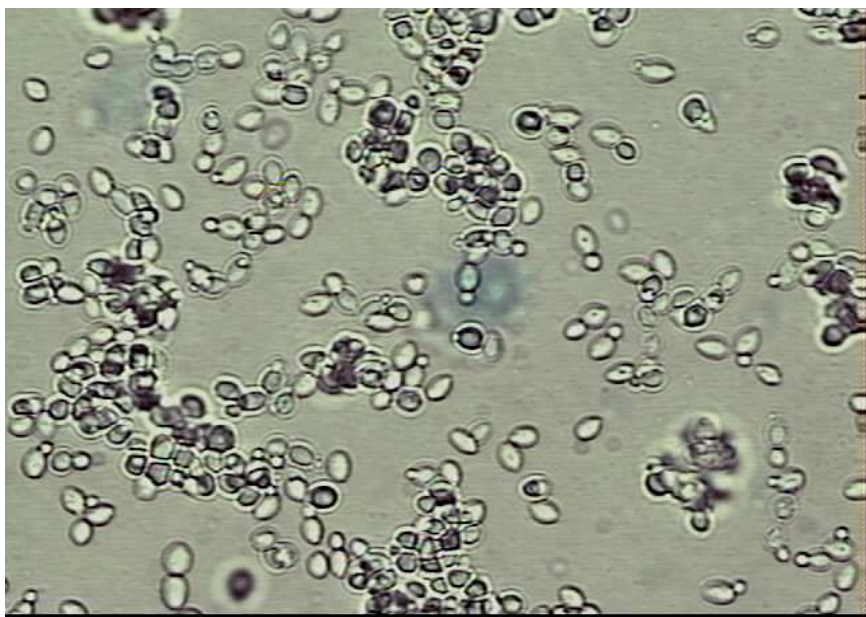


Figura 1. Micrografia da levedura UFV-3 em fase de crescimento exponencial tratadas com corante azul de metileno em microscópio Olympus BX40 com aumento de 400X.

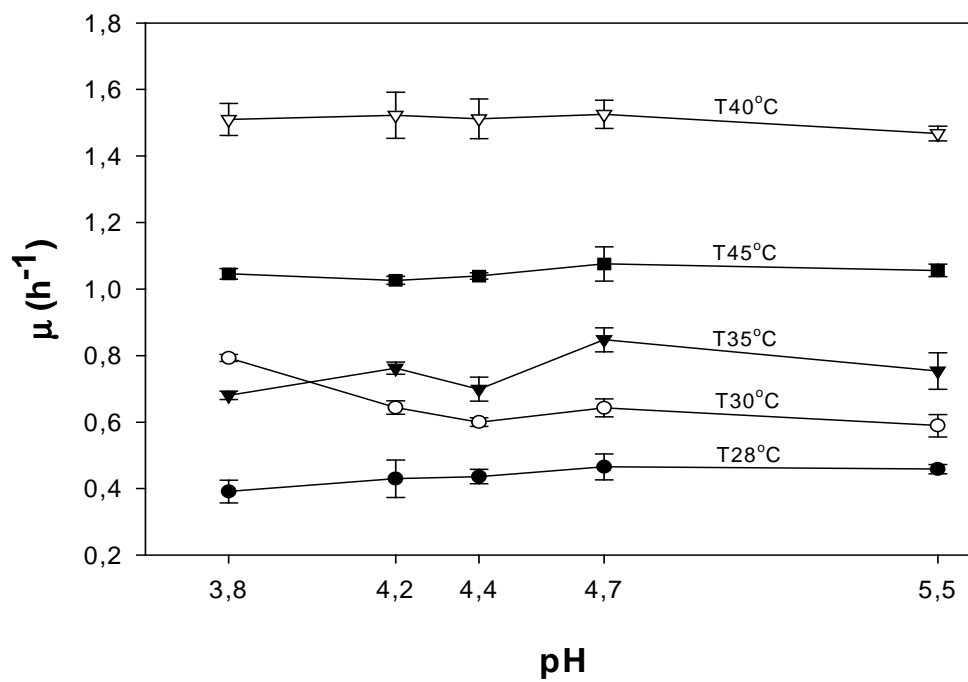


Figura 2. Efeito das diferentes condições de temperatura e de pH na velocidade específica de crescimento μ (h⁻¹) da levedura UFV-3.

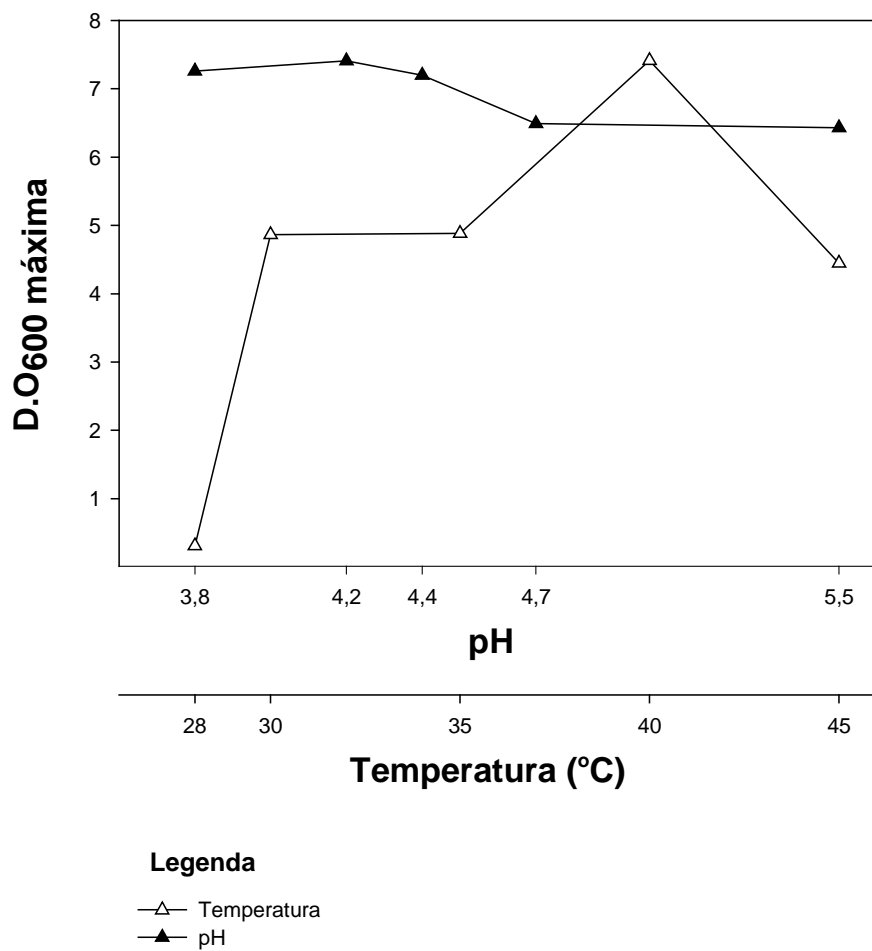


Figura 3. Densidade celular máxima da levedura UFV-3 em diferentes condições de temperatura e pH em meio YPD.

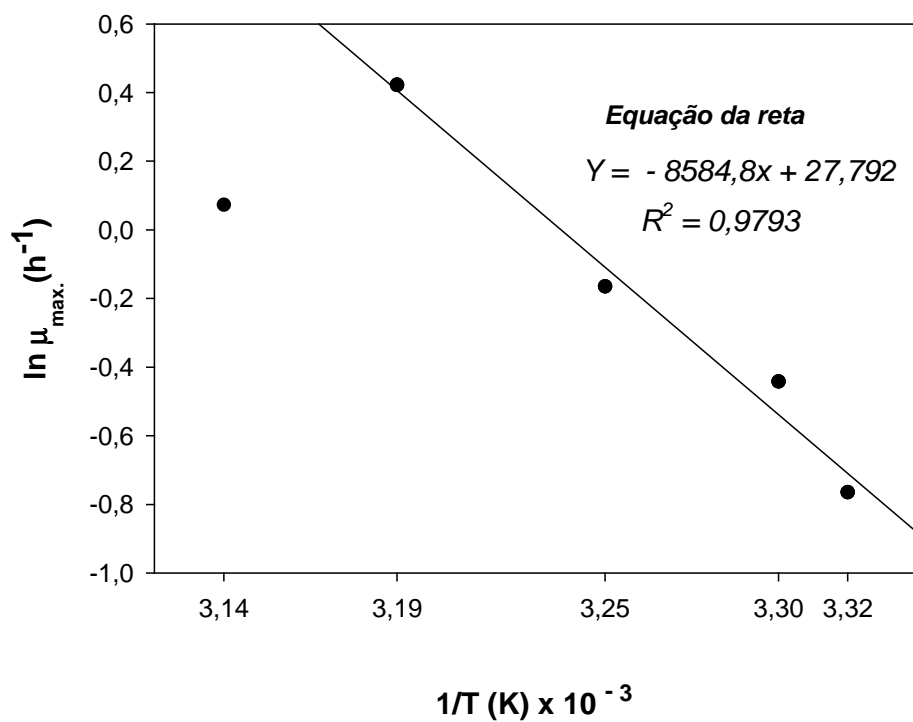


Figura 4. Efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento da levedura UFV-3 em meio YPD com pH 4.7 em incubador rotativo a 160 rpm.

A variação da velocidade específica de crescimento com a temperatura pode ser descrita de acordo com a *equação de Arrhenius*. Neste modelo é esperado um aumento exponencial da μ dentro da faixa de linearidade. Com o logaritmo natural da equação é possível obter a energia de ativação.

Assim,

$$\ln \mu = \ln \mu_0 - E/R * 1/T$$

$\ln \mu$ vs $1/T$, temos:

(- E/R), inclinação = - 8584,8 K^{-1}

(R), constante dos gases em $J = 8,3144 J K^{-1} gmol^{-1}$.

E = energia ativação

Portanto:

$$E = 8584,8 K (8,3144 J K^{-1} gmol^{-1}) = 71377,46 J gmol^{-1}.$$

$$E = 7,14 \times 10^4 KJ gmol^{-1}$$

Ajustando o modelo

$$\mu = \mu_0 e^{-E/RT}$$

Então,

$$\mu = 1,175 \times 10^{12} e^{-8584,8/T(K)}$$

A maior velocidade de crescimento e maior produção de massa celular a 40 °C, reflete o habitat natural de onde esta levedura foi isolada, isto é, microbiota intestinal, onde predomina temperaturas de 37 °C [23]. O desempenho a temperatura de 40 °C é uma importante condição que possibilita o uso dessa levedura UFV-3 como probiótico de animais, confirmando estudo anterior sobre sua adaptação às condições do trato digestivo animal [40]. A maioria das espécies de leveduras na natureza possui temperaturas ótimas de crescimento por volta de 30 °C. No entanto, algumas espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Cândida* tem sido reportadas em crescerem a 37 °C, uma característica importante para sobrevivência e colonização do probiótico no trato gastrointestinal de animais [10, 22, 01].

Os resultados sugerem o cultivo da levedura UFV-3 à temperatura de 40 °C. Como os valores de pH de cultivo não apresentaram diferenças significativas entre si, foi definida a condição de temperatura a 40 °C e o pH 4.7 para a avaliação do efeito da aeração sobre a produção de biomassa e metabolismo da levedura UFV-3.

5.2 Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em função da aeração

O efeito da aeração na cinética de crescimento da levedura UFV-3 foi realizado em três níveis de aeração: aerobiose, microaerobiose e anaerobiose, em meio YPD pH 4.7 a 40 °C. A concentração inicial de glicose nos três níveis de aeração foi aproximadamente 20 g.L⁻¹. A Figura 5 mostra a cinética de consumo de glicose e produção de biomassa nas culturas da levedura UFV-3 sob os três níveis de aeração. Observa-se que a cultura em anaerobiose gerou menor produção de biomassa (0,58 g.L⁻¹) concomitante menor consumo da glicose disponível, com concentração de glicose remanescente no meio de 8,418 g.L⁻¹ após 11 h de cultivo. Esse comportamento pode ser devido à deficiência de

substâncias no meio de cultivo cuja síntese pela levedura depende de oxigênio, como por exemplo ergosterol.

Leveduras são incapazes de crescerem otimamente na completa ausência de oxigênio sem que haja a presença de ergosterol. Isto porque além de sua importância como aceptores finais na respiração durante o crescimento aeróbico, o oxigênio é requerido também para a manutenção do crescimento e envolvidos na biosíntese de esterol e ácidos graxos insaturados. O ergosterol e o ácido oléico são requeridos por *Saccharomyces* para o crescimento em anaerobiose.

O cultivo em aerobiose proporcionou maior concentração de biomassa. Nesta condição, verificou-se a completa depleção da glicose disponível e uma produção de biomassa de 3,02 g.L⁻¹. Em microaerobiose verificou-se maior consumo de glicose, e biomassa de 2,22 g.L⁻¹, comparado com o cultivo em anaerobiose. Nesta condição verificou-se ao final de 11 h de cultivo, resíduos de glicose no meio. O baixo nível de oxigênio contribuiu para redução tanto da velocidade de consumo de glicose quanto da velocidade específica de crescimento comparado ao cultivo em aerobiose. O Quadro 1 mostra os parâmetros cinéticos obtidos da levedura UFV-3 cultivados nos três níveis de aeração. Verificou-se que o coeficiente rendimento celular obtido em anaerobiose (0,01 g.mmol⁻¹) foi duas vezes menor que em microaerobiose (0,02 g.mmol⁻¹). Em aerobiose o coeficiente de rendimento celular foi de 0,03 g.mmol⁻¹, representando o maior coeficiente de rendimento celular dos três níveis de aeração estudado.

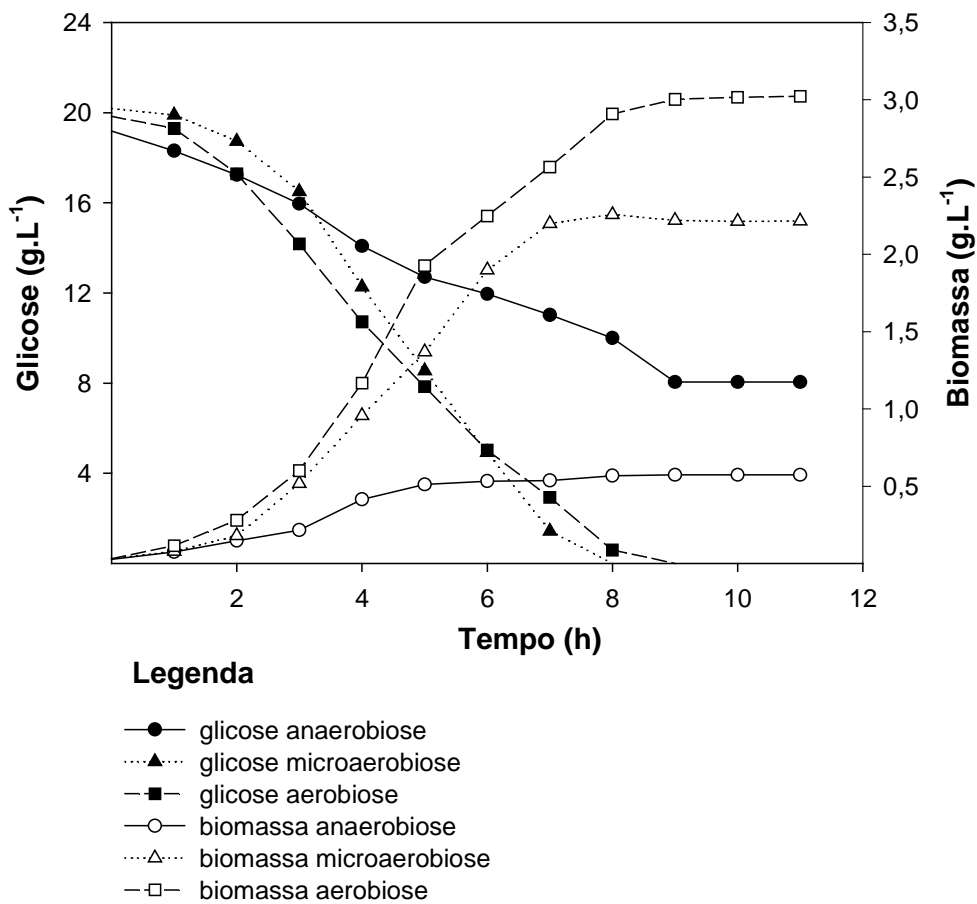
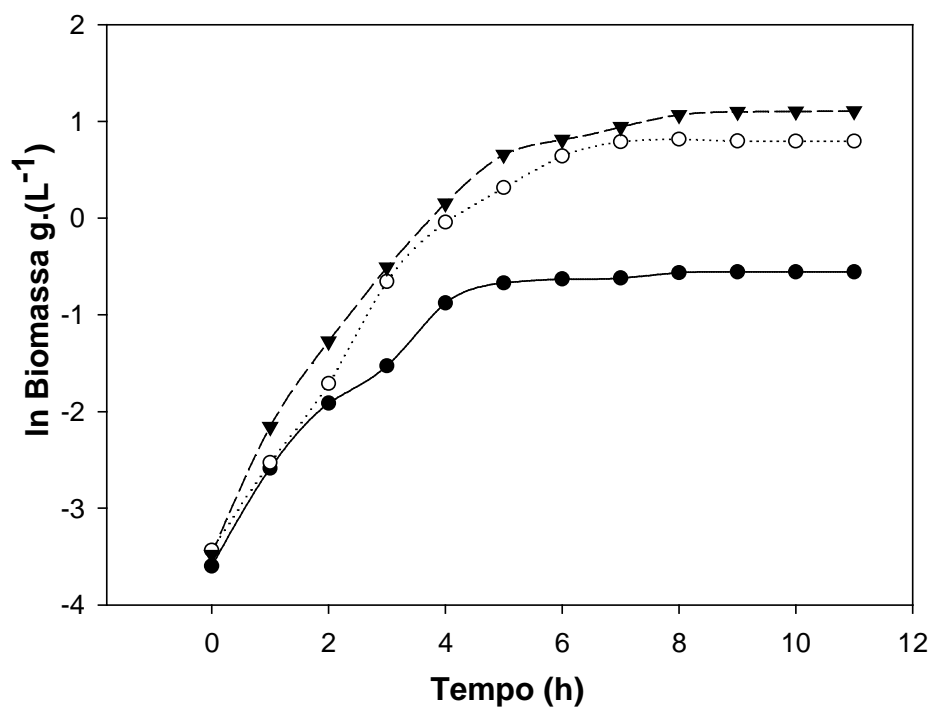


Figura 5 Consumo de glicose e produção de biomassa da levedura UFV-3 em meio YPD pH 4.7 a 40 °C em três níveis de aeração: aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

A cinética de crescimento da levedura UFV-3 nos três níveis de aeração é apresentada na Figura 6. Verifica-se que em todos os níveis a levedura UFV-3 alcançou crescimento exponencial após uma hora de cultivo. Dentre os níveis de aeração em estudo, o cultivo em aerobiose proporcionou fase de crescimento exponencial mais longa, 5 horas. A partir deste tempo, uma fase de desaceleração, seguida de uma fase estacionária que se prolonga até o final do cultivo, 11 horas. Neste nível de aeração, a velocidade específica de crescimento alcançou seu valor máximo $1,08 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ e biomassa máxima de $3,02 \text{ g.L}^{-1}$ (Quadro 1).

No cultivo em microaerobiose, observou-se fase de crescimento exponencial mais curta comparado ao cultivo em aerobiose, com uma duração de 3 horas aproximadamente e uma fase de desaceleração que se estendeu até 7 horas, com posterior fase estacionária até o final de cultivo, 11 horas. A velocidade máxima de crescimento foi de $0,91 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ e a biomassa máxima de $2,22 \text{ g.L}^{-1}$. Em anaerobiose, a duração da fase de crescimento exponencial foi de aproximadamente 4 horas com velocidade específica de $0,52 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ e biomassa máxima de $0,58 \text{ g.L}^{-1}$.

Em aerobiose a biomassa máxima foi alcançada quando não havia glicose disponível no meio (Figura 5). A partir de 5 horas de cultivo, a concentração de células presente possivelmente requeria concentrações maiores de glicose. A partir daí, é observado um crescimento celular proporcional à concentração de glicose disponível, culminando com 9 horas de cultivo, onde não é mais observado aumento de biomassa. Esse ponto coincide com a completa depleção de glicose do meio. No cultivo em microaerobiose o mesmo perfil ocorreu após 6 horas de cultivo, na qual a concentração de glicose já apresentava níveis de desproporcionalidade com a biomassa existente. Com estes resultados podemos observar que a levedura UFV-3 é capaz de realizar seu crescimento tanto na condição de aerobiose, quanto em baixa concentração de oxigênio (microaerobiose) ou ausência de oxigênio (anaerobiose) desde que nessa última condição haja suprimento adequado de ácidos graxos insaturados e esterol.



Legenda

- anaerobiose
- microaerobiose
- ▼- aerobiose

Figura 6. Cinética de crescimento da levedura UFV-3 em meio YPD pH 4.7 a 40 °C em três níveis de aeração: aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

Quadro 1. Parâmetros cinéticos da levedura UFV-3 em condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

$Y_{X/S}$ Coeficiente de rendimento celular em $g.mmol.L^{-1}$

$Y_{E/S}$ Coeficiente de rendimento do produto da conversão de glicose em etanol em $mmol.mmol^{-1}$

$Y_{G/S}$ Coeficiente de rendimento do produto da conversão de glicose em glicerol em $mmol.mmol^{-1}$

As médias seguidas por pelo uma mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

Condição de cultivo	Substrato Inicial (S ₀) (mmol.L ⁻¹)	Substrato Final (S) (mmol.L ⁻¹)	Biomassa (X) (g.L ⁻¹)	Etanol (E) (mmol.L ⁻¹)	Glicerol (G) (mmol.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$	$Y_{E/S}$	$Y_{G/S}$	$\mu(h^{-1})$
Anaerobiose	107	47	0.58	101	7	0.01	1.7	0.11	0.52 ^c
Microaerobiose	110	2.5	2.22	174	10	0.02	1.6	0.09	0.91 ^b
Aerobiose	110	0	3.02	120	11	0.03	1.1	0.10	1.08 ^a

Leveduras exibem vias de geração de energia anaeróbica (fermentação) e aeróbica (respiração). Algumas espécies do gênero *Rhodotorula* e *Cryptococcus* não têm habilidade de crescer em condições de anaerobiose estritas, portanto, realizam a respiração para a obtenção de energia. Leveduras do gênero *Schizosaccharomyces* apresentam respiração limitada, mas não cresce em condições de anaerobiose. No entanto, leveduras como *Torulopsis pintolopesii* que tem sido isolada de ambientes gastrointestinais realiza seu crescimento em condições de anaerobiose às custas da fermentação. *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida como microrganismo facultativo aeróbico, realiza a fermentação aeróbica e anaeróbica e possui habilidade de crescer em condições de anaerobiose estritas, desde que suprem no meio de cultura nutrientes como, esteróis e ácidos graxos insaturados [47].

No trabalho de Yamane et. al., [51], foi observado maior coeficiente de rendimento celular da levedura *Phaffia rhodozyma* na presença de oxigênio. Naquele trabalho foram analisados quatro níveis de oxigênio em mg.L⁻¹, (0, 2, 5 e 8). Verificou-se coeficiente de rendimento máximo de 0,51 g.g⁻¹ na concentração de 8 mg.L⁻¹ de oxigênio dissolvido. No entanto, em anaerobiose (0 mg.L⁻¹) a produção de biomassa foi de 4,8 g.L⁻¹ e um coeficiente de rendimento celular de 0,24 g.g⁻¹.

Furlan et. al., [19], estudou a influencia da condição de microaerobiose e aerobiose de cinco espécies de leveduras pertencentes aos gêneros, *Pichia*, *Pachysolen* e *Candida* no intuito de averiguar maior produção de etanol e xilitol. Observaram-se maiores coeficientes de rendimento celular em condições de aerobiose. Nesta condição obtiveram-se maiores coeficientes de rendimentos em *Candida parapsilosis* com 0,16 g.g⁻¹ e menores em *Candida shehatae* 0,10 g.g⁻¹. O cultivo de *Pichia stipitis* proporcionou coeficiente de rendimento de 0,14 g.g⁻¹. Em microaerobiose verificou-se máximo coeficiente de rendimento em *Cândida parapsilosis* e *Pachysolen tannophilus* com 0,10 g.g⁻¹. *Pichia stipitis* obteve coeficiente de rendimento de 0,09 g.g⁻¹.

Em trabalho semelhante Sahoo & Agarwal, [39], investigou a biosíntese de glicerol em cultivo de *Candida magnoliae* em aerobiose. O cultivo foi realizado a temperatura de 35 °C em meio composto de glicose, extrato de levedura e uréia em sistema de baletada, com fluxo de ar em 0,67 vvm e agitação a 500 rpm. A concentração inicial de glicose foi de 103 g.L⁻¹. Verificou depois de 96 horas de cultivo o consumo de 98,8 g.L⁻¹ de glicose gerando uma produção de biomassa em 17,7 g.L⁻¹ e coeficiente de rendimento celular de 0,172 g.g⁻¹.

5.2.1 Efeito da aeração na produção de etanol e glicerol

A preocupação em quantificar etanol e glicerol foi conhecer o metabolismo da levedura UFV-3. A cinética de produção de etanol e de glicerol em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose esta ilustrada na Figura 7. Observa-se que tanto em aerobiose, quanto em microaerobiose a produção de glicerol apresentou comportamento semelhante ao longo do cultivo, com diferenças apenas na produção final. Em aerobiose a produção final de glicerol foi 11 mmol.L⁻¹ e em microaerobiose de 10 mmol.L⁻¹. Em anaerobiose, a produção de glicerol foi menor dos três níveis de aeração, obtendo uma produção de 7 mmol.L⁻¹. No entanto, em termos de coeficiente de rendimento do produto da conversão de glicose em glicerol foram obtidos respectivamente 0.10 mmol.mmol⁻¹, 0.09 mmol.mmol⁻¹ e 0.11 mmol.mmol⁻¹ para as condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

A produção de etanol também foi diferente nos níveis de aeração estudado. Verificou-se que a condição de microaerobiose gerou a maior produção de etanol, alcançando produção de 174 mmol.L⁻¹. Em aerobiose a produção foi menor, 120 mmol.L⁻¹ e em anaerobiose observou-se a menor produção de etanol dentre os níveis de aeração, 101 mmol.L⁻¹ (Figura 6). Em termos de coeficiente de rendimento do produto da conversão de glicose em etanol foram obtidos

respectivamente $1.1 \text{ mmol.mmol}^{-1}$, $1.61 \text{ mmol.mmol}^{-1}$, $1.69 \text{ mmol.mmol}^{-1}$ para as condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

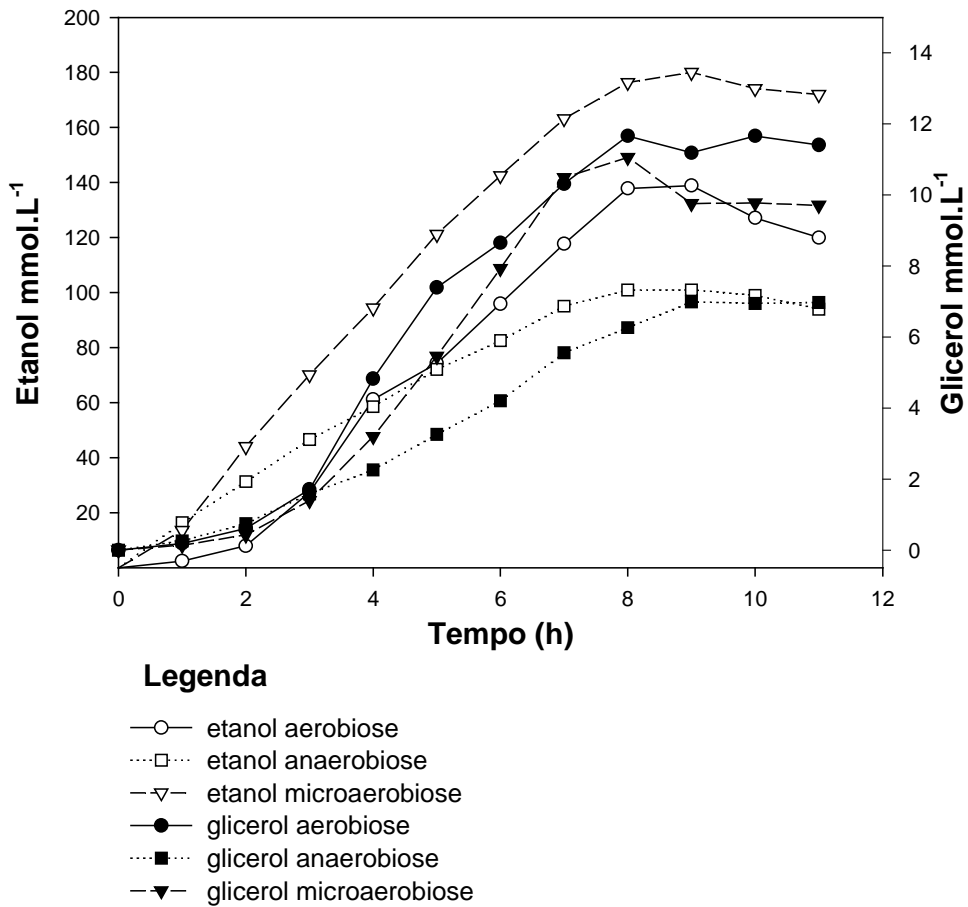


Figura 7. Produção de etanol e glicerol da levedura UFV-3 em meio YPD pH 4.7 a 40 °C em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose

A formação de glicerol e etanol é essencialmente requerida para manter o balanço redox de células metabolicamente ativas. A formação de etanol assegura a reoxidação de NADH formado e a oxidação de gliceraldeído-3-fosfato, considerando que sua produção origina do excesso de NADH gerado na assimilação do açúcar para a produção de biomassa [45].

A produção de etanol durante crescimento em açúcar por leveduras não convencionais não é tão importante como é em *Saccharomyces cerevisiae*, devido seu metabolismo predominante oxidativo. Por outro lado, etanol pode ser usado como fonte de carbono e fonte de energia por muitas leveduras. A produção ou a utilização de etanol é realizada devida ação da enzima álcool desidrogenases, enzimas que catalisa reversivelmente a redução de acetaldeído em etanol [16]. A produção de glicerol em leveduras ocorre no citossol através de intermediário da via glicolítica, dihidroxiacetona-fosfato em dois passos que são catalisados pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fosfatase respectivamente [49].

Furlan et. al., [19], estudou duas diferentes concentrações de oxigênio, microaerobiose e aerobiose, em cultivo de espécies de leveduras dos gêneros, *Pichia*, *Pachysolen* e *Cândida*. Verificou-se o maior coeficiente de rendimento de etanol no cultivo de *Pichia stipitis* em microaerobiose ($0,35 \text{ g.g}^{-1}$) e os menores coeficientes de rendimento nos cultivos de *Pachysolen tannophilus* e *Candida parapsilosis* com ambos coeficientes de rendimento de $0,21 \text{ g.g}^{-1}$. Em aerobiose o maior coeficiente de rendimento ($0,25 \text{ g.g}^{-1}$) em cultivo de *Pichia stipitis* e menor em *Pachysolen tannophilus* ($0,13 \text{ g.g}^{-1}$).

Sahoo & Agarwal [39], investigaram a biosíntese de glicerol em cultivo de *Candida magnoliae*, em condição de aerobiose, verificaram baixo coeficiente de rendimento de etanol de $0,025 \text{ g.g}^{-1}$ e maior coeficiente de rendimento de glicerol de $0,22 \text{ g.g}^{-1}$. Martin & Jonsson [29], verificaram coeficientes de rendimentos de etanol de $0,44 \text{ g.g}^{-1}$ e coeficiente de rendimento celular de $0,106 \text{ g.g}^{-1}$ em *Saccharomyces cerevisiae* em condição de anaerobiose. Observaram que o coeficiente de rendimento de etanol em *Zigosaccharomyces* foi de $0,21 \text{ g.g}^{-1}$ e coeficiente de rendimento celular de $0,083 \text{ g.g}^{-1}$.

5.2.2 Efeito da aeração na produção de ácidos orgânicos

O cultivo da levedura UFV-3 nos níveis de aeração de estudo apresentou traços de concentrações de metabólitos como, ácido succínico, ácido propiônico, ácido láctico importante como fonte energética para animais e que pode ser explorado para a formulação de prebiótico. A cinética de produção desses metabólitos estão ilustradas na Figura 8.

A produção dos metabólitos (ácido succínico, propiônico, láctico, etanol e glicerol) gerado nos três níveis de aeração estudado, possibilitou a determinação do balanço de carbono e o balanço redox. Verifica-se no Quadro 2 que dos 600 mmol.L⁻¹ de glicose usado em cultivo em microaerobiose 96 % foi usado como fonte de energia metabólica. O balanço redox nesta condição fecha com 0,98. Em aerobiose e anaerobiose esta conversão foi menor 76 % e 88 % respectivamente. O balanço redox tanto em aerobiose quanto em anaerobiose fecharam com 0,97. Como o cultivo em anaerobiose proporcionou a menor produção de biomassa dentre os níveis de estudo sugere-se que praticamente toda a glicose consumida nesta condição foi usada para produção de energia. Em aerobiose foi verificada a maior produção de biomassa dentre os estudos realizados. Portanto, sugere-se que a glicose disponível no meio foi usada tanto como fonte de energia quanto para fonte de carbono, confirmando a menor percentagem obtida pelo balanço de carbono.

Aproximadamente 70% dos ácidos orgânicos, incluindo malato e succínico, são produzidos por leveduras durante a fermentação. Succinato tem sido relatado como o principal ácido orgânico produzido por leveduras [02]. Em *Saccharomyces cerevisiae*, acredita-se que os ácidos orgânicos são sintetizados principalmente nas vias do ciclo do ácido tricarboxílico. No entanto, o mecanismo de produção desses ácidos orgânicos não tem sido completamente elucidado [28]. Wakai et al., [46], examinou o efeito da adição de vários ácidos orgânicos na produção de succinato em culturas de leveduras e concluiu que succinato é principalmente formado a partir da via de redução de malato e fumarato. Entretanto, Magarifuchi

et al., [28], construiu um mutante deficiente do gene *FUM1* que codifica a enzima fumarase que converte fumarato em malato. Verificaram-se a habilidade deste mutante para a produção de ácidos orgânicos. Baseado no acúmulo de fumarato presentes no meio de cultivo, sugeriu que a produção de malato e succinato possa ter sido a partir da via oxidativa do ciclo do ácido tricarboxílico.

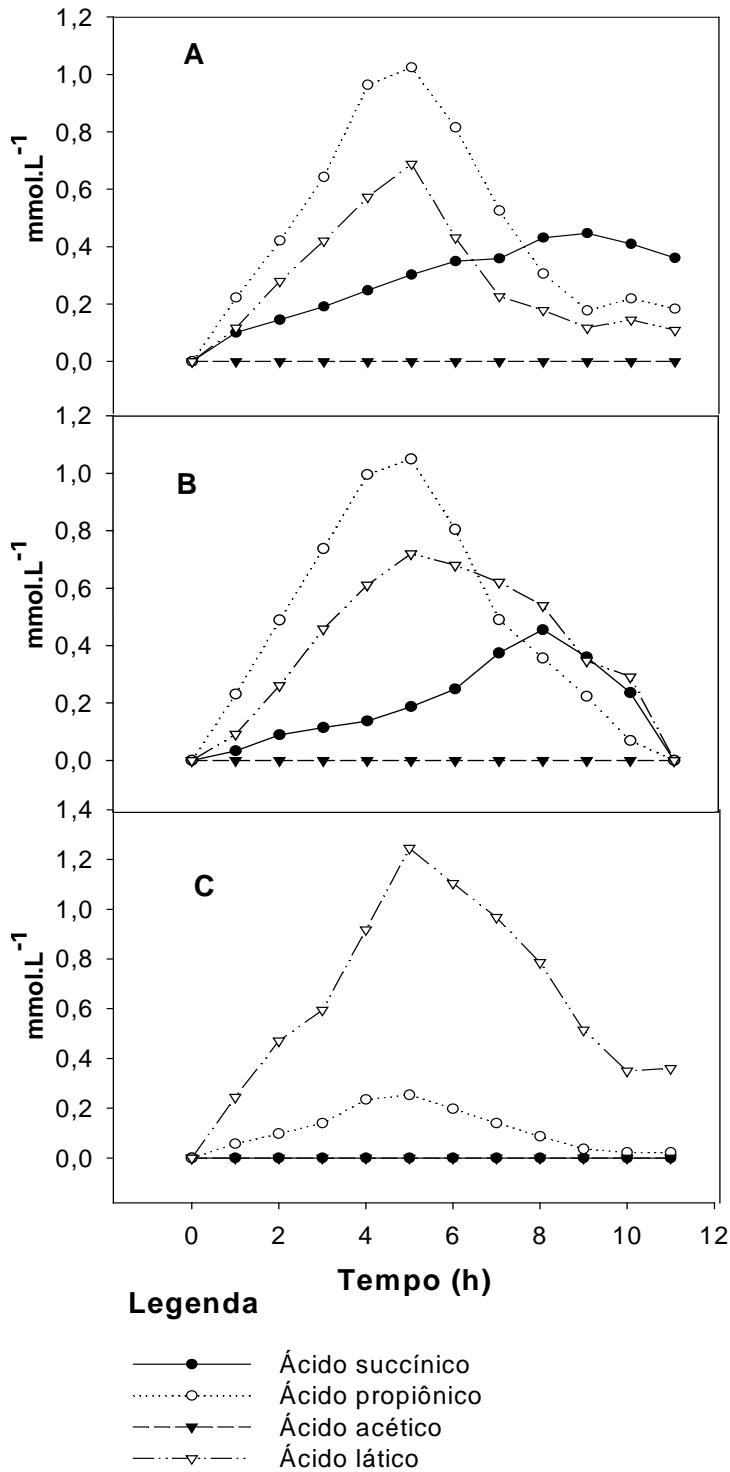


Figura 8. Produção de ácidos orgânicos da levedura UFV-3 em meio YPD com pH 4.7 a 40 °C. **(A)** produção de ácido propiônico, ácido succínico e ácido láctico em condição aeróbica. **(B)** produção de ácido propiônico, ácido succínico e ácido láctico em condição de microaerobiose. **(C)** produção de ácido propiônico, ácido succínico e ácido láctico em condição anaeróbica.

Quadro 2. Balanço de carbono e redox da levedura UFV-3 em meio YPD pH 4.7 a 40 °C em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

Condição de cultivo	Composto	Concentração mmol.L ⁻¹	Carbono mmol.L ⁻¹	Valor Oxidação	Produtos Oxidados	Produtos Reduzidos
Anaerobiose						
	Glicose	61,88	371,28	0		
	Lactato	0,51	1,53	0		
	Glicerol	6,98	20,94	-1		6,98
	Etanol	101,00	202,00	-2		202,00
	Succínico	0,00	0,00	+1	0,00	
	Propiônico	0,04	0,12	-1		0,04
	Acetato	0,00	0,00	0		
	CO ₂	101,00	101,00	+2	202,00	
	Soma Produtos		325,59		202	209

$$\text{Balanço carbono} = \frac{\text{mmol.L}^{-1} \text{ Produto}}{\text{mmol.L}^{-1} \text{ Glicose}} \times 100$$

$$\text{Balanço carbono} = \frac{326 \text{ mmol.L}^{-1}}{371 \text{ mmol.L}^{-1}} = 88\%$$

$$\text{Oxi - redução} = \frac{\text{oxidados Produto}}{\text{reduzidos Produto}}$$

$$\text{Oxi - redução} = \frac{202}{209} = 0,97$$

Condição de cultivo	Composto	Concentração mmol.L ⁻¹	Carbono mmol.L ⁻¹	Valor Oxidação	Produtos Oxidados	Produtos Reduzidos
Microaerobiose						
	Glicose	100,00	600,00	0		
	Lactato	0,35	1,05	0		
	Glicerol	9,75	29,25	-1		9,75
	Etanol	179,98	359,96	-2		359,96
	Succínico	0,36	1,44	+1	0,36	
	Propiônico	0,22	0,66	-1		0,22
	Acetato	0,00	0,00	0		
	CO ₂	180,34	180,34	+2	360,68	
	Soma produtos		572,70		361	370

$$\text{Balanço carbono} = \frac{573 \text{ mmol.L}^{-1}}{600 \text{ mmol.L}^{-1}} = 96\%$$

$$\text{Oxi - redução} = \frac{361}{370} = 0,98$$

Condição de cultivo	Composto	Concentração mM	Carbono mM	Valor Oxidação	Produtos Oxidados	Produtos Reduzidos
Aerobiose						
	Glicose	100,00	600,00	0		
	Lactato	0,12	0,36	0		
	Glicerol	11,19	33,57	-1		11,19
	Etanol	138,88	277,76	-2		277,76
	Succínico	0,44	1,76	+1	0,44	
	Propiônico	0,18	0,54	-1		0,18
	Acetato	0,00	0,00	0		
	CO ₂	139,33	139,33	+2	278,66	
	Soma Produtos		453,32		279	289

$$\text{Balanço carbono} = \frac{453 \text{ mmol.L}^{-1}}{600 \text{ mmol.L}^{-1}} = 76\%$$

$$\text{Oxi - redução} = \frac{279}{289} = 0,97$$

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O cultivo da levedura UFV-3, isolada da microbiota intestinal de leitões sadios recém-nascidos, sob diferentes condições de temperaturas, pH e aeração, permitiu estabelecer as melhores condições de produção de biomassa como também o entendimento do seu metabolismo. Dentre as condições de temperatura e pH avaliados a levedura UFV-3 obteve-se maior velocidade específica de crescimento quando cultivados a 40 °C e pH 4.7. A temperatura de 40 °C é uma condição importante que possibilita o uso dessa levedura como probiótico de animais, uma vez que, a maioria dos microrganismos presentes da microbiota intestinal apresenta temperatura em torno de 37 °C, um indício para a sobrevivência e colonização como probiótico no trato digestivo de animais.

Quanto aos resultados correspondentes a cinética de crescimento e metabolismo em função da aeração, a levedura UFV-3 apresentou maior velocidade de crescimento, maior produção e rendimento do coeficiente celular na condição de aerobiose. Em microaerobiose a levedura UFV-3 gerou maior produção de biomassa do que em anaerobiose. Entretanto, sua produção foi menor quando comparado ao cultivo em aerobiose. O efeito da aeração no metabolismo foi verificado pela quantificação de metabólitos como etanol, glicerol, ácido propiônico, ácido láctico e ácido succínico nos três níveis de aeração de estudo. Verificou-se que a produção de etanol foi maior na condição de microaerobiose, entretanto, a condição de anaerobiose proporcionou o maior coeficiente de rendimento de etanol. A produção de glicerol foi maior no cultivo em aerobiose. Entretanto, na condição de anaerobiose também proporcionou o maior coeficiente de rendimento de glicerol nos níveis de aeração de estudo. Traços de

ácidos orgânicos como ácidos succínico, propiônico e láctico foram verificados. Entretanto, ácido acético não foi detectado em nenhum dos níveis de aeração de estudo.

Para produção de alta concentração celular seria ideal desenvolver o cultivo da levedura UFV-3 em diferentes concentrações de substrato. Devido potencialidades apresentadas quanto a produção de compostos como ácido propiônico e ácido succínico, a levedura UFV-3 poderia também ser avaliada a produção de tais compostos com a finalidade de ampliar o uso em ruminantes. Além disso, outros estudos podem ser desenvolvidos como uso em culturas mista, associando a levedura UFV-3 com culturas de bactérias celulolíticas presentes no rúmen, verificando sua influencia no crescimento bacteriano e nos níveis de metabólitos produzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGARWAL, N. et al. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for use as a microbial feed additive. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 270-273, 2000.
- [2] ARIKAWA, Y. et al. Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 87, n. 1, p. 28-36, 1999.
- [3] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA – ABIPECS. **Relatório anual 2001**. Disponível em www.abipecs.com.br. Acesso em: 23 jan. 2002.
- [4] BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. New York: McGraw Hill Book, 1986.
- [5] BARTHOLOMEW, W. H. et al. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations, mass transfer of oxygen in submerged fermentation of *Streptomyces griseus*. **Ind. Engineering Chem.**, v. 42, p. 1801-1809, 1950.
- [6] BEKAERT, H.; MOERMANS, R.; EECKHOUT, W. Influence d'une culture de levure vivante (Levucell SB₂) dans un aliment pour porcelets sevrés sur les performances zootechniques et sur la fréquence des diarrhées. **Ann. Zootech.**, v. 45, p. 369-376, 1996.
- [7] BRAUDE, R. Antibiotics in animal feeds in Great Britain. **J. Anim. Sci.**, v. 46, n. 5, p. 1425-1436, 1978.
- [8] BURKE, P. V. et al. Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 23, p. 14705-14712, 1997.
- [9] CASSEL, G. H. Task force urges broad program antimicrobial resistance. **ASM News**, v. 61, p. 116-120, 1995.
- [10] CHARTERIS, W. P. et al. Selective detections, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 35, n. 1, p. 1-27, 1997.
- [11] CHOMA, C. et al. Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 55, n. 1-3, p. 73-77, 2000.
- [12] DANN, H. M. et al. Effects of yeast culture *Saccharomyces cerevisiae*, on prepartum in take and postpartum in take and milk production of jersey cows. **J. Dairy Sci.**, v. 83, n. 1, p. 123-127. 2000.
- [13] DAWSON, K. A. Current and future role of yeast culture in animal production: a review of research over the last six year. In: Lyons T. P. (Ed). **Biotechnology in the Feed Industry**. Kentucky, Nicholasville: Alltech Technical, 1993. p. 269-291.

- [14] DUCLUZEAU, R.; GOUET, P.H.; WILLIAMS, P. E. V. Probiotics in ruminants. In: JOUANY, J. P. (Ed). **Rumen microbial metabolism and ruminant digestion**. France, Versailles: INRA, 191. p. 343-345.
- [15] FIEMS, L. O. The use of yeast in practical diets for ruminants. In: CASTANON, J. I. R. (Ed). **Microorganisms and Enzyme Preparations in Animal Nutrition**. Brussels: EC, Directorate-General for Agriculture, 1994. p. 159-173.
- [16] FLORES, C. L. et al. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeast. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 4, p. 507-529, 2000.
- [17] FOX, S. M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. **Vet. Med.**, v. 83, n. 8, p. 806-830, 1988.
- [18] FULLER, R. A review – probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.
- [19] FURLAN, S. A.; BOUILLOUD P.; CASTRO, H. F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeast. **Proc. Biochem.**, v. 29, p. 657 - 662, 1994.
- [20] HARESIGN, W., EWING, W. Review of probiotic products available in the UK. In: STARK, B. A.; WILKINSON, J. M. (Eds). **Probiotics – theory and Applications**. Marlow, UK: Chalcombe, 1989. p. 29-37.
- [21] JIN, L. Z. et al. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 27, n. 3, p. 183-185, 1998.
- [22] KENWORTHY, R. ; GRABB, W. E. The intestinal flora of young pigs with reference to early weaning, *Escherichia coli*, and scours. **J. Comp. Pathol.**, v. 73, p. 315-228, 1963.
- [23] KNARREBORG, A. et al. Establishment and application of a in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 99, p. 131-140, 2002.
- [24] KORNEGAY, E. T. et al. Performance and nutrient digestibility in weanling pigs as influenced by yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. **J. Anim. Sci.**, v. 73, n. 5, p. 1381-1389, 1995.
- [25] KUNIN, C. M. Resistance to antimicrobial drugs: A worldwide calamity. **Ann. Intern. Med.**, v. 118, n. 7, p. 557-561, 1993.
- [26] KURIYAMA, H.; KOBAYASHI, H. Effects of oxygen supply on yeast growth and metabolism in continuous fermentation. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 75, p. 364-367, 1993.
- [27] LESSARD, M.; BRISSON, G. J. Effect of a *Lactobacillus* fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaned pigs. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 67, p. 509-516, 1987.
- [28] MAGARIFUCHI, T. et al. Effect of yeast fumarase gene FUM1 disruption on production of malic, fumaric, and succinic acids in sake mash. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 80, n. 4, p. 355-361, 1995.
- [29] MARTÍN, C.; JONSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation, inhibitors. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 32, p. 386-395, 2003.

- [30] MARTIN, S. A.; NISBET, D. J. Effects of direct-fed microbial on rumen microbial fermentation. **J. Dairy Sci.**, v. 75, n. 6, p. 1736-1744, 1992.
- [31] MATHEW, A. G. et al. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 76, n. 8, p. 2138-2145, 1998.
- [32] MATHEW, A. G.; UPCHURCH, W. G.; CHATINN, S. E. Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms. **J. Anim. Sci.**, v. 76, n. 2, p. 429-434, 1998.
- [33] MCARTHUR, J. M., AND MILTIMORE, J. E. Rumen gas analysis gas solid chromatography. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 41, p. 187-192, 1962.
- [34] MONTES, A. J. The use of probiotics in food-animal practice. **Vet. Med.**, v. 88, n. 3, p. 282-288, 1993.
- [35] OFFER, N. W. Maximizing fiber digestion in the rumen: the role of yeast culture. In: LYONS, T. P. (Ed). **Biotechnology in the Feed Industry**. Kentucky, Nicholasville: Alltech Technical, 1990. p. 79-96.
- [36] POLLMANN, D. S.; DANIELSON, D. M.; PEO, E. R. J. Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 51, p. 577 - 581, 1980.
- [37] RATKOWSKY, D.A. et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **J. Bacteriol.**, v. 149, n. 1, p. 1-5, 1982.
- [38] ROSE, A. H. Yeast culture a microorganism for all species: a theoretical look at its mode action. In: LYONS, T. P. (Ed). **Biotechnology in the Feed Industry**. Kentucky, Nicholasville: Alltech Technical, 1987. p. 113-118.
- [39] SAHOO, D. K.; AGARWAL, G. P. An investigation on glycerol biosynthesis by osmophilic yeast in a bioreactor. **Proc. Biochem.**, v. 36, p. 839-846, 2001.
- [40] SANT'ANA, G. S. **Isolamento e caracterização de leveduras potencialmente probióticas**. 2002, 60 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- [41] SIEGELL, S. D., GADEN, E. I. J. Automatic control of dissolved oxygen levels in fermentations. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 4, p. 345-356, 1962.
- [42] TSAO, G. T. Simultaneous gas-liquid interfacial mass transfer and biochemical oxidation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 10, p. 765-785, 1968.
- [43] TSAO, G. T. The effect of carbonic anhydrase on carb-dioxide absorption. **Chem. Eng. Sci.**, v. 27, p. 1593-1600, 1972.
- [44] UETANABARO, A. P. T. **Seqüência e caracterização de região codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1999, 60 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- [45] VAN DIJKEN, J. P., AND SCHEFLERS, A. Redox balances in the metabolism of sugar by yeast. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 32, p. 199-224, 1986.

- [46] WAKAI, Y.; SHIMAZAKI, T.; HARA, S. Formation of succinate during fermentation of shake mash and grape must. **Hak-kokogaku**, v. 58, p. 363-368, 1980.
- [47] WALKER, G. M. Yeast metabolism. In: WALKER, G.M. **Yeast physiology and Biotechnology**. New York: John Wiley, 1998. p. 203-255.
- [48] WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Probiotics for ruminants. In: FULLER, Roy. **Probiotics: The Scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1992. p. 17-353.
- [49] WANG, Z. X. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, N. 3, p. 201-223, 2001.
- [50] WILLIAMS, P. E. V et al. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of sheep and steers. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 3016-3026, 1991.
- [51] YAMANE, Y. et al. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch culture: Kinetic and stoichiometric analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 11, p. 4471- 4478, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE – A

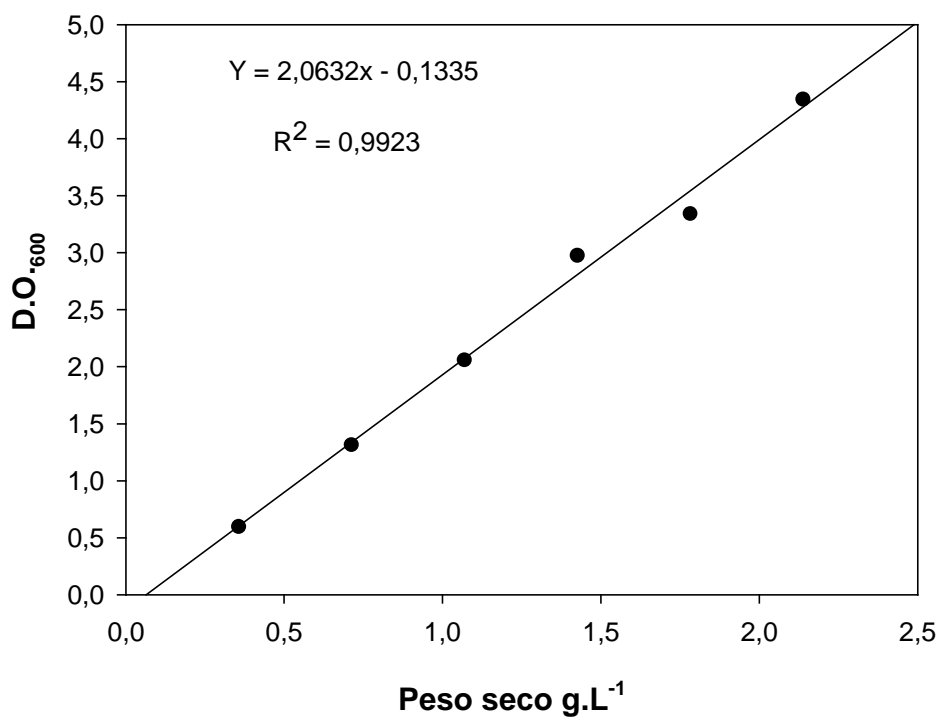


Figura 9 Correlação entre densidade ótica e o peso da matéria seca.

APÊNDICE – B

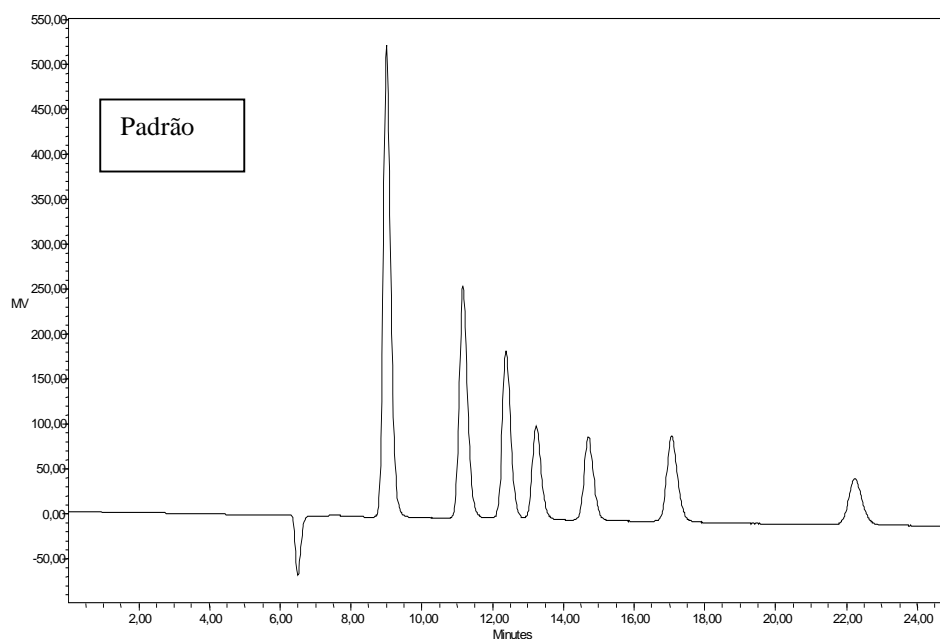


Figura 10 Cromatografia líquida de alto desempenho – HPLC. Amostras padrão das substâncias analisadas com tempo de retenção de 9,037min. para glicose, 11,182min. ácido succínico, 12,422min. ácido láctico, 13,258min glicerol, 14,483min. ácido acético, 16,777min. ácido propiônico e 22,244min etanol.

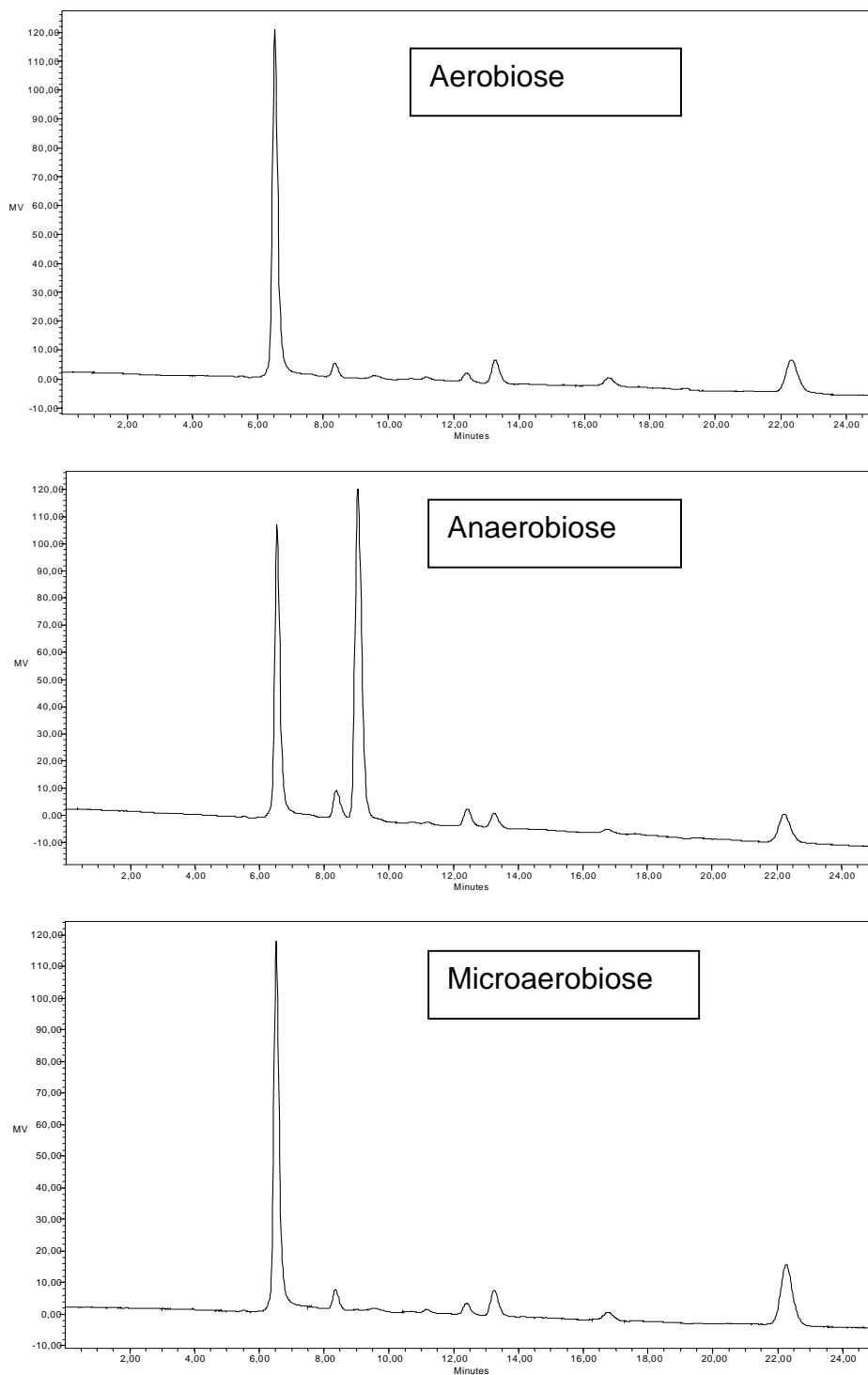


Figura 11 Cromatografia líquida de alto desempenho – HPLC. Amostras das substâncias analisadas com tempo de retenção de 9,037min. para glicose, 11,182min. ácido succínico, 12,422min. ácido láctico, 13,258min glicerol, 14,483min. ácido acético, 16,777min. ácido propiônico e 22,244min etanol.

APÊNDICE – C

Quadro 3. Produção de ácidos orgânicos em condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose em meio YPD pH 4,7 a 40°C.

<i>Condição de cultivo</i>	<i>Ácido succínico</i> mmol.L ⁻¹	<i>Ácido propiônico</i> mmol.L ⁻¹	<i>Ácido láctico</i> mmol.L ⁻¹	<i>Ácido acético</i> mmol.L ⁻¹	
<i>Aerobiose</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
	0,1009	0,2230	0,1167	0,0000	
	0,1455	0,4212	0,2796	0,0000	
	0,1914	0,6430	0,4204	0,0000	
	0,2479	0,9640	0,5731	0,0000	
	0,3023	1,0250	0,6889	0,0000	
	0,3496	0,8153	0,4315	0,0000	
	0,3588	0,5259	0,2269	0,0000	
	0,4315	0,3063	0,1787	0,0000	
	0,4470	0,1779	0,1176	0,0000	
	0,4100	0,2196	0,1454	0,0000	
	0,3610	0,1836	0,1093	0,0000	
	<i>Microaerobiose</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,0332		0,2309	0,0907	0,0000	
0,0890		0,4887	0,2602	0,0000	
0,1144		0,7376	0,4583	0,0000	
0,1370		0,9955	0,6102	0,0000	
0,1871		1,0495	0,7200	0,0000	
0,2486		0,8041	0,6800	0,0000	
0,3736		0,4899	0,6210	0,0000	
0,4548		0,3559	0,5389	0,0000	
0,3595		0,2231	0,3463	0,0000	
0,2359		0,0687	0,2907	0,0000	
<i>Anaerobiose</i>		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
		0,0000	0,0570	0,2444	0,0000
	0,0000	0,0980	0,4704	0,0000	
	0,0000	0,1400	0,5944	0,0000	
	0,0000	0,2350	0,9176	0,0000	
	0,0000	0,2540	1,2450	0,0000	
	0,0000	0,1980	1,1037	0,0000	
	0,0000	0,1400	0,9667	0,0000	
	0,0000	0,0870	0,7861	0,0000	
	0,0000	0,0360	0,5148	0,0000	
	0,0000	0,0220	0,3500	0,0000	
	0,0000	0,0220	0,3600	0,0000	

Quadro 4. Produção de etanol, glicerol e consumo de glicose em condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose em meio YPD pH 4,7 a 40° C.

<i>Condição de cultivo</i>	<i>Etanol</i> mmol.L ⁻¹	<i>Glicerol</i> mmol.L ⁻¹	<i>Glicose</i> mmol.L ⁻¹
<i>Aerobiose</i>	0,0000	9,0580e-6	20,1813
	2,4493	0,1875	19,8911
	7,9855	0,6123	18,7359
	27,4547	1,7074	16,4975
	61,1848	4,8279	12,2684
	74,3768	7,3922	8,5536
	95,9130	8,6504	4,9200
	117,7518	10,3134	1,4341
	137,8279	11,6631	0,0000
	138,8895	11,1875	0,0000
	127,1486	11,6658	0,0000
	119,9964	11,4040	0,0000
	<i>Microaerobiose</i>	0,0000	0,0000
13,5815		0,1377	19,2943
44,0670		0,4266	17,2927
70,1214		1,3904	14,1764
94,4185		3,1966	10,7221
121,1612		5,4583	7,8430
142,5127		7,9303	5,0228
163,1467		10,4882	2,9298
176,3152		11,0543	0,5964
179,9855		9,7554	0,0000
174,1449		9,7754	0,0000
172,0000		9,7100	0,0000
<i>Anaerobiose</i>		0,0000	0,0000
	16,3895	0,2600	18,3041
	31,3696	0,7482	17,2350
	46,5856	1,5861	15,9595
	58,5557	2,2591	14,0768
	72,1277	3,2545	12,7071
	82,5453	4,2056	11,9543
	95,1105	5,5562	11,0252
	100,9728	6,2645	10,0022
	101,0000	6,9855	8,0430
	99,0000	6,9500	8,0430
	94,0000	6,9700	8,0430