**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

ISABELA SILVEIRA FERREIRA

**Estudo da produção de etanol a partir de glicose
empregando a levedura termotolerante
Kluyveromyces marxianus NRRL Y-6860**

Lorena - SP

2013

ISABELA SILVEIRA FERREIRA

Estudo da produção de etanol a partir de glicose empregando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Inês Conceição Roberto

Versão Original

Lorena - SP

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Ferreira, Isabela Silveira

Estudo da produção de etanol a partir de glicose empregando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860/ Isabela Silveira Ferreira. – versão original – 2013.

102 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2013.

Orientadora: Inês Conceição Roberto

1. Etanol 2. Fermentação 3. *Kluyveromyces marxianus* 4. Glicose 5. Suplementação nutricional. I. Título. II. Roberto, Inês Conceição, orient.

663.14 - CDU

*Dedico esta dissertação aos meus heróis,
Sukarno Olavo Ferreira e Regina Fátima Silveira Ferreira.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

Aos meus pais, Sukarno Olavo Ferreira e Regina Fátima Silveira Ferreira, pelo amor incondicional, carinho, apoio e incentivo constante.

À Profa. Dra. Inês Conceição Roberto, pela orientação, pela dedicação, o comprometimento e esforço para a realização deste trabalho.

A toda minha família.

Aos meus fiéis e eternos amigos: André, Bárbara Sendy, Neesha, Isabelle, Fernanda, Felipe, Caroline, Daniela, Dayelle, Mayara, por fazerem parte da minha vida e por trazerem leveza aos meus dias, mesmo perto ou distantes.

Aos meus amigos de laboratório, Bárbara, Rafael, Bruno, Tulio, João, Dani e Isabela, que fizeram o trabalho ainda mais prazeroso e acima de tudo divertido.

A todos os amigos do Departamento de Biotecnologia pela troca de idéias e experiências, pelos momentos de confraternização e amizade.

A todos os professores, funcionários e alunos da Escola de Engenharia de Lorena, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

RESUMO

FERREIRA, I. S. **Estudo da produção de etanol a partir de glicose empregando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860**. 2013. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

O presente trabalho teve como principal objetivo estudar o desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860 em meio semissintético, contendo glicose como fonte de carbono. Numa primeira etapa, avaliou-se o efeito de diferentes temperaturas (35, 40, 43 e 45 °C), assim como o efeito inibitório do etanol adicionado ao meio (0, 15, 30, 45, 60g/L) sobre os parâmetros do bioprocesso. A partir da temperatura de cultivo selecionada foi então avaliado o efeito da suplementação nutricional e da concentração de inóculo sobre o perfil fermentativo desta linhagem. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio, 120 g/L de glicose, agitados a 100 rpm. Dentre as temperaturas avaliadas, os melhores resultados (consumo de 70% de glicose, produção de etanol de 38 g/L) foram obtidos a 43 °C, o que correspondeu a uma produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de 3,2 g/L.h e eficiência de 80%. Nesta temperatura, os resultados da adição de etanol em diferentes concentrações no início da fermentação revelaram que o aumento na concentração do álcool afetou negativamente a fermentabilidade de *K. marxianus*, constatando-se completa inibição quando foi adicionado 45 g/L de etanol. Posteriormente, avaliou-se o efeito dos nutrientes (KH_2PO_4 de 0,5 a 1,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 1,0 a 3,0 g/L; MgSO_4 de 0,1 a 0,5 g/L e extrato de levedura de 3,0 a 7,0 g/L) e da concentração inicial de células (de 1,0 a 5,0 g/L) sobre a produção de etanol pela levedura. Os ensaios foram realizados de acordo com um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , visando identificar e quantificar o efeito individual das variáveis experimentais e de suas interações sobre o bioprocesso, sendo avaliadas as respostas: máxima concentração de etanol e glicose consumida. Os resultados da análise estatística mostraram que a concentração inicial de células exerceu um efeito positivo sobre ambas as respostas, já o extrato de levedura apresentou um efeito negativo, enquanto que o KH_2PO_4 proporcionou um efeito positivo somente sobre a concentração máxima de etanol, ao nível de 90% de confiança. A análise estatística também revelou que os efeitos de interação entre as variáveis não foram significativas. Com base nestes resultados, concluiu-se que o desempenho fermentativo de *K. marxianus* NRRL Y-6860, a 43 °C, foi favorecido após estudo da composição nutricional e da concentração de inóculo, com aumento de 19, 24, 25 e 16% sobre o consumo de glicose, produção de etanol, Q_P e eficiência do processo, respectivamente, quando comparados aos resultados obtidos na primeira etapa do trabalho. Além disso, com os ensaios do planejamento foi possível reduzir o nível de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 e extrato de levedura.

Palavras-chave: Etanol. Fermentação. *Kluyveromyces marxianus*. Glicose. Suplementação Nutricional.

ABSTRACT

FERREIRA, I. S. Study of ethanol production from glucose using a thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y- 6860 . 2013. 102 p . Thesis (M.Sc.) - School of Engineering of Lorena , University of São Paulo , Lorena , 2013.

In the present work the fermentation performance of the yeast *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y- 6860 in semi-synthetic medium containing glucose as carbon source was investigated. Initially, it was assessed the effect of different temperatures (35, 40, 43 and 45 °C) and the degree of ethanol toxicity (0, 15, 30 , 45, 60 g/L) on the bioprocess parameters . From the selected temperature, it was then evaluated the effect of nutritional supplementation and inoculum concentration on the fermentation profile of this yeast. Fermentations assays were conducted in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of medium, 120 g/L glucose, at 100 rpm agitation speed. Among all temperatures evaluated the best results (70% consumption of glucose, 40 g/L of ethanol) were obtained at 43 °C, corresponding to volumetric ethanol productivity (Q_P) of 3.2 g/L.h and 80% efficiency. The results of ethanol toxicity in the fermentation at 43 °C, showed that increasing alcohol concentration decreased the fermentability of *K. marxianus*, being observed a complete inhibition when 45 g/L of ethanol was added in the medium. Afterward, the effect of nutrients (KH_2PO_4 0.5 to 1.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ from 1.0 to 3.0 g/L, MgSO_4 from 0.1 to 0.5 g/L yeast extract and 3.0 to 7.0 g/L) and the initial concentration of cells (1.0 to 5.0 g/L) on the ethanol production by *K. marxianus* was investigated. The assays were performed according to a fractional factorial design 2^{5-1} , to identify and quantify the individual variables effects and their interactions on the bioprocess. The statistical analysis results showed that the initial cell concentrations had a positive effect on maximum ethanol concentration and consumed glucose. On the other hand, yeast extract had negative effect, while KH_2PO_4 concentration provided a positive effect only on the ethanol maximum concentration, at 90% confidence level. Statistical analysis also revealed that the interaction effects between variables were not significant. Based on these results, it was concluded that the fermentation performance of *K. marxianus* NRRL Y-6860, at 43 ° C, was favored after study the nutritional composition and inoculum concentration, since increased 19, 25, 25 and 16% of glucose consumption, ethanol production, Q_P and process efficiency, respectively, when compared to results obtained in the first phase of the present work. Furthermore, with the experimental design was possible to reduce the level of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 and yeast extract.

Keywords: Ethanol. Fermentation. *Kluyveromyces marxianus*. Glucose. Nutritional supplementation.

Lista de Figuras

- Figura 2.1** - Análise filogenética do gênero *Kluyveromyces* (KURTZMAN et al. 2003, adaptado por LANE; MORRISSEY, 2010). _____ **20**
- Figura 2.2** – As duas fases da glicólise, fase preparatória e fase de pagamento (LEHNINGER et al, 2011) _____ **24**
- Figura 2.3** – Fermentação alcoólica, um dos destinos do piruvato em condições anaeróbias ou de hipoxia (NELSON e COX, 2011). _____ **25**
- Figura 2.4** – Respostas fisiológicas adaptativas da levedura ao etanol _____ **39**
- Figura 5.1** – Valores de absorbância a 600nm em função da concentração celular de *K. marxianus* cultivadas em diferentes temperaturas. _____ **51**
- Figura 5.2** - Concentração celular em função do tempo no crescimento do inóculo de *K. marxianus* NRRL Y – 6860 para cada temperatura avaliada. _____ **53**
- Figura 5.3** – Valores de $\ln X/X_0$ em função do tempo de cultivo de *K. marxianus* NRRL Y-6860 em diferentes temperaturas. _____ **54**
- Figura 5.4** – Valores de $\mu_{\text{máx.}}$ e produtividade celular (Q_x) do crescimento de *K. marxianus* NRRL Y-6860 em temperaturas testadas para o crescimento do inóculo, em meio contendo 30 g/L de glicose. _____ **55**
- Figura 5.5** - Concentração celular em função do tempo de fermentações para cada temperatura avaliada de *K. marxianus* NRRL Y – 6860. _____ **57**
- Figura 5.6** - Velocidade máxima de crescimento específico e produtividade celular em função da temperatura em fermentações com concentração inicial de 120 g/L de glicose. _____ **58**
- Figura 5.7** - Concentração de glicose em função do tempo para cada temperatura avaliada. _____ **59**

Figura 5.8 - Concentração de etanol em função do tempo de fermentações para cada temperatura avaliada. _____ **60**

Figura 5.9 - Produtividade volumétrica em etanol em função da temperatura. ____ **61**

Figura 5.10 – Parâmetros fermentativos das diferentes temperaturas nas fermentações conduzidas com *K. marxianus*. _____ **62**

Figura 5.11 Concentração de celular em função do tempo de fermentações da linhagem de *K. marxianus* NRRL Y – 6860 na presença de diferentes concentrações iniciais de etanol a 43 e 45 °C, A e B, respectivamente. _____ **65**

Figura 5.12 - Valores de velocidade específica máxima de crescimento de *Kluyveromyces marxianus* em função do etanol adicionado ao meio de fermentação contendo 120 g/L de glicose a 43 e 45 °C. _____ **67**

Figura 5.13 Concentração de glicose em função do tempo de fermentações de *K. marxianus* NRRL Y – 6860, na presença de diferentes concentrações iniciais de etanol, a 43 e 45 °C, A e B, respectivamente _____ **68**

Figura 5.14 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentações de *K. marxianus* NRRL Y – 6860, na presença de diferentes concentrações iniciais de etanol, a 43 e 45 ° C, A e B, respectivamente. _____ **70**

Figura 5.15 - Produtividade em função da concentração de etanol adicionado a 43 e 45°C. _____ **71**

Figura 5.16 - Consumo de glicose nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético nas condições dos diferentes ensaios do planejamento experimental, onde: (A) são os tratamentos realizados com 3,0 g/L; (B) são os tratamentos realizados com 7,0 g/L de extrato de levedura. _____ **75**

Figura 5.17 – Médias do consumo de glicose nos diferentes níveis das variáveis estudadas nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético. _____ **77**

Figura 5.18 – Produção de etanol nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético nas condições dos diferentes ensaios do planejamento experimental, onde: (A) são os tratamentos realizados com 3,0 g/L; (B) são os tratamentos realizados com 7,0 g/L de extrato de levedura. _____ **79**

Figura 5.19 – Médias da produção de etanol nos diferentes níveis das variáveis estudadas nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético. _____ **81**

Figura 5.20 – Produtividade volumétrica em etanol com o percentual de açúcar consumido em cada ensaio (a) e fator de conversão de substrato em produto (b), observados nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético nas condições dos diferentes ensaios do planejamento experimental. _____ **83**

Figura 5.21 - Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 90% de confiança e erro puro com 4 graus de liberdade para a glicose consumida. ____ **87**

Figura 5.22 - Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 90% de confiança e erro puro com 4 graus de liberdade para a produção de etanol. ____ **88**

Figura 5.23 - Comparação do perfil de consumo de glicose (A) e perfil de produção de etanol (B) antes e após análise do planejamento. _____ **90**

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Temperaturas de crescimento de <i>K. marxianus</i> em meio contendo glicose como fonte de carbono. _____	21
Tabela 2.2 - Resumo das principais aplicações industriais de <i>K. marxianus</i> (Adaptado de LANE, MORRISSEY, 2010). _____	22
Tabela 2.3 - Produção de etanol e eficiência de diferentes cepas de <i>K. marxianus</i> cultivadas em temperatura de 45 °C, com 150 g/L de glicose como fonte de carbono, adaptada de ANDERSON et al. 1986. _____	27
Tabela 2.4 - Principais efeitos do etanol na levedura adaptada de Walker (1998). _____	38
Tabela 4.1 - Composição do meio complexo para o cultivo do inóculo _____	43
Tabela 4.2 - Níveis reais dos fatores. _____	46
Tabela 4.3 – Matriz do planejamento experimental para avaliação do efeito da variação nutricional, segundo o planejamento fatorial 2^{5-1} , com pontos intermediários. _____	47
Tabela 5.1 - Equações correspondentes aos ajustes lineares dos dados em cada temperatura _____	52
Tabela 5.2 - Equações dos ajustes lineares dos dados e as velocidades de crescimento específico máxima obtidas nas diferentes temperaturas avaliadas. _____	54
Tabela 5.3 - Velocidade específica máxima de crescimento e produtividade celular da levedura <i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860 em diferentes temperaturas de fermentação. _____	57
Tabela 5.4 - Resumo dos parâmetros fermentativos nas diferentes temperaturas das fermentações conduzidas com <i>K. marxianus</i> . _____	62
Tabela 5.5 - Velocidade de crescimento específico máximo na fermentação em diferentes concentrações de etanol a 43 e 45 °C _____	66

Tabelas 5.6 - Resumo dos parâmetros cinéticos das fermentações conduzidas nas diferentes concentrações iniciais de etanol avaliadas com *K. marxianus*.____ **72**

Tabela 5.7 - Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , para avaliação do efeito do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , extrato de levedura e da concentração inicial de células em meio semissintético sobre a produção de etanol, glicose consumida por *K. marxianus* NRRL Y-6860. _____ **85**

Tabela 5.8 - Análise de variância com erro total para os principais efeitos e suas interações, durante a fermentação, sob diferentes condições de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1), KH_2PO_4 (2), MgSO_4 (3), extrato de levedura (4) e da concentração inicial de células (5) em meio semissintético sobre a glicose consumida, por *K. marxianus* NRRL Y-6860. _____ **87**

Tabela 5.9 - Análise de variância com erro total para os principais efeitos e suas interações, durante a fermentação, sob diferentes condições de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1), KH_2PO_4 (2), MgSO_4 (3), extrato de levedura (4) e da concentração inicial de células (5) em meio semisintético sobre a produção de etanol, por *K. marxianus* NRRL Y-6860. _____ **88**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	19
2.2 Produção de etanol a partir de glicose: Aspectos Gerais da Fermentação	23
2.3 Fatores que influenciam na fermentação de <i>K. marxianus</i>	25
2.3.1 Fatores Ambientais	25
2.3.2 Fatores Nutricionais	32
2.3.3 Outros Fatores	37
2.3.3.1 Etanol	37
2.3.3.2 Concentração Inicial de Células	40
3. OBJETIVO	42
3.1 Objetivos Específicos	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Microrganismo	43
4.2 Efeito da temperatura sobre o cultivo do inóculo de <i>K. marxianus</i>	43
4.3 Efeito da temperatura no perfil fermentativo de <i>K. marxianus</i>	44
4.4 Curva de calibração para determinação da concentração celular	44
4.5 Efeito da adição de etanol sobre o perfil fermentativo de <i>K. marxianus</i>	45
4.6 Efeito das condições nutricionais e do nível de inóculo sobre a produção de etanol por <i>K. marxianus</i>	45
4.7 Acompanhamento analítico dos experimentos	48
4.7.1 Determinação da concentração celular de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	48

4.7.2	Determinação dos teores dos açúcares etanol	48
4.7.3	Determinação de pH	48
4.8	Metodologia de análise dos resultados	48
4.8.1	Determinação dos parâmetros fermentativos	48
4.8.2	Análise estatística	50
5.	RESULTADOS	51
5.1.	Curva de calibração para determinação da concentração celular em diferentes temperaturas	51
5.2.	Efeito da temperatura no crescimento e na produção de etanol por <i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860	52
5.2.1.	Efeito da temperatura no crescimento do inóculo de <i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860	53
5.2.2.	Efeito da temperatura na produção de etanol por <i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860	56
5.3	Efeito da adição de etanol sobre o perfil fermentativo de <i>K. marxianus</i> a 43 e 45 °C.	64
5.4.	Efeito das condições nutricionais e do nível de inóculo sobre a produção de etanol por <i>K. marxianus</i>	74
5.4.1	Análise estatística	84
6.	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

Dentre as leveduras não convencionais (ou “não *Saccharomyces*”) com potencial para produção de etanol encontram-se aquelas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces*, em particular a espécie *K. marxianus*, devido a sua termotolerância e elevada taxa de crescimento. Esta levedura apresenta um dos melhores desempenhos em relação ao crescimento e fermentação em altas temperaturas, com capacidade de crescer em até 52 °C.

O etanol é um importante produto metabólico da fermentação de leveduras, no entanto, dependendo da concentração acumulada durante o processo, esse metabólito pode promover estresse químico nas células de levedura. Este álcool é um composto produzido principalmente por processos fermentativos bem estabelecidos a partir de materiais sacaríneos e amiláceos utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, como agente do processo. No entanto, o desenvolvimento de tecnologias de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica tem sido um dos principais desafios atuais na área de biocombustíveis, em que as frações açucaradas (celulose e hemicelulose), que constituem até 70% deste material. Estas biomassas requerem etapas complexas para a obtenção e utilização dos monossacarídeos, quando comparadas aos materiais sacaríneos e amiláceos, onde são necessárias quatro etapas: pré-tratamento; sacarificação; fermentação e destilação. Especificamente, para a fermentação da fração celulósica (rica em glicose) existem duas diferentes estratégias de processo. Na primeira, hidrólise e fermentação são realizadas separadamente, enquanto que na segunda, estas etapas são conduzidas simultaneamente.

A termotolerância faz com que *K. marxianus* seja um micro-organismo com potencial para utilização em processos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) de materiais lignocelulósicos. Neste processo, a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação de açúcares monoméricos são realizadas em uma única etapa, o que apresenta a vantagem de reduzir a inibição do complexo enzimático pela glicose formada. No entanto, este método também apresenta um importante desafio, que é combinar a temperatura ótima requerida para ambas as etapas. Na hidrólise enzimática, as enzimas celulolíticas apresentam melhor rendimento na faixa de 45-50 °C, enquanto que os micro-organismos usualmente empregados

na fermentação atuam na faixa de 30 a 37 °C. Desta forma, seria vantajoso utilizar um micro-organismo, como *K. marxianus*, para a fermentação em SSF, uma vez que tem capacidade de crescer e fermentar com bons rendimentos e produtividades em temperaturas acima de 40 °C.

Além disso, para o crescimento de uma levedura, sua necessidade nutricional deve ser suprida, através da formulação de um meio de cultivo adequado de acordo com cada espécie, visando melhorar o rendimento e produtividade do bioprocesso. A falta de nutrientes pode ocasionar baixos valores de velocidade de crescimento e produtividade e até mesmo a perda de viabilidade celular. O excesso de nutrientes, por outro lado, pode prejudicar o cultivo dos micro-organismos. Portanto, tornam-se necessários estudos para definir a melhor concentração ao formular o meio.

Para o estabelecimento de condições que permitam melhorar o desempenho fermentativo da levedura, é necessário o estudo de fatores ambientais e nutricionais que interferem neste bioprocesso. No presente trabalho foi avaliado a influência da temperatura, do efeito inibitório do etanol, dos fatores nutricionais e da concentração celular inicial no desempenho fermentativo da linhagem *K. marxianus* NRRL Y-6860, utilizando meios semissintéticos, contendo glicose como fonte de carbono. Esta proposta se insere no programa de pesquisa do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Kluyveromyces marxianus*

O gênero *Kluyveromyces* foi assim classificado em 1965, englobando logo após a sua criação, várias espécies que pertenciam ao gênero *Saccharomyces* (VAN DER WALT, 1965). As características utilizadas para unificar os gêneros foram a ausência do ascósporo e a presença de fermentação vigorosa.

Kurtzman et al. (2001) determinaram as afinidades do novo gênero (*Kluyveromyces*), tendo em vista as considerações moleculares, fisiológicas, ecológicas e biotecnológicas, e constataram que o mesmo apresentava seis espécies. Baseado na análise de Kurtzman et al (2001), Lane e Morrissey (2010) apresentaram, de forma resumida, a análise filogenética realizada por Kurtzman et al. em 2003, e ainda compararam os dados de velocidade de crescimento, fermentação de glicose e a temperatura máxima de crescimento, conforme a Figura 2.1.

K. marxianus foi isolada a partir de uvas, descrita como *Saccharomyces marxianus* por Hansen em 1888, e passou a ser classificada como *Kluyveromyces marxianus* em 1965 (LACHANCE, 1998). *K. marxianus* possui ascos que não são inclusos em corpo de frutificação (ascocarporos), sendo classificadas como hemiascomicetos, subclasse dos Ascomicetos. Os esporos dessa espécie são formados a partir de um único esporo ou de células haplóides, dessa forma, a espécie se classifica como homotática, são facultativamente auto-férteis (FLEET; MIAN, 1987).

K. marxianus são leveduras normalmente encontradas em produtos lácteos, bem como em bebidas fermentadas, frutos, insetos, efluentes de indústria açucareira, entre outros; a diversidade de *habitats* faz com que a espécie apresente uma ampla diversidade metabólica (LACHANCE, 1998). Esta espécie possui a capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares, tais como glicose, sacarose, rafinose, inulina e lactose, e apresenta elevada capacidade de conversão de substrato em biomassa (BELLAYER et al., 2004; FONSECA et al., 2008) e a maior velocidade específica de crescimento entre os eucariontes (GROENEVELD et al. 2009).

Figura 2.1 - Análise filogenética do gênero *Kluyveromyces* (KURTZMAN et al. 2003, adaptado por LANE; MORRISSEY, 2010).

Por outro lado, a espécie *K. marxianus* apresenta baixo rendimento fermentativo em ambientes aeróbios com elevadas concentrações de glicose, sendo considerada uma levedura respiro-fermentativa (VAN DIJKEN et al. 1993), preferencialmente classificada como Crabtree-negativa. Dessa forma, a produção de etanol é associada a uma limitação de oxigênio (VISSER et al., 1990).

Com relação à temperatura de crescimento *K. marxianus*, por ser uma espécie mesófila, apresenta em geral temperatura ótima de crescimento entre 25

e 37 °C. No entanto, é capaz de crescer em altas temperaturas, sendo considerada termotolerante (DUNLAP et al. 2010). De acordo com Laszlo (1988), a termotolerância pode ser definida como a capacidade transitória das células sobreviverem quando expostas a temperaturas elevadas. Na Tabela 2.1 estão listados alguns trabalhos nos quais foi avaliado o crescimento de *K. marxianus* em diferentes temperaturas.

O interesse na utilização de *K. marxianus* tem sido impulsionado por suas aplicações biotecnológicas, principalmente devido às características de termotolerância e taxa de crescimento elevada (STEENSMA et al. 1988; BELLAVER et al., 2004). Além disso, a espécie é certificada como GRAS (Generally Recognized as Safe) nos Estados Unidos e como QPS (Qualified Presumption of Safety) na União Européia, sendo usada há vários anos tanto na indústria de alimentos e bebidas, tais como produção de queijo, vinho, bebidas destiladas, fermentadas e não-alcoólicas, sorvetes, balas, gelatinas, pudins, entre outros (LANE, MORRISSEY, 2010). Uma breve apresentação de outras aplicações industriais de *K. marxianus* pode ser vista na Tabela 2.2.

Tabela 2.1 – Temperaturas de crescimento de *K. marxianus* em meio contendo glicose como fonte de carbono.

Temperatura (°C)	Glicose (g/L)	Referência
47	150	ANDERSON et al. 1986
49	140	HUGHES et al. 1984
50	10	KUMAR et al.2013
52	10	BANAT et al. 1992

Tabela 2.2 - Resumo das principais aplicações industriais de *K. marxianus* (Adaptado de LANE, MORRISSEY, 2010).

Aplicação	Referência
Produção de compostos aromáticos: Ésteres, Ácidos carboxílicos, Cetonas, Furanos, Álcoois.	FABRE et al. 1995 MAGALHÃES et al., 2011
Produção de enzimas endógenas: β-xilosidase β-galactosidase β-glicosidase Inulinase	RAJOKA (2007) PINHEIRO et al. (2000) SZCZODRAK et al. (2000) CRUZGUERRERO et al. (1995)
Produção de proteínas heterólogas: Celulase Termo estável Lactato desidrogenase Endopoligalacturonase α-galactosidase	HONG et al. (2007) PECOTA et al. (2007) SIEKSTELE et al. (1999) BERGKAMP et al. (1993a,b)
Biorremediação: Tratamento de resíduos de papel Remoção de açúcares de águas residuais Bioadsorção de corantes	KADAR et al. 2004 HANG et al. 2003 MEEHAN et al. 2000
Produção de etanol: Por sacarificação e fermentação simultânea Células em suspensão e Imobilizadas Fermentações: contínuas e descontínuas	PESSANI et al. 2011 HIDENO et al. 2013 KOURKOUTAS et al. (2002) OZMIHCI & KARGI (2007)

2.2 Produção de etanol a partir de glicose: Aspectos Gerais da Fermentação

A fermentação é um processo metabólico associado a condições anaeróbias ou de hipoxia, onde há liberação de energia na ausência ou em baixas concentrações de oxigênio, respectivamente. Constitui um conjunto de reações catalisadas por enzimas, onde uma molécula orgânica é parcialmente oxidada levando a formação de compostos mais simples, liberando energia. No entanto, não são todas as ligações covalentes entre os átomos de carbono que são rompidas, e portanto, o ganho energético é menor do que aquele conseguido na respiração (VOET, D.; VOET J. G., 2013).

A fermentação tem início com a glicólise (Figura 2.2), comum tanto aos processos aeróbios quanto aos anaeróbios, via central do catabolismo da glicose, onde a molécula de glicose é oxidada, gerando duas moléculas de: piruvato, ATP, NADH e água. As duas moléculas de NADH produzidas devem ser oxidadas a NAD^+ de modo que a glicólise possa continuar a degradar outras moléculas de glicose (PELCZAR et al., 1997; NELSON e COX, 2002).

A fermentação alcoólica é um processo de oxi-redução intramolecular, anaeróbico e exotérmico, e pode ser considerada como a oxidação anaeróbica parcial da glicose causada pela ação de leveduras, gerando como produto final etanol e gás carbônico, com liberação de energia química e térmica (NELSON e COX, 2011).

Na fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado em uma reação irreversível, pela ação da enzima piruvato descarboxilase, formando acetaldeído, que é posteriormente reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase, com o poder redutor fornecido pelo NADH, que é oxidado a NAD^+ , como mostrado na Figura 2.3 (NELSON e COX, 2002).

A quantidade de NADH é limitada e esta molécula é necessária na sua forma oxidada (NAD^+) é necessária como receptor de elétrons na glicólise e, dessa forma, para a continuação do processo de produção de energia, o NADH tem que ser oxidado. A fermentação alcoólica é uma alternativa de recuperação deste cofator, quando há baixas concentrações de oxigênio.

Figura 2.2 – As duas fases da glicólise, fase preparatória e fase de pagamento (NELSON e COX, 2011)

Figura 2.3 – Fermentação alcoólica, um dos destinos do piruvato em condições anaeróbias ou de hipoxia (NELSON e COX, 2011).

O rendimento teórico em etanol a partir de glicose é de 0,511 g/g, considerando que toda hexose do meio é convertida no produto. Entretanto, na prática, este valor não é comumente observado, devido ao desvio de parte da glicose na formação de produtos secundários, como de glicerol e álcoois superiores, e na síntese de material celular para manutenção da levedura.

2.3 Fatores que influenciam na fermentação de glicose a etanol por *K. marxianus*

Vários são os fatores capazes de afetar os parâmetros da bioconversão de glicose em etanol por leveduras. A alteração de certas condições de cultivo pode desviar a formação do produto desejado para a produção de biomassa ou de outros metabólitos secundários, diminuindo assim a eficiência da fermentação. Alguns destes fatores estão descritos a seguir.

2.3.1 Fatores Ambientais

A temperatura é um importante fator ambiental, que afeta diretamente as reações bioquímicas. De acordo com Beney e Gervais (2001), a maior parte dos componentes celulares é drasticamente afetada quando estes são expostos a altas temperaturas, o que pode levar à perda da viabilidade celular. Segundo os autores, o efeito do aumento da temperatura sobre a membrana plasmática tende a diminuir a concentração do ácido graxo insaturado o que promove mudanças na

sua fluidez. Watson (1987) verificou que a suplementação dos meios com lipídios, em particular ácidos graxos insaturados, pode aumentar a viabilidade celular em altas temperaturas, assim como melhorar a tolerância ao etanol, pois os danos à membrana plasmática são um dos principais fatores que ocasionam a morte celular.

A busca por leveduras mesófilas, que apresentem a termotolerância, constitui uma estratégia para aumentar a tolerância a altas temperaturas, e assim diminuindo o efeito danoso da temperatura elevada. Além disto, a condução da fermentação em temperaturas mais elevadas tem a vantagem de promover melhor transferência de massa devido à viscosidade reduzida, aumento nas taxas de difusão, elevadas taxas de bioconversão, baixo risco de contaminação, e recuperação facilitada do produto (HOLST et al. 1997).

Dentre os micro-organismos que apresentam a termotolerância, *K. marxianus* tem um dos melhores desempenhos em termos de crescimento e fermentação a altas temperaturas (ABDEL-BANAT et al. 2010). A Tabela 2.3 apresenta alguns valores de concentração de etanol e porcentagem do rendimento teórico na temperatura de 45 °C.

De acordo com Anderson et al. (1986), a cepa *K. marxianus*. CBS 974, quando cultivada em 150 g/L de glicose a diferentes temperaturas (25, 39, 41, 43, 45 e 47 °C), produziu a concentração máxima de etanol de 80 g/L após 80 horas a 25 °C. Os autores ainda verificaram que nas demais temperaturas o tempo foi decrescido para aproximadamente de 20 horas e a concentração máxima do produto variou de 50 a 80 g/L, sendo este valor máximo obtido em 39 e 41 °C. Neste trabalho foi também avaliada a viabilidade das células durante a fermentação nas diferentes temperaturas e foi observado na maioria dos casos que após 24 horas, as células não apresentaram viabilidade, exceto a 25 °C, na qual após 120 horas de fermentação a porcentagem de células viáveis foi de 60%. Além disso, nos experimentos conduzidos nas temperaturas de 45 e 47 °C foi constatado um residual de açúcar na faixa de 5,0 a 10,0 g/ L.

Tabela 2.3 – Produção de etanol e eficiência de diferentes linhagens de *K. marxianus* cultivadas em temperatura de 45 °C, com 150 g/L de glicose como fonte de carbono, adaptada de ANDERSON et al. 1986.

	Etanol (g/L)	Eficiência(%)
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 974	62,6	85,6
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 972	60,7	87,3
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 469	58,8	85,0
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 970	58,6	87,2
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 467	58,0	85,9
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 977	57,7	83,6
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 951	57,4	88,0
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 982	55,8	88,3
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 976	56,8	83,8
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 957	56,3	87,7
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 973	56,1	85,4
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 954	55,4	87,5
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 985	55,3	85,7
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> 953	55,0	85,4
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> CBS 712	41,6	79,2
<i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> CBS 397	40,6	78,5

Yanase et al. (2010), avaliaram o efeito da temperatura de 30 a 52 °C sobre o desempenho fermentativo da levedura utilizando *K. marxianus* NBRC1777, em meio contendo 100 g/L de glicose como fonte de carbono,. Os autores observaram que até 45 °C, a levedura produziu aproximadamente 45 g/L de etanol e consumiu toda glicose em 12 horas, enquanto que nas temperaturas de 48 e 50 °C, a produção de etanol decresceu para 20 g/L no mesmo tempo. Na temperatura de 52 °C, a levedura não consumiu a glicose e consequentemente nenhuma produção de etanol foi verificada. Pode ser observado uma maior eficiência do processo (92,9%) a 40 °C com uma produção máxima de etanol de 47,4 g/L, em temperaturas mais elevadas houve uma queda nesses parâmetros.

Abdel-Banat et al. (2010) demonstraram como altas temperaturas durante a fermentação podem melhorar o desempenho de processos fermentativos sob o ponto de vista econômico. Segundo os autores, além de afetar positivamente a fermentação, altas temperaturas também podem impactar os custos de todo processo. Para chegar a esta conclusão, os autores compararam os custos da fermentação por *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, as quais apresentam temperatura ótima de 40 °C e 35 °C; respectivamente, assim como os gastos com enzimas no processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) em função das temperaturas ótimas de fermentação de ambas as leveduras. Foi constatado que a economia seria de aproximadamente US\$ 30.000,00 por ano para uma usina de etanol na escala de 30.000 m³, uma vez que um aumento de 5 °C na temperatura resultaria na redução da quantidade de enzima a ser adicionada, diminuindo os custos de produção. Esse cálculo foi baseado no preço da enzima glicoamilase, a qual possui menor custo em relação às enzimas usadas para degradação da celulose dos materiais lignocelulósicos, aumentando ainda mais a economia para esse tipo de processo. Além disso, Wingren et al. (2003) constataram que o custo de investimento inicial também é reduzido, uma vez que o processo de resfriamento entre sacarificação e fermentação pode ser completamente eliminado, além do tempo de produção de etanol ser menor em elevadas temperaturas.

Além da temperatura, o metabolismo fermentativo da levedura é também relacionado com a concentração do oxigênio dissolvido no meio. No metabolismo oxidativo da levedura, ao final da cadeia respiratória, o oxigênio é o aceptor final de elétrons, sendo então reduzido a água, permitindo a reoxidação das

coenzimas que participam das reações de desidrogenação de NADH produzidos na glicólise e no ciclo de Krebs, acoplados à formação de ATP. A energia liberada pelo ATP é utilizada no metabolismo celular, para síntese e degradação de moléculas. Em condições de anaerobiose ou até mesmo quando há uma baixa disponibilidade de oxigênio, a reoxidação de NADH se dá através da transferência dos elétrons para aceptores endógenos, geralmente compostos orgânicos (COX & NELSON 2010).

Dessa forma, o oxigênio dissolvido no meio é necessário para a viabilidade celular e o crescimento das células, na formação da biomassa microbiana (LIMA et al., 2001). No entanto, a presença de elevadas concentrações de oxigênio, inibem a formação de etanol e aumentam o crescimento celular, fenômeno denominado de “Efeito Pasteur” (PASTEUR, 1861).

Uma forma de estudar a oxigenação do meio em experimentos realizados em frascos Erlenmeyer é por meio da variação da velocidade de agitação e a razão entre volume de meio e volume de frasco. Além disto, o controle destas operações é de fundamental importância na otimização das condições de crescimento e formação do produto no processo fermentativo. Com objetivo de otimizar o nível de oxigenação para a produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860, Castro (2011) variou a velocidade de agitação e o grau de aeração ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$) a 45 °C, em um meio contendo 50 g/L de glicose. Os resultados mostraram que nas condições de menor agitação e aeração o fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) foi de 0,44 g/g, enquanto que nas condições onde ocorreu maior transferência de oxigênio, esse fator decresceu para 0,24 g/g. Nestas condições, foi observada uma redução na produtividade volumétrica em etanol (Q_P) passando de 3,63 para 2,09 g/L.h. Neste trabalho o autor concluiu que a velocidade de agitação e o grau de aeração ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$) são fatores capazes de interferir significativamente nos parâmetros fermentativos de *K. marxianus* NRRL Y-6860 e, portanto, a disponibilidade de oxigênio é um fator ambiental importante na fermentação de glicose por esta linhagem de levedura, afetando tanto a conversão quanto a produtividade em etanol, pois o nível de oxigenação determina a divisão do fluxo de carbono da glicose entre o crescimento e a formação de produto.

Em biorreatores, onde a transferência de oxigênio é mais efetiva, normalmente são avaliadas as variáveis velocidade de agitação e vazão de ar.

Para investigar a influência da oxigenação no crescimento celular da *K. marxianus* var. *bulgaricus*, Cazetta et al. (2010) mantiveram a velocidade de agitação de 300 rpm e variaram a taxa da aeração de 0,2 a 3,0 vvm, em um reator em batelada a 30 °C, usando 10 g/L de sacarose como fonte de carbono. Na menor taxa de aeração (0,2 vvm) a concentração celular atingiu 1,83 g/L após 10 horas e aumentou para 5,43 g/L quando a aeração foi elevada para 3 vvm. Foi também observado que o aumento na taxa de aeração foi acompanhado por um aumento da velocidade de crescimento específico, 0,16 a 0,27 h⁻¹. O mesmo comportamento foi observado para os valores máximos de produção de biomassa ($Y_{X/S}$), 0,16 a 0,66 g/g. Os autores concluíram, dessa forma, que o crescimento celular foi afetado positivamente pelo aumento de aeração.

Pinheiro et al. (2000) observaram que quando a levedura *K. marxianus* ATCC10022 foi cultivada em meio pressurizado com ar (2 bar), a produção de biomassa foi 3 vezes superior quando comparada com um sistema microaerado, para todas as concentrações de lactose testadas (20, 40, 100 g/L). No entanto, quando o cultivo foi realizado sob pressão de ar acima de 2 bar (4 a 6 bar), não foi observado aumento significativo na produção de biomassa, porém a produção de etanol foi reduzida com o incremento da pressão de ar. O efeito do oxigênio sobre a produção do etanol foi mais significativo no experimento com uma concentração inicial de lactose de 100 g/L, quando comparados com menores concentrações da mesma fonte de carbono (20 e 40 g/L).

Com relação ao pH do cultivo, o valor inicial da variável no meio fermentativo influencia tanto o crescimento quanto os parâmetros cinéticos e a formação de subprodutos. Em geral, as leveduras são cultivadas em pH entre 4 e 6 (AMORIM et al., 1996) e a variável deve ser controlada durante a maioria das fermentações, pelo fato da maior parte dos micro-organismos apresentarem uma pequena faixa de valor da variável em que o crescimento e formação de produto ocorrem com alta produtividade. Além disto, esse controle pode ser usado para selecionar as leveduras e diminuir a possibilidade de contaminação bacteriana (DE SÁNCHEZ, CASTILLO 1980).

O pH pode variar durante a fermentação por uma série de razões como consumo da fonte de nitrogênio e a formação de ácidos tais como acético, láctico e succínico (ROSE, HARRISSON, 1987). Grandes variações no pH do meio provocam desvio da rota metabólica desejada, podendo, por exemplo, levar à

produção de glicerol e ácidos orgânicos. A variação do pH intracelular é indesejável, por provocar danos às enzimas e outras proteínas internas, impossibilitando o funcionamento normal de todo metabolismo celular. Portanto, as leveduras têm uma eficiente capacidade de tamponar o meio intracelular, sendo capazes de manter o valor do pH interno sempre na faixa ótima. Contudo, valores baixos de pH no meio externo, o tornam desfavorável, uma vez que exigem das leveduras um maior gasto de energia na manutenção do pH interno, desviando parte da fonte de carbono para essa atividade, diminuindo a fonte disponível para produção de etanol, além de afetar as proteínas de transporte da membrana citoplasmática que estão expostas ao meio externo (ROSE, HARRISSON 1987).

Kumar et al. (2013) avaliaram o efeito do pH sobre o crescimento e fermentação de *Kluyveromyces* sp. IIPE453 visando definir o valor ótimo para o processo fermentativo. Os autores variaram o pH inicial de 4,0 a 6,0 sob a temperatura de 50 °C, em meio contendo 20 e 200 g/L de glicose, respectivamente. Foi observado que a maior velocidade de crescimento ($0,34 \text{ h}^{-1}$) e o maior fator de conversão de substrato em células ($0,52 \text{ g/g}$) ocorreu em pH 5,0. No entanto, para a fermentação alcoólica o fator de conversão de substrato em produto foi máximo ($0,5 \text{ g/g}$) na faixa de pH de 5,0 a 6,0.

Como forma de investigar o crescimento celular da *K. marxianus* var. *bulgaricus* em reator em batelada a 30 °C, usando sacarose como fonte de carbono, Cazetta et al. (2010) variaram o pH inicial de 3,5 a 6,0, e observaram que a variável praticamente não influenciou o crescimento celular, o qual variou apenas de 3,13 a 3,82 g/L empregando pH 3,0 e 5,0, respectivamente.

Ao estudar o efeito do pH (3,5 a 6,0) no crescimento de *K. fragilis* NCYC 587, usando lactose como fonte de carbono numa temperatura de 30 °C, De Sánchez e Catillo (1980) observaram que com o pH inicial de 5,0 a levedura obteve um maior crescimento celular ($5,03 \text{ g/L}$), mais elevado consumo de lactose (87,4%) e um maior fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$ de $0,4 \text{ g/g}$). Os autores observaram ainda uma variação do pH durante o crescimento celular, aumentando durante 5 a 10 h de crescimento e, em seguida, decrescendo para valores menores que o inicial (3,5).

2.3.2 Fatores Nutricionais

Para o crescimento de uma levedura, sua necessidade nutricional deve ser suprida, através da formulação de um meio de cultivo adequado de acordo com cada espécie. A falta de nutrientes pode ocasionar baixos valores de velocidade de crescimento e produtividade e até mesmo a perda de viabilidade celular. O excesso de nutrientes, por outro lado, pode prejudicar o cultivo dos micro-organismos. Portanto, tornam-se necessários estudos para definir a melhor concentração ao formular o meio, diminuindo o custo com os nutrientes em excesso e aumentando o rendimento da fermentação. Um micro-organismo necessita basicamente de fontes de carbono e nitrogênio, além de vitaminas e minerais, e alguns outros componentes (BIRCH; WALKER 2000).

A fonte de carbono é essencial para a síntese de compostos orgânicos, e é também considerado como um elemento estrutural. Geralmente a fonte de carbono utilizada nas fermentações para obtenção de etanol são os carboidratos, tais como glicose, sacarose e lactose. A concentração inicial de açúcares afeta o processo da fermentação e a formação de biomassa. Altas concentrações de açúcares podem levar a altas concentrações de etanol, aumentando a produtividade do processo. No entanto, uma elevada concentração de açúcar pode ocasionar estresse osmótico, o qual pode provocar a diminuição do crescimento e perda da viabilidade das células, além de reprimir alguns genes relacionados com o catabolismo de açúcares (repressão catabólica). O estresse osmótico causa mudanças na membrana plasmática, fazendo com que ocorram fermentações lentas e incompletas, além da formação de subprodutos (SALMON, MURICO, 1994).

Kumar et al. (2013) avaliaram o efeito da concentração inicial de glicose no crescimento e na fermentação alcoólica de *Kluyveromyces* sp. IIPE453. Os autores variaram a concentração inicial da glicose, para o crescimento (10, 20 e 40 g/L) e para a fermentação alcoólica (200, 250 e 300 g/L), a 50 °C e pH inicial 5,0. Os resultados mostraram que a maior velocidade específica de crescimento ($0,35 \text{ h}^{-1}$), assim como, o maior fator de rendimento da biomassa em relação ao substrato (0,54 g/g) foi obtida com 10,0 g/L glicose. No entanto, ao analisarem o efeito da concentração inicial de substrato sobre a fermentação, não foi constatado qualquer variação significativa no fator de conversão de substrato em

produto (0,5 g/g) e na concentração máxima de etanol (cerca de 90 g/L) com aumento da concentração inicial de glicose. Porém, foi observado um aumento da glicose residual correspondente a crescente adição de glicose no início do processo fermentativo. Os autores concluíram, portanto, que a *Kluyveromyces sp.* IIPE453 apresenta elevada tolerância para altas concentrações de glicose, a 50 °C, não sofrendo repressão catabólica nas condições testadas.

Para avaliar o efeito da concentração de inulina, usada como fonte de carbono, no crescimento e na produção de etanol de *K. marxianus* UCD (FST) 55-82, Margaritis e Bajpai (1983) variaram a concentração do substrato de 50 a 300 g/L, e os ensaios foram realizados a 35 °C e pH inicial de 4,6. Os autores observaram uma velocidade específica de crescimento de 0,44 h⁻¹ e um fator de conversão de substrato em células aproximadamente de 0,07 g/g empregando 50 g/L de inulina, parâmetros favoráveis o crescimento da biomassa. Todavia, para se obter maior produção de etanol, os autores utilizaram uma concentração de inulina de 250 g/L. Nestas condições, foi observada uma concentração máxima de etanol de 102 g/L e um maior fator de conversão de substrato em produto (aproximadamente 0,45 g/g). Os autores observaram ainda que em concentrações mais elevadas deste substrato (250 g/L) foi observada uma queda na produção de etanol, provocada possivelmente pelo estresse osmótico.

Além da fonte de carbono, o nutriente mais comumente utilizado na usina de etanol é o nitrogênio, requerido principalmente para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Um baixo nível inicial de nitrogênio atua limitando a velocidade de crescimento, e assim, a formação de biomassa da levedura, resultando em uma baixa taxa de metabolismo de açúcar (WALKER, 1998).

As fontes de nitrogênio são utilizadas na forma de íons amônio (NH₄⁺), nitrato (NO₃⁻), ou até mesmo nitrogênio gasoso (N₂) e aminoácidos (ALBERS et al., 1996). A adição de nitratos não é recomendado, uma vez que este não é assimilado pela maioria das leveduras, podendo acarretar uma redução no teor de proteínas (MORRIS, 1958). Como já reportado por Kurtzman (2003), *K. marxianus* não utiliza o nitrato como fonte de nitrogênio.

Com relação ao íon amônio, tem sido utilizado o sulfato de amônio como uma fonte de nitrogênio facilmente assimilada por leveduras, devido à liberação de amônia. Para avaliar efeito deste composto, como fonte adicional de nitrogênio no desempenho fermentativo da cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 em caldo de

cana, Limtong et al. (2007) variaram entre 0 e 1,0 g/L as concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 37 °C em pH de 4,5. Neste trabalho foi observado que o meio suplementado com 0,7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, foi o que proporcionou a maior concentração de etanol (78 g/L), enquanto no meio sem suplementação ocorreu uma redução na concentração de 12% (68,5 g/L). Ao avaliarem a eficiência de conversão dos açúcares a etanol, os autores observaram a maior eficiência e produtividade (69,5% e 1,08 g/L.h, respectivamente) com o meio suplementado com 0,7 g/L. Todavia, no meio sem suplementação foi obtido 61,0% de eficiência e uma produtividade de 0,95 g/L.h. Os autores concluíram que a suplementação do caldo de cana de 0,7 g/L de sulfato de amônio favoreceu os parâmetros fermentativos da cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042.

Outra importante fonte de nitrogênio para leveduras é o extrato de levedura, sendo este uma fonte protéica, contendo aminoácidos, peptídeos, proteínas, além de vitaminas solúveis em água, ribonucleotídeos, nucleosídeos e carboidratos. O aminoácido predominante no extrato de levedura é o ácido glutâmico, o qual atua como promotor de crescimento que estimula a síntese da biotina, vitamina essa que participa de uma série de reações de carboxilação e na formação de nucleotídeos. (PARRONDO et al., 2007).

Cazetta e Contiero 2011 fizeram um estudo sobre a influência da fonte de nitrogênio para a formação de biomassa por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Os autores empregaram extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, em diferentes concentrações e alguns deles com suplementação de sais minerais e os ensaios foram realizados a 30 °C e em pH inicial 5,0, e com uma concentração de sacarose inicial de 200 g/L. Os dados obtidos mostraram que a melhor fonte de nitrogênio foi uma combinação de 5 g/L de sulfato de amônia e 5 g/L de peptona, em que foi obtida uma concentração celular máxima de 16,32 g/L.

Para elucidar o efeito do extrato de levedura e do sulfato de amônia, assim como a interação entre estas fontes de nitrogênio sobre o crescimento e a produção de etanol por *K. marxianus* CECT 1123 em 100 g/L de lactose a 30 °C, Parrondo et al. (2007) variaram a concentração de sulfato de amônio de 0 a 4,7 g/L e extrato de levedura de 0 a 6 g/L. Os autores constataram que, ao adicionar apenas sulfato de amônia no meio de fermentação, tanto a velocidade específica de crescimento, quanto a concentração final de biomassa e etanol foram levemente aumentadas, quando comparados ao controle (meio não

suplementado). No entanto, ao adicionar apenas extrato de levedura ou a mistura de extrato de levedura e sulfato de amônia, os autores notaram um aumento no fator de conversão de substrato em célula de 0,07 (controle) para 0,1 g/g, um aumento da biomassa de 7 para 11 g/L, além da redução do tempo (de 96 para 24 horas) de obtenção da máxima concentração de etanol (50 g/L), triplicando assim o valor de produtividade volumétrica em etanol. Neste trabalho, os autores concluíram que, além da fonte de nitrogênio, as vitaminas presentes no extrato de levedura são de fundamental importância para melhorar os parâmetros da fermentação de *K. marxianus* CECT 1123. De fato as leveduras necessitam de vitaminas e de minerais em pequenas quantidades, para a estrutura e função e estabilidade das enzimas, para que o metabolismo e a viabilidade celular sejam mantidas. O desempenho ótimo de fermentação pode ser alcançado se estes nutrientes forem fornecidos na concentração adequada.

A nutrição mineral da levedura no processo fermentativo é também um fator essencial para que as condições de obtenção de etanol sejam maximizadas uma vez que qualquer desequilíbrio entre os nutrientes minerais na fermentação alcoólica provoca alterações metabólicas significativas. O enxofre é outro importante elemento que compõe aminoácidos e coenzimas, sendo necessário na biossíntese dos aminoácidos, cisteína, cistina, metionina e vitaminas, tais como tiamina, biotina, ácido lipóico, e coenzima A. O enxofre está disponível, na maior parte das vezes, na forma de íon sulfato e aminoácidos que contêm enxofre na sua estrutura (WALKER, 1998). Além do enxofre, o magnésio é um elemento essencial para várias funções metabólicas e fisiológicas em leveduras. Seus íons desempenham papéis de importância na atividade de muitas coenzimas e em reações que dependem do ATP (WALKER 1994). O íon magnésio está envolvido na manutenção da integridade celular, uma vez que possui a função de estabilizar diversas estruturas, como por exemplo, ribossomos, membranas celulares e ácidos nucleicos. Além disso, o magnésio protege a superfície celular, reprime o estresse da biossíntese de proteínas, é cofator de diversas enzimas e desempenha um papel fundamental no controle de metabolismo, crescimento e proliferação celular. O íon Mg^{2+} possui a propriedade de diminuir a mortalidade de leveduras devido ao efeito tóxico do etanol (BIRCH; WALKER, 2000), além de melhorar a termotolerância de levedura (D'AMORE et al., 1989).

Uma limitada concentração de magnésio pode ser responsável pela diminuição do crescimento e da atividade fermentativa de leveduras. Dombek e Ingram (1986) demonstraram que uma maior concentração de magnésio no meio (0,5 g/L) na fermentação de 200 g/L de glicose a 30 °C, resultou num aumento de duas vezes na produção de etanol em relação ao controle (ausente do composto), o que pode ser explicado por uma fase exponencial de crescimento prolongada em leveduras, resultando em aumento da biomassa de 20% e da produtividade volumétrica em etanol de 40% em relação ao controle.

Flynn e Marchant (1996) estudaram o efeito do magnésio sobre a produção de etanol por *K. marxianus var. marxianus* a 45 °C usando melaço como fonte de carbono. Os resultados mostraram que, com adição de 0,567 g/L sulfato de magnésio, tanto a concentração de etanol, quanto na produtividade foram aumentadas em 15% e 380%, respectivamente, quando comparados ao controle, ou seja, o magnésio tem um efeito positivo na produção de etanol.

Para avaliar o efeito do magnésio sobre o desempenho fermentativo da cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 na produção de etanol a partir de caldo de cana, Limtong et al (2007) utilizaram o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como fonte de magnésio em concentrações variando entre 0 e 3,0 g/L, em incrementos de 0,05 g/L, em diferentes temperaturas (37 e 47 °C). Os autores notaram pouca variação na concentração de etanol, na produtividade e na eficiência do processo com a adição de magnésio quando comparado com o controle nas temperaturas avaliadas, não sendo necessária a suplementação. Com os exemplos citados acima, observa-se a importância de estudar os nutrientes do meio para cada linhagem, devido a grande diferença dentro da espécie.

Outros importantes minerais para o metabolismo são o fósforo e o potássio. O fósforo é indispensável para a formação do ATP, sendo essencial para o armazenamento e transferência de energia nas células. É também um componente importante dos ácidos nucleicos, nucleotídeos e fosfolipídios de membrana, indispensável à multiplicação celular, sendo considerado necessário para absorção do carboidrato e a sua posterior conversão em etanol. O fósforo é fornecido na forma de sais de fosfato, em geral, absorvido na forma de íon H_2PO_4^- e são requeridos em baixa concentração durante a fermentação. Entretanto, a falta de fósforo resultaria em fermentação incompleta, pois a levedura não se replica de forma satisfatória, diminuindo a velocidade de crescimento. O potássio

é necessário para a manutenção do balanço iônico da membrana celular e como componente estabilizador do RNA. Além disso, atua como ativador em uma série de reações do metabolismo, como a glicólise. Dessa forma, a presença de potássio no meio pode resultar num aumento da taxa de metabolismo (LIMA et al., 2001).

Para avaliar o efeito do potássio sobre o desempenho fermentativo da cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 na produção de etanol a partir de caldo de cana, suplementado com 220 g/L de sacarose, na temperatura de 37 °C, Limtong et al. (2007) utilizaram o fosfato monopotássico (KH_2PO_4), como fonte de potássio, em concentrações variando entre 0 e 1,0 g/L. Os autores notaram que no meio suplementado com 0,5 g/L de KH_2PO_4 favoreceu todos os parâmetros avaliados em aproximadamente 10% em relação ao controle, atingindo valores de 76,5 g/L de etanol, produtividade volumétrica em etanol de 1,06 g/L.h e eficiência 68,1%.

2.3.3 Outros Fatores

2.3.3.1 Etanol

O etanol é um importante produto metabólico da fermentação de leveduras, no entanto, dependendo da concentração acumulada durante o processo, esse metabólito pode promover estresse químico nas células de levedura (STANLEY et al., 2010). Em baixas concentrações, o etanol é um inibidor do crescimento de leveduras, afetando a divisão celular, além de diminuir a velocidade de crescimento específico e o volume da célula. Por outro lado, em altas concentrações, o etanol pode reduzir a viabilidade celular (BIRCH; WALKER, 2000; STANLEY et al., 2010). Os principais efeitos do etanol na fisiologia de células estão mostrados na Tabela 2.4.

O etanol interfere sobre os diferentes sistemas de transportes, tais como permeases de aminoácidos, sobre a sinalização celular da glicose e sobre a atividade de enzimas essenciais da via glicolítica, como a hexoquinase, (ALEXANDRE, CHARPENTIER, 1998; BISSON, 1999 STECKELBERG, 2001). Além disso, o etanol aumenta a permeabilidade de íons e metabólitos de pequena massa molar na membrana plasmática e diminui a disponibilidade de água,

desestabilizando a membrana e alterando o grau de polaridade (MISHRA; PRASAD, 1989; COWAN, 1995).

Tabela – 2.4 Principais efeitos do etanol na levedura adaptada de Walker (1998).

Função Fisiológica	Influência do Etanol
Viabilidade e Crescimento celular	Inibição geral do crescimento. Inibição da divisão celular. Inibição da viabilidade celular. Volume celular reduzido. Indução de transições morfológicas.
Intermediário do Metabolismo e Biossíntese macromolecular	Desnaturação de enzimas glicolíticas. Desnaturação de proteínas intracelulares. Redução da velocidade máxima das enzimas da via glicolítica. Aumento de radicais livres do oxigênio.
Estrutura e Função Da Membrana	Alteração na composição de ácidos graxos e esteróis. Lipólise induzida de fosfolípidos celulares. Maior permeabilidade iônica. Inibição da captação de nutrientes. Dissipação do gradiente eletroquímico. Hiperpolarização da membrana plasmática.

Em altas concentrações, o etanol interage com a região hidrofóbica da membrana celular, e consequentemente aumenta a polaridade dessa região, permitindo passagem de moléculas polares e enfraquecendo as interações hidrofóbicas. Além disso, o estresse provocado pelo etanol induz mudanças na composição lipídica da membrana plasmática de levedura, mudando o número de saturações e o comprimento da cadeia de ácidos graxos insaturados, alterando a fluidez (WALKER, 1998). Segundo D'Amore e Stewart (1987), em meios contendo altas concentrações de ácidos graxos insaturados na membrana, assim como a presença de proteínas e vitaminas aumentam a tolerância das células ao etanol. Estes autores constataram também que fatores, tais como composição do meio,

temperatura, aeração, tipo de linhagem e pressão osmótica podem contribuir para aumentar a tolerância ao etanol.

As leveduras utilizam várias vias de resposta ao estresse que lhes permitem sobreviver em tais condições, como modificação dos lipídios da membrana, mudanças no ciclo celular, na atividade metabólica e na expressão gênica (MAGER, MORADAS-FERREIRA, 1993), algumas adaptações como resposta ao estresse causado pelo álcool estão descritas na Figura 2.4.

Figura 2.4 – Respostas fisiológicas adaptativas da levedura ao etanol.

O grau de inibição causado pelo etanol adicionado no meio difere daquele causado pelo etanol produzido pela própria levedura durante o processo fermentativo. Nagodawithana e Steinkraus (1976) e Novak (1981) constataram com *S. cerevisiae* que o etanol adicionado no início da fermentação apresenta menor inibição sobre as células do que o etanol produzido ao longo do processo. Desta forma, Maiorella et al. (1983), Lafon-Lafourcade et al. (1984) e Hahn-Hagerdal et al. (1994) sugeriram que a produção de inibidores de crescimento que se acumulam durante a fermentação, como ácidos orgânicos, aldeídos e ácidos graxos, agem sinergicamente com o etanol, aumentando assim a sua toxicidade.

Para avaliar a tolerância ao etanol de *K. marxianus*, Rosa e Sá-Correia (1992) cultivaram a cepa *Kluyveromyces marxianus* IGC 2671 e a cepa de *S. cerevisiae* IGC 3507 III⁵, como controle, adicionando crescentes concentrações de etanol ao mesmo meio de crescimento e sob idênticas condições ambientais a

30 °C, com 100 g/L de glicose como fonte de carbono. Os autores constataram que a concentração máxima de etanol adicionada que permitiu o crescimento equilibrado de *K. marxianus* IGC 2671 até o consumo total da glicose foi de 55 g/L, enquanto para *S. cerevisiae* IGC 3507 III⁵ foi de 79 g/L. Além disso, a inibição por etanol reduziu drasticamente a velocidade específica máxima de crescimento de *K. marxianus* IGC 2671, passando de 0,45 h⁻¹ para 0,20 h⁻¹ com a adição de 55 g/L de etanol ao meio de fermentação. Nenhum aumento no fator de conversão de substrato para produção de etanol foi detectado por *K. marxianus* com a adição de etanol. Entretanto, para *S. cerevisiae* IGC 3507 III⁵, o fator de conversão de substrato em etanol sofreu um acréscimo de aproximadamente 0,3 g/g até as concentrações iniciais de 47 g/L de etanol.

Para avaliar o efeito do etanol adicionado ao meio de fermentação no crescimento e na produção de etanol de *K. marxianus* UCD (FST) 55-82 em extrato de alcachofra contendo inulina como fonte de carbono, Margaritis e Bajpai (1982) variaram de 0 a 80 g/L o etanol adicionado no início do processo fermentativo na temperatura de 35 °C com um pH de 4,6. Os autores observaram, que quando o etanol foi adicionado na concentração de 80 g/L, a concentração de biomassa foi decrescida em 62,5%, a velocidade de crescimento específico em 21% e a produção de etanol em 78% em relação ao controle. Deste modo, os autores concluíram etanol tem um efeito inibitório no crescimento celular e na fermentação da cepa de *K. marxianus* UCD (FST) 55-82.

2.3.3.2 Concentração Inicial de Células

A concentração inicial de células tem grande influência na produção de etanol, e é dependente de diversos fatores, tais como as condições físicas da fermentação (temperatura e pH), composição nutricional do meio e do tipo de micro-organismo a ser utilizado.

O uso de alta concentração celular diminui o período de fermentação, aumentando a produtividade e diminuindo a possibilidade de contaminação bacteriana. No entanto, uma grande quantidade de leveduras pode aumentar a viscosidade do meio de fermentação devido ao grande crescimento do fermento, além de gerar um gasto maior com a energia de manutenção celular, uma vez

que um maior número de células consome uma maior quantidade de nutrientes para realizarem o metabolismo básico, o que pode resultar em um desequilíbrio nutricional se não houver uma nova otimização do meio(SINGH et al., 2007).

Segundo Strehaiano (1983), o uso de uma pequena concentração de inóculo é necessária para estudos básicos dos parâmetros cinéticos, por permitirem um maior tempo de fermentação, maior taxa de crescimento e uma boa velocidade de crescimento específico. Entretanto, uma maior concentração do inóculo é usualmente utilizada em indústrias, pois além de também permitir o estudo de parâmetros cinéticos reduz o tempo de fermentação e a fase *lag*, melhorando assim a produtividade do processo.

Guiraud et al. (1982) avaliaram o efeito da concentração do inóculo sobre o rendimento da fermentação em etanol por *Kluyveromyces marxianus* LG a 28 °C, usando inulina, como fonte de carbono. Os autores variaram, nas diferentes fermentações, a concentração inicial do inóculo de 2 a 50×10^7 células/mL., e não observaram variação na concentração máxima de etanol (aproximadamente 80 g/L). Porém, uma pequena alteração no perfil de produção de etanol, foi apenas observado durante o início do processo fermentativo. Concluindo que a concentração de inóculo não teve influência na produção de etanol.

3. OBJETIVO

O presente projeto tem como principal objetivo contribuir para os avanços das pesquisas na área de produção de etanol, por via biotecnológica, visando estabelecer as melhores condições de fermentação para a produção de etanol a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860, em meio semissintético contendo glicose, como fonte de carbono.

3.1 Objetivos Específicos

Para atingir os objetivos gerais do projeto, as seguintes etapas foram cumpridas:

- Avaliação da termotolerância de *K. marxianus* durante o perfil de crescimento em meio contendo glicose como fonte de carbono.
- Avaliação da cinética de produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860 em diferentes temperaturas e do grau de toxicidade do etanol sobre o bioprocessos;
- Avaliação da influência da concentração de inóculo e da suplementação dos nutrientes, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 e extrato de levedura, sobre o desempenho fermentativo de *Kluyveromyces marxianus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a estirpe termotolerante *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860, obtida da Coleção de Culturas ARS, Peoria – IL, EUA. A cultura de levedura foi mantida em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinados e conservada a 4 °C.

4.2 Efeito da temperatura sobre o cultivo do inóculo de *K. marxianus*

O inóculo foi preparado por meio da transferência de uma alçada das células recém repicadas para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio semissintético formulado segundo Tomas-Pejo et al. (2009) e descrito na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Composição do meio complexo para o cultivo do inóculo

Componentes	Concentração
Glicose	30,0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g/L
KH ₂ PO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Tampão Citrato	50 mM
pH	4,8

As soluções concentradas de cada nutriente foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121 °C por 20 minutos com exceção da glicose que foi esterilizada a 0,5 atm durante 20 minutos. Os meios inoculados foram

incubados em agitador rotatório em diferentes temperaturas (35, 40, 43 e 45 °C), e agitação a 150 rpm. Amostras foram coletadas a cada 2 horas para avaliar o crescimento celular nas diferentes temperaturas, de forma a obter informações sobre o tempo de incubação do inóculo para cada condição.

4.3 Efeito da temperatura no perfil fermentativo de *K. marxianus*

Foi utilizado como meio fermentação os mesmos nutrientes empregados no cultivo do inóculo apresentadas na Tabela 4.1, com exceção da glicose que foi utilizada na concentração de 120 g/L. Para os ensaios de fermentação, o inóculo foi cultivado na temperatura correspondente a cada ensaio, nos tempos selecionados no Item 4.2. As células foram centrifugadas a $1100 \times g$ por 20 minutos e, assepticamente ressuspensas em água destilada. Uma alíquota da suspensão resultante foi adicionada ao meio de fermentação, para que se obtenha concentração celular final de 1 g/L.

Os ensaios foram conduzidos em triplicata em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 100 rpm como pré estabelecido por Castro (2011) sob diferentes condições de temperatura (35, 40, 43 e 45 °C), durante 12 horas. Amostras foram coletadas a cada 2 horas, para o acompanhamento do crescimento celular, consumo de glicose e produção de etanol.

4.4 Curva de calibração para determinação da concentração celular (peso seco)

Para a elaboração da curva de calibração da concentração celular, o micro-organismo foi cultivado em 100 mL de meio descrito no item 4.2, durante 18 horas. Após este período, todo o volume da mistura foi centrifugado a $1100 \times g$ por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada. As células recuperadas foram ressuspensas em 50 mL de água destilada e, a partir desta suspensão foram preparadas diluições de 10; 25; 50; 100; 200; 250; 500 e 1000 vezes, e

determinadas as respectivas absorvâncias em espectrofotômetro (Hitachi U1800 High Technologies Corporation, Tokyo, Japan) a 600 nm.

Para determinação da massa celular, 5 mL da mesma suspensão celular inicial foram transferidos para cadinhos de porcelana previamente tarados, e incubados em estufa a 100 °C por 24 horas. Após resfriamento do material em dessecador por 1 hora, os cadinhos foram pesados para determinação da massa seca de células. Os cadinhos foram então, novamente colocados em estufa a 100 °C e resfriados, por 1 hora, respectivamente, e pesados, até que sua massa esteja constante. Os resultados de absorvância das amostras diluídas foram relacionados aos valores de massa para a construção da curva de calibração.

4.5 Efeito da adição de etanol sobre o perfil fermentativo de *K. marxianus*

Para avaliação do impacto do etanol como inibidor sobre o desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860, os cultivos foram realizados em meio semissintético contendo 120 g/L de glicose como fonte de carbono adicionando os nutrientes descritos na Tabela 4.1. O etanol foi assepticamente adicionado ao meio de fermentação previamente esterilizado em quatro diferentes concentrações, 0, 15, 30, 45 e 60 g/L. Para adição do etanol foram consideradas a densidade (0,789 g/cm³) e a pureza (98%).

As condições de fermentações foram as mesmas descritas no Item 4.3 empregando as temperaturas de 43 e 45 °C, onde foram avaliados o crescimento celular, pH e teores de glicose e etanol.

4.6 Efeito das condições nutricionais e do nível de inóculo sobre a produção de etanol por *K. marxianus*

Após seleção das condições de temperatura, Item 4.3 foi estudada a influência da concentração do inóculo e de suplementação nutricional sobre o desempenho fermentativo da referida levedura. A concentração de inóculo foi variada de 1,0 a 5,0 g/L, (NH₄)₂SO₄ de 1,0 a 3 g/L, KH₂PO₄ de 0,5 a 1,5 g/L,

MgSO₄ variou de 0,1 a 0,5 g/L e extrato de levedura de 3 a 7 g/L. Para tanto, foi utilizado um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} com 2 pontos centrais apresentado na Tabela 4.3. Durante os experimentos, amostras foram coletadas a cada 2 horas e avaliadas quanto ao crescimento celular, consumo de glicose e produção de etanol.

Neste tipo de planejamento, os efeitos principais não se misturam com efeitos de 1ª ordem, o que garante a qualidade estatística das informações. Esta estratégia é adequada para investigação inicial do efeito das variáveis e suas interações, possibilitando uma sequência de planejamentos em direção ao ótimo. Os níveis das variáveis foram definidos de acordo com o método proposto por Castro (2011) e com base na literatura, apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Níveis reais dos fatores.

Fatores	Níveis codificados		
	-1	0	+1
	Níveis reais (g/L)		
Concentração de inóculo	1,0	3,0	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	2,0	3,0
KH ₂ PO ₄	0,5	1,0	1,5
MgSO ₄	0,1	0,3	0,5
Extrato de levedura	3,0	5,0	7,0

Tabela 4.3 – Matriz do planejamento experimental para avaliação do efeito da variação nutricional, segundo o planejamento fatorial 2^{5-1} , com pontos intermediários.

Nível das Variáveis					
Ensaio	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Concentração de Inóculo (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0

4.7 Acompanhamento analítico dos experimentos

4.7.1 Determinação da concentração celular de *Kluyveromyces marxianus*

A concentração celular foi determinada por meio da medida de absorbância das amostras em espectrofotômetro (Hitachi 1800), utilizando água destilada como branco. Os valores de concentração foram calculados por meio da equação da curva de calibração entre a massa seca e absorbância, a 600 nm, obtida no item 4.3.

4.7.2 Determinação dos teores dos açúcares e etanol

As concentrações de glicose e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento AGILENT TECHNOLOGIES 1260 INFINITY com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm), nas seguintes condições: temperatura de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,005 M; fluxo de 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL.

4.7.3 Determinação de pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, em aparelho MICRONAL modelo B474, com correção de temperatura.

4.8 Metodologia de análise dos resultados

4.8.1 Determinação dos parâmetros fermentativos

Para avaliar o processo fermentativo, foram calculados os seguintes parâmetros: fatores de conversão de substrato em células (Y_{XS}) e em etanol

($Y_{P/S}$), fator de conversão de células em etanol ($Y_{P/X}$), produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e eficiência do processo (η).

O fator de conversão de substrato em células, $Y_{X/S}$ (g/g), foi calculado por regressão linear dos dados de concentração de células em função da concentração de glicose. O $Y_{X/S}$ é o coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear dos dados.

O fator de conversão de substrato em etanol, $Y_{P/S}$ (g/g), foi calculado por regressão linear dos dados de concentração de etanol em função da concentração de glicose. O $Y_{P/S}$ correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear dos dados.

O fator de conversão de células em etanol, $Y_{P/X}$ (g/g), foi calculado por regressão linear dos dados de concentração de etanol em função da concentração de celular. O $Y_{P/X}$ correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear dos dados.

No caso dos fatores de conversão, quando não foram obtidos por regressão linear foram obtidos pela variação de concentração inicial e final, como descritas nas equações abaixo.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Fator de conversão de substrato em células.}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad \text{Fator de conversão de substrato em etanol.}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad \text{Fator de conversão de células em etanol.}$$

A velocidade instantânea máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) foi calculada por regressão linear dos dados de $\ln X/X_0$ em função do tempo. O $\mu_{\text{máx.}}$ corresponde ao coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear dos dados.

A produtividade volumétrica em células, Q_x (g/L.h), foi calculada dividindo a concentração de células obtida pelo respectivo tempo.

$$Q_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)} \quad \text{Produtividade volumétrica em células.}$$

A produtividade volumétrica em etanol, Q_P (g/L.h), foi calculada dividindo a concentração de etanol obtida pelo respectivo tempo.

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{(P - P_0)}{(t - t_0)} \quad \text{Produtividade volumétrica em etanol.}$$

A eficiência de conversão η (%) foi calculada pela divisão do valor do $Y_{P/S}$ (obtido) pelo fator teórico (0,51 g/g) multiplicado por 100, como demonstrado na equação.

$$\eta = \frac{Y_{P/S(\text{calculado})}}{Y_{P/S(\text{teórico})}} \times 100 \quad \text{Eficiência de conversão.}$$

Onde:

P = concentração final de etanol (g/L)

P_0 = concentração inicial de etanol (g/L)

X = concentração final de célula (g/L)

X_0 = concentração inicial de etanol (g/L)

S = concentração final de glicose (g/L)

S_0 = concentração inicial de glicose (g/L)

t_0 = tempo inicial da fermentação (h)

t = tempo final da fermentação (h)

4.9.2 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa STATGRAPHICS (versão 6.0). A significância dos fatores experimentais foi testada pelo teste t de Student. Para otimização das variáveis foi utilizada a metodologia de superfície de resposta.

5. RESULTADOS

5.1. Curva de calibração para determinação da concentração celular em diferentes temperaturas

Foram obtidas quatro curvas de calibração que relacionam valores de densidade óptica à massa seca de *K. marxianus* NRRL Y-6860 em diferentes temperaturas (Figura 5.1). Esta curva foi obtida pela regressão linear dos dados de massa seca e absorvância a 600 nm, corrigidos pelas diluições utilizadas. As equações correspondentes aos ajustes lineares dos dados em cada temperatura são apresentadas na Tabela 5.1, onde [y] é Absorvância e [x] a concentração celular em g/L.

Figura 5.1 – Valores de absorvância a 600nm em função da concentração celular de *K. marxianus* NRRL Y-6860 cultivadas em diferentes temperaturas.

Tabela 5.1 - Equações correspondentes aos ajustes lineares dos dados em cada temperatura

Temperatura (°C)	Equação	Coeficiente de correlação (R^2)
35	$y = 4,484x$	0,99
40	$y = 4,768x$	0,99
43	$y = 4,013x$	0,99
45	$y = 4,011x$	0,99

Analizando a Figura 5.1, nota-se uma variação considerável na inclinação das curvas de calibração quando a temperatura foi elevada de 35 para 43 °C. Entretanto, nas temperaturas de 43 e 45 °C, não foi observado variação nos coeficientes angulares.

Com base nos dados, infere-se que a realização da curva de peso seco para diferentes temperaturas de crescimento é necessária, uma vez que a concentração celular varia sensivelmente com a temperatura.

5.2. Efeito da temperatura no crescimento e na produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860

A temperatura é um importante fator ambiental que pode alterar o comportamento do crescimento celular, as características físicas e morfológicas da levedura, além de impactar significativamente os parâmetros fermentativos. Assim, foram realizados experimentos para avaliar o efeito da temperatura no crescimento do inóculo e no processo fermentativo de produção de etanol a partir de glicose empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860.

5.2.1. Efeito da temperatura no crescimento do inóculo de *K. marxianus* NRRL Y-6860

A Figura 5.2 apresenta o crescimento celular em cada temperatura avaliada.

Figura 5.2 - Concentração celular em função do tempo no crescimento do inóculo de *K. marxianus* NRRL Y – 6860 para cada temperatura avaliada.

Os resultados mostraram que *K. marxianus* NRRL Y – 6860 foi capaz de crescer nas temperaturas de 35, 40 e 43 °C, no entanto, na temperatura de 45 °C, não foi observado qualquer variação na massa celular. Este comportamento pode ser atribuído ao fato do inóculo ter sido feito a partir das células em manutenção, as quais poderiam estar limitadas em sua capacidade de responder ao estresse produzido pela temperatura de 45 °C (dados não mostrados).

Para obter a velocidade específica máxima de crescimento específico, foi construído um gráfico de $\ln X/X_0$ versus tempo para as diferentes temperaturas testadas (Figura 5.3). A regressão linear dos dados na região de crescimento exponencial foi realizada, em que o coeficiente angular da reta obtida correspondeu ao valor da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$).

As equações correspondentes aos ajustes lineares obtidos em cada temperatura estão apresentadas na Tabela 5.2, juntamente com os valores do $\mu_{\text{máx}}$ obtido em cada temperatura. Ao obter os valores de $\mu_{\text{máx}}$ nas diferentes temperaturas testadas, foi construído um gráfico correlacionando $\mu_{\text{máx}}$ com a temperatura de crescimento (Figura 5.4).

Tabela 5.2 - Equações dos ajustes lineares dos dados e as velocidades de crescimento específico máxima obtidas nas diferentes temperaturas avaliadas.

Temperatura (°C)	Equação de $\ln(X/X_0) \times t$	$\mu_{\text{x máx.}}$ (h^{-1})	R – Quadrático (R^2)	Produtividade celular (g/L.h)
35	$y = 0,07 + 0,74x$	0,74	0,99	0,38
40	$y = 0,04 + 0,94x$	0,94	0,99	0,33
43	$y = 0,10 + 0,87x$	0,87	0,99	0,25

Figura 5.3 – Valores de $\ln X/X_0$ em função do tempo de cultivo de *K. marxianus* NRRL Y-6860 em diferentes temperaturas.

Figura 5.4 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ e produtividade celular (Q_x) do crescimento de *K. marxianus* NRRL Y-6860 em temperaturas testadas para o crescimento do inóculo, em meio contendo 30 g/L de glicose.

Nota-se na Figura 5.4 que a velocidade específica máxima de crescimento e a produtividade celular (Q_x) variaram com a temperatura de cultivo. O maior valor de $\mu_{\text{máx}}$ obtido foi a 40 °C (0,94 h^{-1}). Quando a temperatura aumentou para 43 °C, o valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi de 0,87 h^{-1} , o que correspondeu a um decréscimo de apenas 7%. É interessante ainda observar que na menor temperatura testada (35 °C), mais próxima à temperatura comumente utilizada para o crescimento da maioria das leveduras, foi obtido o menor valor de $\mu_{\text{máx}}$ (0,74 h^{-1}), que corresponde a um decréscimo de cerca de 20% em relação ao valor obtido a 40 °C. No entanto, a maior produtividade celular obtida foi a 35 °C (0,38 g/L.h). Quando a temperatura aumentou para 43 °C, o valor de Q_x decresceu em 34%.

O comportamento da curva obtida na Figura 5.4 mostra que a temperatura indicada para a obtenção do inóculo de *K. marxianus* NRRL Y-6860 está na região de 35 °C, por obter em menor tempo uma maior concentração de biomassa. Portanto, pode-se concluir que *K. marxianus* NRRL Y-6860 é uma

linhagem termotolerante por crescer em temperaturas de até 43 °C e, que, pequenas variações de 40 a 43 °C não influenciam significativamente na velocidade máxima de crescimento específico, no entanto a produtividade celular é significativamente afetada.

5.2.2. Efeito da temperatura na produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860

Nesta etapa foi avaliado o efeito da temperatura no processo fermentativo de *K. marxianus* NRRL Y-6860. Nos ensaios realizados a 35, 40 e 43 °C, o inóculo foi cultivado na temperatura correspondente ao ensaio fermentativo. Todavia, nas fermentações conduzidas a 45 °C, o inóculo foi cultivado na temperatura de 43 °C, visto que não foi possível o crescimento celular na temperatura de 45 °C, conforme mostrado no Item 5.2.1. Não foi usada a temperatura selecionada na etapa anterior, como uma tentativa de adaptar a célula à temperaturas mais elevadas.

Os perfis de crescimento celular durante a fermentação de *K. marxianus* NRRL Y-6860 nas temperaturas de 35, 40, 43 e 45 °C estão apresentados na Figura 5.5.

Com relação ao crescimento celular, observa-se que o aumento da temperatura impactou negativamente o crescimento celular de *K. marxianus* NRRL Y-6860 (Figura 5.5). Nota-se que a concentração celular máxima decresceu com o aumento da temperatura. Na temperatura de 35 °C, a máxima concentração celular (9,66 g/L) foi observada entre 8 e 10 horas, enquanto que nas temperaturas de 40, 43 e 45 °C a concentração máxima foi de 5,80, 4,16 e 3,28 g/L, respectivamente após 8 horas de fermentação. A partir destes dados verifica-se que os valores sofreram uma redução de 41, 57 e 66%, respectivamente, em relação à concentração celular obtida na temperatura de 35 °C.

Nestas temperaturas de cultivo foram também determinados os valores de velocidade específica máxima de crescimento conforme apresentada na Tabela 5.3, e graficamente representada na Figura 5.6, que também apresenta a produtividade celular.

Figura 5.5 - Concentração celular em função do tempo de fermentações para cada temperatura avaliada de *K. marxianus* NRRL Y – 6860.

Tabela 5.3 - Velocidade específica máxima de crescimento e produtividade celular da levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 em diferentes temperaturas de fermentação.

Temperatura (°C)	$\mu_{\text{máx.}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Produtividade celular (g/L.h)
35	0,58	0,81
40	0,49	0,58
43	0,31	0,52
45	0,23	0,33

Figura 5.6 - Velocidade máxima de crescimento específico e produtividade celular em função da temperatura em fermentações com concentração inicial de 120 g/L de glicose.

O comportamento de $\mu_{máx.}$ na fermentação foi diferente do comportamento observado no crescimento do inóculo. Isso pode ocorrer devido às diferentes concentrações de glicose (30 g/L para o crescimento do inóculo e 120 g/L na fermentação). Observa-se que o valor de $\mu_{máx.}$ nas condições de fermentação decresceu com o aumento da temperatura empregada no processo fermentativo, semelhante ao comportamento observado para a concentração celular. A partir de 40 °C destaca-se uma diminuição praticamente linear da velocidade específica máxima de crescimento com o aumento da temperatura. O maior valor de $\mu_{máx.}$ ($0,58 h^{-1}$) foi obtido a 35 °C. Este valor decresceu para 0,49, 0,31 e $0,23 h^{-1}$, respectivamente, nas temperaturas de 40, 43 e 45 °C. Nota-se que o decréscimo do $\mu_{máx.}$ foi de 15,5, 46,6, 60,3%, respectivamente em relação ao maior valor de $\mu_{máx.}$, ou seja, na temperatura de 35 °C. Portanto, constata-se que a fermentação de *K. marxianus* NRRL Y-6860 nas temperaturas mais elevadas (acima de 40 °C) tem influência negativa sobre as velocidades específicas de crescimento.

O comportamento da produtividade celular na fermentação (Figura 5.6) foi semelhante ao comportamento observado no crescimento do inóculo. Observa-se que a produtividade celular decresceu com o aumento da temperatura empregada no processo fermentativo. O maior valor de produtividade (0,81 g/L.h) foi obtido na temperatura de 35 °C. Este valor decresceu de 28, 36, 59%, respectivamente, em relação ao maior valor de produtividade celular, ou seja, na temperatura de 35 °C.

A Figura 5.7 apresenta a cinética de consumo de glicose durante a fermentação em cada temperatura avaliada.

Figura 5.7 - Concentração de glicose em função do tempo para cada temperatura avaliada.

Nota-se que o aumento na temperatura de fermentação apresentou efeito negativo sobre o consumo de glicose por *K. marxianus* NRRL Y – 6860. É possível observar na Figura 5.7 que a glicose foi totalmente consumida a 35 °C após um período de 12 horas, enquanto que nas temperaturas superiores (40, 43 e 45 °C) este açúcar não foi totalmente consumido ao final da fermentação,

atingindo um consumo de glicose de, respectivamente, 87, 70 e 64% em relação à glicose inicial. Uma vez que foi utilizada a mesma concentração de nutrientes em todos os ensaios, pode-se inferir que a temperatura foi o fator ambiental responsável pelo comportamento observado.

A Figura 5.8 apresenta a cinética de produção de etanol em cada temperatura avaliada nas condições citadas.

Figura 5.8 - Concentração de etanol em função do tempo de fermentações para cada temperatura avaliada.

Nota-se que a produção máxima de etanol foi similar nas temperaturas de 35, 40 e 43 °C. Nestas condições, a levedura produziu em torno de 40 g/L em 12 horas de fermentação. Quando a temperatura de fermentação foi elevada para 45 °C observa-se uma queda de 30% na produção de etanol em relação à média da produção máxima de etanol das demais temperaturas avaliadas. Este resultado indica que na fermentação à 45 °C, a levedura foi exposta a um elevado estresse causado pela alta temperatura, diminuindo assim a produção de etanol.

A Figura 5.9 apresenta graficamente a produtividade volumétrica em etanol nas diferentes temperaturas testadas.

Figura 5.9 - Produtividade volumétrica em etanol em função da temperatura.

Verifica-se que nas temperaturas de 40 e 43 °C a produtividade volumétrica em etanol foi semelhante (3,2 g/L.h), aproximadamente 10% superior em relação à obtida em 35 °C. A menor produtividade volumétrica em etanol foi observada a 45 °C, em que o aumento de apenas 2 °C foi capaz de diminuir este parâmetro em cerca de 30%.

A Tabela 5.4 e a Figura 5.10 mostram um resumo dos parâmetros cinéticos das fermentações conduzidas com *K. marxianus* NRRL Y-6860 nas temperaturas de 35, 40, 43 e 45 °C.

Nota-se que na temperatura de 35 °C o metabolismo ficou mais voltado para formação de biomassa, isso pode ser notado pelo alto valor de velocidade específica de crescimento, por uma baixa eficiência na produção de etanol, além dos fatores de conversão que indicam significativa diferença favorecendo a conversão em células ($Y_{X/S}$ e $Y_{P/X}$).

Tabela 5.4 - Resumo dos parâmetros fermentativos nas diferentes temperaturas das fermentações conduzidas com *K. marxianus*.

Temperatura (°C)	$\mu_{\text{máx.}}$ (h ⁻¹)	Consumo Glicose (%)	Q _P (g/Lh)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/X} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	η (%)
35	0,58	100	2,93	0,07	4,17	0,27	52,9
40	0,49	87	3,22	0,05	8,38	0,37	72,5
43	0,31	70	3,18	0,03	12,38	0,41	80,4
45	0,23	64	2,17	0,03	11,88	0,32	62,7

Figura 5.10 – Parâmetros fermentativos das diferentes temperaturas nas fermentações conduzidas com *K. marxianus*.

Ao elevar a temperatura até 43 °C ocorreu uma mudança no metabolismo favorecendo a produção de etanol, apontados pelos valores crescentes de produtividade, eficiência, $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$, além da menor velocidade específica de crescimento. Observam-se aspectos parecidos nas temperaturas de 40 e 43 °C, no entanto, essa variação de 3 °C na temperatura permitiu uma maior produção de etanol, e principalmente maior eficiência do bioprocessamento com uma maior concentração de glicose residual, que com a otimização da fermentação poderia aumentar ainda mais a eficiência do processo até que maior parte da glicose seja consumida.

No entanto, a 45 °C nota-se uma queda na produção de etanol, provavelmente devido a maior estresse causado pela temperatura, dificultando as vias de resposta ao estresse gerado, diminuindo a produtividade, eficiência, $Y_{P/X}$ e $Y_{P/S}$, além de um menor crescimento celular.

Foi verificado, durante a fermentação, um comportamento muito semelhante em relação ao observado por Huges et al. (1984) que avaliaram fermentações com *K. marxianus* em diferentes temperaturas contendo glicose como fonte de carbono, no qual o fator de conversão de substrato em célula diminuiu com o aumento da temperatura.

No presente trabalho, os resultados de produtividade volumétrica são muito promissores, uma vez que são comparáveis a algumas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas em indústrias. Por exemplo, Lu et al. (2011), obtiveram uma produtividade volumétrica de cerca de 3,50 g/L.h a partir de 200 g/L de glicose por *S. cerevisiae* CE25, enquanto Pereira et al. (2011), relataram valores de 2,51 e 2,53 g/L.h a partir de 340 g/L de glicose utilizando estirpes de *S. cerevisiae* PE-2 e CA1185, respectivamente.

Portanto, a melhor temperatura para fermentação foi de 43 °C, uma vez que elevados parâmetros fermentativos foram obtidos. Apesar disso, foi observada uma elevada concentração de glicose residual, o que ainda permite estudos posteriores visando aumentar o consumo de glicose para produzir mais etanol.

5.3 Efeito da adição de etanol sobre o perfil fermentativo de *K. marxianus* a 43 e 45 °C.

O etanol foi testado como inibidor do metabolismo fermentativo de *K. marxianus* NRRL Y – 6860 no meio de fermentação nas concentrações de 0, 15, 30, 45 e 60 g/L, nas temperaturas de 43 e 45 °C. As temperaturas mais elevadas foram escolhidas, por serem mais favoráveis durante a sacarificação e fermentação simultânea de materiais lignocelulósicos.

Os perfis de crescimento da levedura na presença de diferentes concentrações de etanol a 43 e 45 °C estão representados na Figuras 5.11-A e 5.11-B, respectivamente.

Ao avaliar a concentração celular nas diferentes concentrações de etanol adicionado a 43 °C (Figura 5.11-A), observa-se que a concentração celular obtida em 12 horas decresceu em 50 e 48%, para 15 e 30 g/L, respectivamente, em relação à concentração celular obtida no controle a 43 °C quando não foi adicionado etanol no início da fermentação. Nota-se que na fermentação com a adição de 30 g/L de etanol ocorreu a fase *lag*, ou seja, nestas condições foi necessário um período de adaptação das células ao meio fermentativo, mostrando que a presença de etanol afetou as condições fisiológicas da célula de *K. marxianus*.

Ao analisar a Figura 5.11-B (temperatura de 45 °C), nota-se que a concentração celular obtida em 12 horas decresceu em 60 e 89%, quando foi adicionado 15 e 30 g/L de etanol, respectivamente, em relação à concentração celular obtida no controle (no qual não foi adicionado etanol no início da fermentação) na temperatura de 45 °C. Todavia, em maiores concentrações de etanol não ocorreu crescimento celular.

Nota-se ainda que o aumento da concentração inicial de etanol com o aumento da temperatura impactaram negativamente o crescimento celular de *K. marxianus* NRRL Y-6860. Acima de 30 g/L não foi observado crescimento celular, e nas concentrações de 15 e 30 g/L o crescimento foi significativamente reduzido. Ao comparar as diferentes temperaturas avaliadas, conclui-se que o aumento da temperatura tem um maior impacto na toxicidade do etanol.

Figura 5.11 - Concentração de celular em função do tempo de fermentações da linhagem de *K. marxianus* NRRL Y – 6860 na presença de diferentes concentrações iniciais de etanol a 43 e 45 °C, A e B, respectivamente.

As velocidades específicas máximas de crescimento, nas diferentes concentrações de etanol a 43 e 45 °C, estão apresentadas nas Tabelas 5.5, e também representadas graficamente na Figura 5.12.

Tabela 5.5 - Velocidade de crescimento específico máximo na fermentação em diferentes concentrações de etanol a 43 e 45 °C.

Temperatura (°C)	Concentração de Etanol (g/L)	$\mu_{\text{máx.}}$ (h ⁻¹)
43	0,0	0,31
	15,0	0,32
	30,0	0,28
	45,0	0,00
	60,0	0,00
45	0,0	0,23
	15,0	0,12
	30,0	0,13
	45,0	0,00
	60,0	0,00

Ao avaliar os valores da velocidade máxima específica a 43 °C (Figura 5.12), nota-se que o valor de $\mu_{\text{máx.}}$ não se altera significativamente com o aumento da concentração de etanol adicionado no processo fermentativo até 30 g/L, o qual se manteve em torno de 0,30 h⁻¹. Todavia, pode-se constatar que a adição de concentrações mais elevadas de etanol (45 e 60 g/L) o crescimento celular foi inexistente. Ao avaliar os valores da velocidade específica máxima de crescimento a 45 °C observa-se uma redução de 50% no $\mu_{\text{máx.}}$ quando o etanol foi adicionado a 15 e 30 g/L em relação ao controle. Nota-se que não ocorreu variação nos valores da velocidade específica ao variar de 15 para 30 g/L a concentração inicial de etanol, no entanto acima de 30 g/L, nenhum crescimento foi observado.

Figura 5.12 Valores de velocidade específica máxima de crescimento de *Kluveromyces marxianus* em função do etanol adicionado ao meio de fermentação contendo 120 g/L de glicose a 43 e 45 °C.

Observa-se ainda que a velocidade específica máxima de crescimento sofreu maior inibição por etanol na temperatura de 45 °C, em que o $\mu_{\text{máx}}$ diminuiu significativamente já nas concentrações iniciais de 15 e 30 g/L de etanol. No entanto, em ambas as temperaturas avaliadas, as maiores concentrações iniciais de etanol (45 e 60 g/L de etanol) inibiram completamente o crescimento celular de *K. marxianus* NRRL Y-6860.

A Figura 5.13-A e 5.13-B apresentam a cinética de consumo de glicose por *K. marxianus* em meio contendo diferentes concentrações iniciais de etanol nas fermentações a 43 e 45 °C, respectivamente.

Ao analisar a Figura 5.13-A, observa-se que a adição de etanol na concentração de 15 g/L reduziu o consumo total deste açúcar para 58% em relação ao percentual de glicose consumida no controle. Nas concentrações iniciais de etanol de 30, 45 e 60 g/L não ocorreu consumo significativo deste açúcar após 12 horas de cultivo.

Figura 5.13 - Concentração de glicose em função do tempo de fermentações de *K. marxianus* NRRL Y – 6860, na presença de diferentes concentrações iniciais de etanol, a 43 e 45 °C, A e B, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 5.13-B, o consumo de glicose foi significativo apenas no experimento controle, em que não havia etanol desde o início da fermentação, enquanto que nos demais experimentos o consumo total de glicose foi menor do que 40%.

Ao comparar os perfis de consumo de glicose nas temperaturas avaliadas, nota-se que a concentração inicial de etanol afetou mais o consumo deste açúcar na temperatura mais elevada (45 °C). A concentração inicial 15 g/L de etanol foi capaz de inibir quase completamente o consumo de glicose a 45 °C, enquanto a 43 °C foi observada apenas uma inibição parcial.

Portanto, é possível concluir que o nível inicial de etanol presente no meio de fermentação afetou negativamente o consumo de glicose por *K. marxianus* NRRL Y – 6860, e que este efeito é ainda maior sob temperaturas mais elevadas.

A produção de etanol a partir de diferentes concentrações iniciais de etanol nas temperaturas de 43 e 45 °C estão apresentadas na Figura 5.14-A e 5.14-B, respectivamente

Verifica-se, na Figura 5.14-A, que apenas no controle e no experimento em que foi adicionado 15 g/L de etanol ocorreu a formação deste metabólito. No entanto, a adição de 15 g/L de etanol reduziu a produção deste álcool em 58,9% em relação ao controle 43 °C. Em maiores concentrações de etanol adicionado, observa-se apenas que foram mantidas praticamente as mesmas concentrações iniciais de etanol.

Com relação à produção de etanol durante a fermentação a 45 °C com diferentes concentrações iniciais de etanol (Figura 5.14-B), observa-se que apenas no controle e no experimento onde foi adicionado 15 g/L de etanol ocorreu a formação deste álcool. Todavia, ao adicionar de 15 g/L de etanol a produção deste álcool foi reduzida em 78% em relação ao controle. A levedura não foi capaz de produzir etanol em maiores concentrações de etanol adicionado, mantendo as mesmas concentrações iniciais. O etanol não aumenta sua concentração além de 40 g/L, possivelmente seria nessa concentração em que o etanol seria mais tóxico, nas condições nutricionais e de inóculo avaliadas até o momento.

Figura 5.14 - Concentração de etanol em função do tempo de fermentações de *K. marxianus* NRRL Y – 6860, na presença de diferentes concentrações iniciais de etanol, a 43 e 45 ° C, A e B, respectivamente.

A produção de etanol foi afetada negativamente pela adição de etanol nas fermentações a 43 e 45 °C, quanto maior a concentração de etanol adicionado, menor a concentração de álcool produzido.

Os valores da produtividade volumétrica em etanol nas diferentes concentrações deste álcool no início da fermentação estão apresentados na Figura 5.15.

Ao avaliar a produtividade volumétrica a 43 °C (Figura 5.15) nota-se que a adição de 15 g/L de etanol reduziu este parâmetro em 59% em relação ao controle. Quando a concentração inicial de etanol foi dobrada, para 30g/L, a redução da produtividade em relação ao controle foi de 79%. Nota-se, nas fermentações conduzidas na temperatura de 45 °C, que a adição de 15 g/L de etanol reduziu a produtividade em 78% em relação ao controle, e que nas concentrações iniciais acima de 30 g/L não houve produção de etanol.

Figura 5.15 - Produtividade em função da concentração de etanol adicionado a 43 e 45°C.

Com base nos resultados, pode-se concluir que concentração inicial de etanol afetou fortemente a produtividade volumétrica em etanol em relação ao controle em ambas as temperaturas.

A Tabela 5.6 mostra um resumo dos parâmetros cinéticos das fermentações conduzidas com *K. marxianus* NRRL Y-6860 em função das concentrações de etanol adicionado ao meio nas temperaturas de 43 e 45 °C.

Tabelas 5.6 - Resumo dos parâmetros cinéticos das fermentações conduzidas nas diferentes concentrações iniciais de etanol avaliadas com *K. marxianus*.

Temperatura (°C)	Etanol Adicionado (g/L)	μ_x máx. (h ⁻¹)	Glicose Consumida (%)	Q_P (g/L.h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	η (%)
43 °C	0	0,31	70	3,18	0,03	12,38	0,41	80,4
	15	0,32	40	1,31	0,02	14,5	0,29	56,9
	30	0,28	0	0,67	*	*	*	*
	45	*	0	0,13	*	*	*	*
	60	*	0	0,00	*	*	*	*
45 °C	0	0,23	64	2,17	0,027	11,88	0,33	64,7
	15	0,12	0	0,47	0,026	6,53	0,17	33,3
	30	0,13	0	0,00	*	*	*	*
	45	*	0	0,00	*	*	*	*
	60	*	0	0,00	*	*	*	*

Os fatores de conversão e a eficiência foram calculados em relação às 12 horas de fermentação.

* Não foi observado consumo de glicose e/ou produção de etanol, impedindo o cálculo desses parâmetros.

A produtividade volumétrica em etanol apresentou comportamento semelhante em ambas as temperaturas avaliadas, decrescendo com o aumento da temperatura.

Ao analisar a Tabela 5.6, nota-se que a concentração inicial de etanol afetou negativamente os parâmetros fermentativos, e, além disso, foi observada uma maior interferência na temperatura mais elevada (45 °C). Segundo D'Amore e Stewart, 1987, a tolerância ao etanol de algumas espécies de leveduras depende da temperatura, no caso de *K. marxianus* NRRL Y-6860, pode-se concluir que essa dependência é observada.

Ao observar $\mu_{\text{máx.}}$ e a glicose residual, constata-se que na concentração inicial de 15 g/L (na temperatura de 43 °C) e a 30 g/L (para ambas as temperaturas) ocorreu crescimento celular.

Na concentração inicial de etanol de 30g/L, a 43 °C, e a 15 g/L, a 45 °C, não se observa significativo crescimento celular para *K. marxianus* NRRL Y-6860. Rosa e Sá-Correia (1992), trabalhando com *K. marxianus* IGC 2671, a 30 °C, encontraram menor tolerância a etanol (55 g/L) quando comparada à *S. cerevisiae* (79 g/L de etanol), essa concentração de etanol relatada foi obtida quando o crescimento celular ainda era equilibrado., e relacionaram o efeito inibitório à atividade da ATPase de membrana.

O comportamento observado de *K. marxianus* quanto à observados quanto a inibição pelo etanol em temperaturas elevadas (43 e 45 °C) sugerem três hipóteses, primeira, a carência de algum importante nutriente, como magnésio, poderia ser responsável pela baixa tolerância, essa dificuldade seria superada com a otimização do meio da fermentação, aumentando assim a tolerância ao etanol. Segunda, como a tolerância ao etanol é dependente da temperatura para algumas espécies de leveduras, pela elevada temperatura, a toxicidade ao etanol é elevada. Terceira como o efeito de inibição ao etanol varia entre linhagens de *K. marxianus*, poderia se supor que a linhagem *K. marxianus* NRRL Y-6860 é menos tolerante ao etanol.

5.4 Efeito das condições nutricionais e do nível de inóculo sobre a produção de etanol por *K. marxianus*

A composição nutricional e a concentração de inóculo têm sido amplamente estudadas visando melhorar o desempenho fermentativo de diversas leveduras. Para isso, deve-se considerar a espécie e/ou a linhagem da levedura estudada e, conseqüentemente, suas necessidades nutricionais. No presente trabalho foram avaliados os efeitos de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , extrato de levedura e concentração de inóculo sobre a produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860 em meio contendo glicose como fonte de energia.

Com essa finalidade, ensaios foram realizados de acordo com o planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , conforme descrito no item 4.5. Esses ensaios foram realizados visando identificar e quantificar o efeito individual das variáveis experimentais e de suas interações sobre o bioprocessos. O planejamento foi constituído de 20 experimentos, no qual os fatores analisados foram estudados em dois diferentes níveis, conforme mostrado na matriz da Tabela 4.2 do item 4.5.

Os perfis de consumo de glicose pela levedura *K. marxianus* estão apresentados na Figura 5.16. Devido ao grande número de experimentos, os ensaios foram divididos em dois grupos de acordo com os níveis de extrato de levedura utilizado no meio de fermentação. O primeiro grupo (Figura 16-A) se refere aos experimentos em que a concentração de extrato de levedura no meio de fermentação foi de 3 g/L (ensaios de 1 a 8), enquanto que no segundo grupo (ensaios de 9 ao 16) estão mostrados os ensaios onde a concentração de extrato de levedura foi de 5 g/L (Figura 16-B). Observa-se que para ambos os grupos (ou seja, independentes da concentração do extrato de levedura no meio), há uma nítida separação de dois blocos, dependentes apenas da concentração de inóculo. No Bloco 1 estão agrupados os ensaios onde a concentração de inóculo foi de 1 g/L (nível -1), e no Bloco 2 encontram-se os ensaios em que a concentração de inóculo no meio de fermentação foi de 5 g/L (nível +1).

Figura 5.16 - Consumo de glicose nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético nas condições dos diferentes ensaios do planejamento experimental, onde: (A) são os tratamentos realizados com 3,0 g/L; (B) são os tratamentos realizados com 7,0 g/L de extrato de levedura.

Nota-se ainda que, para todas as fermentações realizadas no planejamento, a glicose não foi assimilada completamente pela levedura durante o bioprocessamento, apresentando uma variação de 15 a 75 g/L no valores de glicose residual. Isso mostra a importância das variáveis no desempenho fermentativo, neste caso o consumo de glicose.

Com relação ao perfil de consumo de glicose por *K. marxianus*, nos ensaios realizados com menor concentração de extrato de levedura (Figura 16-A) nota-se uma variação de 15 a 60 g/L na concentração residual de açúcar, após 12 horas de cultivo. Por outro lado, nas fermentações onde o meio continha uma maior concentração de extrato de levedura (Figura 5.16-B), a glicose residual ficou na faixa de 35 a 75 g/L após 9 horas de cultivo; sendo, ainda, observado que praticamente não houve mais consumo de açúcar entre 9 e 12 horas de fermentação. Estes resultados mostram que o consumo de glicose foi favorecido quando o meio de fermentação foi constituído com uma menor concentração de extrato de levedura (3,0 g/L), sugerindo assim, que o consumo da hexose está inversamente relacionado com a concentração deste nutriente.

No que se refere ao perfil de consumo de açúcar por *K. marxianus* nas fermentações do Bloco 1 (1,0 g/L de células), verifica-se que a hexose residual foi na faixa de 45 a 75 g/L, enquanto que, nas fermentações do Bloco 2 (5,0 g/L de células), a glicose residual variou de 15 a 45 g/L, indicando que maior consumo de glicose ocorreu com o aumento do nível de inóculo. Com estes resultados, podemos inferir que o consumo de glicose é favorecido com a maior concentração de inóculo.

Na Figura 5.17 estão apresentadas as médias do consumo máximo de glicose por *K. marxianus* em função das variáveis analisadas de acordo com o planejamento empregado. Observa-se que as variáveis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e concentração de inóculo (Figura 17-a, b e c, respectivamente), em seus maiores níveis apresentam uma média maior nos valores de glicose consumida em relação aos menores níveis, e desta forma indicam uma tendência de efeito positivo no consumo de glicose. Porém, para os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 (Figura 5.17-a e b), o desvio foi maior do que a variação das médias da glicose consumida, sugerindo que possivelmente os efeitos dessas variáveis não tenham significância no consumo de glicose.

Figura 5.17 – Médias da porcentagem do máximo consumo de glicose nos diferentes níveis das variáveis estudadas nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético.

Com relação às variáveis MgSO_4 e extrato de levedura (Figura 17-d e e) nota-se que o valor médio no consumo de glicose foi menor nos maiores níveis das variáveis avaliadas, indicando uma tendência de efeito negativo com relação a esta resposta. No entanto, ao avaliar numericamente, a tendência do efeito de MgSO_4 (Figura 17-d) sobre o consumo de glicose pela levedura, observa-se um desvio maior do que as médias calculadas, indicando que possivelmente o efeito dessa variável não tenha significância no consumo de glicose.

Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que o aumento na concentração de inóculo, bem como na redução do extrato de levedura, nos níveis avaliados favorecem o consumo de glicose por *K. marxianus*, o que será posteriormente discutido na análise estatística dos resultados. De fato, nas fermentações em que foram empregadas concentração de inóculo (5 g/L) e extrato de levedura (3,0 g/L), independente da concentração dos sais avaliados, foi observado um consumo de glicose em torno de 80% (Ensaio: 1, 4, 6 e 7).

Os perfis da produção de etanol por *K. marxianus* referentes aos ensaios fermentativos estão representados na Figura 5.18. Da mesma forma realizada no perfil de consumo de glicose, devido ao grande número de experimentos, os ensaios foram divididos em dois grupos de acordo com os níveis de extrato de levedura utilizado no meio de fermentação. O primeiro grupo (ensaio de 1 a 8) é referente às fermentações em que a concentração de extrato de levedura no meio de fermentação foi de 3 g/L (Figura 18-A), enquanto o segundo grupo (Figura 18-B), relativo aos ensaios nos quais a concentração de extrato de levedura foi de 7 g/L (ensaio de 9 ao 16). Nota-se que, independente da concentração de extrato de levedura no meio, há uma nítida separação de dois blocos, dependentes apenas da concentração de inóculo; o Bloco 1, onde a concentração de inóculo foi de 1 g/L (nível -1), e o Bloco 2, relativo aos ensaios em que a concentração de inóculo no meio de fermentação foi de 5 g/L (nível +1).

Observa-se ainda que, a ocorrência de uma grande variação (de 23 a 48 g/L) na concentração máxima de etanol produzido nos diferentes cultivos relativos ao planejamento. Isso mostra a influência e importância das diferentes variáveis avaliadas no desempenho fermentativo, que neste caso foi a produção de etanol.

Figura 5.18 – Produção de etanol nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético nas condições dos diferentes ensaios do planejamento experimental, onde: (A) são os tratamentos realizados com 3,0 g/L; (B) são os tratamentos realizados com 7,0 g/L de extrato de levedura.

Nota-se que, nos ensaios empregando 3,0 g/L de extrato de levedura (Figura 18-A), a produção máxima de etanol variou de 30 a 48 g/L, após 12 horas de ensaio fermentativo. No entanto, ao aumentar a concentração de extrato de levedura para 7,0 g/L (Figura 5.18-B) a máxima concentração do álcool variou de 25 a 40g/L, após 9 horas de cultivo, com exceção dos ensaios 12 e 15, os quais apresentaram uma maior concentração de etanol após 12 horas. De certa forma, a produção de etanol foi favorecida nos ensaios realizados com menor concentração de extrato de levedura; revelando assim a tendência de um efeito negativo na produção de etanol na faixa avaliada.

Ainda com relação à produção de etanol por *K. marxianus*, nas fermentações do Bloco 1 (1,0 g/L de inóculo) a concentração de etanol variou de 23 a 36 g/L, enquanto que, nas fermentações do Bloco 2 (5 g/L de células) a variação foi de 36 a 48 g/L. Nota-se ainda que a mínima concentração observada no Bloco 2 correspondeu a máxima do Bloco 1. De um modo geral, estes resultados demonstram o favorecimento da produção de etanol empregando maiores concentrações de inóculo.

A Figura 5.19 mostra as médias da concentração máxima de etanol produzida por *K. marxianus* para todas as variáveis analisadas de acordo com o planejamento empregado.

Similar ao comportamento observado para o consumo de glicose, nota-se que as variáveis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e concentração de inóculo (Figura 19-a, b e c), em seus maiores níveis apresentam uma média maior de etanol produzido, apontando uma tendência de contribuição positiva sobre a produção de etanol. Porém, para o sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 19-a), o desvio é maior do que a variação das médias de etanol produzido, sugerindo que possivelmente o efeito dessa variável não tenha significância sobre esta resposta.

Por outro lado, as variáveis MgSO_4 e extrato de levedura (Figura 19-d e e) em seus maiores níveis apresentam uma menor média de produção de etanol, indicando uma tendência de afetar negativamente esta resposta, ou seja, a produção de etanol é favorecida nos menores níveis das variáveis. Porém, ao avaliar numericamente a tendência do efeito de MgSO_4 sobre a produção de etanol (Figura 5.19-d), nota-se que o desvio foi maior do que a diferença entre as médias de etanol produzido, indicando que possivelmente o efeito dessa variável não tenha significância na produção de etanol.

Figura 5.19 – Médias da produção de etanol nos diferentes níveis das variáveis estudadas no planejamento experimental das fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético.

De uma forma geral, os resultados sugerem que as variáveis KH_2PO_4 , extrato de levedura e concentração de inóculo apresentam influência sobre a produção de etanol, o que será posteriormente analisado estatisticamente. Os melhores resultados, em termos de produção de etanol (em média, 47,7 g/L), foram observados nos ensaios 4 e 7, os quais continham um maior nível de KH_2PO_4 e inóculo (1,5 e 5,0 g/L, respectivamente) e um menor nível de extrato de levedura (3,0 g/L).

Na Figura 5.20 são mostrados os valores dos parâmetros fermentativos referentes à produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de glicose a etanol ($Y_{P/S}$), obtidos nos ensaios do planejamento experimental.

Avaliando o parâmetro Q_P (Figura 5.20-a), observa-se que os valores variaram de 2,4 a 4,6 g/L.h. Os ensaios 4, 6, 7, 10, 11, 13 e 16 apresentam uma produtividade maior que 3,5 g/L.h, esses ensaios tem em comum a presença de altas concentrações de inóculo. A partir dessa análise, observa-se que a média de produtividade aumentou 48% quando a concentração de inóculo foi de 5,0 g/L (nível +1), em relação 1,0 g/L (nível -1). A importância demonstrada por este fator está ligada ao fato de que os maiores valores de produtividade volumétrica em etanol ocorreram nas fermentações realizadas com altas concentrações de inóculo. Este efeito mostra que o aumento do inóculo apresentou um efeito positivo sobre a produtividade volumétrica em etanol. Dos ensaios que possuem uma produtividade acima de 3,5 g/L.h, apenas três (ensaios 4, 6 e 7) apresentam uma glicose residual abaixo de 30%.

Quanto ao fator de conversão de glicose em etanol (Figura 5.20-b), observa-se uma variação nesse parâmetro (0,36 – 0,50). No entanto, não foi possível relacionar esta variação com nenhuma das variáveis estudadas.

Figura 5.20 – Produtividade volumétrica em etanol com o percentual de açúcar consumido em cada ensaio (a) e fator de conversão de substrato em produto (b), observados nas fermentações com *K. marxianus* em meio semissintético nas condições dos diferentes ensaios do planejamento experimental.

5.4.1 Análise Estatística

O planejamento realizado (2^{5-1}) trata-se de uma meia fração de resolução cinco, no qual as quatro primeiras colunas da matriz são formadas como um planejamento 2^4 completo e a quinta coluna é resultante da multiplicação dos sinais das quatro colunas anteriores (5=1234).

Neste tipo de planejamento, os efeitos principais estão misturados somente com interações de quatro fatores, enquanto as interações de dois fatores se misturam com as interações terciárias. Os efeitos de interação de três ou mais fatores, em geral é improvável, dessa forma podemos supor que esses efeitos sejam desprezíveis. Desta forma, neste tipo de planejamento pode-se avaliar sem nenhuma interferência os efeitos principais e as interações secundárias.

A seleção dos fatores mais importantes sobre o bioprocessamento foi realizada pela análise estatística dos resultados, sendo utilizado como respostas: porcentagem de glicose consumida e máxima concentração de etanol (Tabela 5.7).

Para a análise estatística foi utilizado o gráfico de Pareto, o qual mostra as estimativas dos valores padronizados dos efeitos das variáveis sobre cada resposta estudada. Neste tipo de gráfico, os valores dos efeitos (t calculado) são comparados ao t de Student tabelado (linha pontilhada) para o número de graus de liberdade do experimento e o nível de confiança desejado. Os efeitos, representados pelas barras dos gráficos, com valores maiores que o t tabelado são considerados significativos.

A significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre as diferentes respostas avaliadas foram verificadas utilizando a análise da variância dos efeitos (ANOVA), bem como a contribuição de cada variável para o processo. Além disso, esta análise foi usada como método para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do planejamento, através do coeficiente de determinação (R^2).

Tabela 5.7. Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , para avaliação do efeito do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , extrato de levedura e da concentração inicial de células em meio semissintético sobre a glicose consumida e a produção de etanol, por *K. marxianus* NRRL Y-6860.

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	MgSO_4 (g/L)	Ext. de Levedura (g/L)	Inóculo (g/L)	Glicose Consumida (%)	Etanol (g/L)
1	1	0,5	0.1	3	5	78,62	39,3
2	3	0,5	0,1	3	1	60,68	40,92
3	1	1,5	0,1	3	1	64,98	34,44
4	3	1,5	0,1	3	5	88,29	47,97
5	1	0,5	0,5	3	1	56,01	29,51
6	3	0,5	0,5	3	5	74,24	39,2
7	1	1,5	0,5	3	5	76,88	47,39
8	3	1,5	0,5	3	1	64,26	36,04
9	1	0,5	0.1	7	1	53,04	28,21
10	3	0,5	0,1	7	5	68,84	38,31
11	1	1,5	0,1	7	5	67,89	41,52
12	3	1,5	0,1	7	1	56,95	28,98
13	1	0,5	0,5	7	5	66,08	35,66
14	3	0,5	0,5	7	1	50,87	22,71
15	1	1,5	0,5	7	1	45,32	29,22
16	3	1,5	0,5	7	5	67,02	40,41
PC	2	1	0,3	5	3	55,38	33,97
PC	2	1	0,3	5	3	60,32	39,8
PC	2	1	0,3	5	3	63,51	34,45
PC	2	1	0,3	5	3	62,42	37,8

Para a resposta glicose consumida (Figura 5.21), nota-se que a concentração de inóculo e o extrato de levedura apresentaram um efeito significativo de magnitude de (+6,58) e (-4,26), respectivamente, o que confirma a análise realizada anteriormente, onde o aumento da concentração de inóculo e uma diminuição do extrato de levedura no meio de fermentação, na faixa avaliada, aumentaram o consumo de glicose. Não foi observada nenhuma interação significativa, o efeito principal é independente das outras variáveis.

Para a confirmação da significância do Pareto foi realizada a ANOVA (Tabela 5.8), a qual demonstra uma correlação de 0,95, confirmando a qualidade dos dados, uma vez que conseguimos explicar 95% da variação total em torno da média, sendo os outros 5% explicados pelos resíduos. Observa-se, também, que as variáveis concentração de inóculo e extrato de levedura, contribuíram com 58 e 24%, respectivamente, na explicação de toda variação observada.

Com relação à concentração de etanol (Figura 5.22), observa-se que dentre as variáveis avaliadas, as concentrações de inóculo, extrato de levedura e KH_2PO_4 apresentaram efeitos significativos de magnitude (+8,24), (-5,14) e (+3,32), respectivamente. Assim como para o consumo de glicose, nota-se que nenhuma interação entre as variáveis avaliadas foi significativa, indicando que o efeito de um fator não varia com o nível de outro fator. Ao avaliar a ANOVA (Tabela 5.9), constatou-se a significância dos mesmos efeitos observados no Pareto, com uma correlação de 0,97, o que demonstra a relevância da concentração de inóculo, extrato de levedura e KH_2PO_4 , sobre a produção de etanol, visto que conseguimos explicar 97% da variação total em torno da média, sendo os outros 3% explicados pelos resíduos. Nota-se, também, que as variáveis, concentração de inóculo, extrato de levedura e KH_2PO_4 , contribuíram com 51, 20 e 8%, respectivamente, na explicação de toda variação observada.

A análise estatística dos fatores que influenciam a fermentação de *K. marxianus* a partir de glicose permitiu verificar que, dentro da região de variação estudada, e considerando as duas respostas avaliadas, os termos que se mostraram mais significativos foram as variáveis concentração de inóculo, extrato de levedura, e para a produção de etanol foi ainda constatada a significância do KH_2PO_4 .

Figura 5.21 - Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 90% de confiança e erro puro com 4 graus de liberdade para a glicose consumida.

Tabela 5.8 - Análise de variância com erro total para os principais efeitos e suas interações, durante a fermentação, sob diferentes condições de (NH₄)₂SO₄ (1), KH₂PO₄ (2), MgSO₄ (3), extrato de levedura (4) e da concentração inicial de células (5) em meio semissintético sobre a glicose consumida, por *K. marxianus* NRRL Y-6860.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
1 - (NH ₄) ₂ SO ₄	31,16	1	31,16	1,17	0,34	1,57
2 - KH ₂ PO ₄	33,67	1	33,67	1,27	0,32	1,70
3 - MgSO ₄	93,17	1	93,17	3,50	0,13	4,70
4 - Ext. de Levedura	483,45	1	483,45	18,18	0,01	24,37
5 - Inóculo	1151,75	1	1151,75	43,30	0,003	58,05
1 e 2	26,45	1	26,45	0,99	0,38	1,33
1 e 3	0,22	1	0,22	0,01	0,93	0,01
1 e 4	0,01	1	0,01	0,00	0,99	0,00
1 e 5	1,26	1	1,26	0,05	0,84	0,06
2 e 3	7,09	1	7,09	0,27	0,63	0,36
2 e 4	43,92	1	43,92	1,65	0,27	2,21
2 e 5	0,12	1	0,12	0,00	0,95	0,01
3 e 4	0,88	1	0,88	0,03	0,86	0,04
3 e 5	0,00	1	0,00	0,00	0,99	0,00
4 e 5	4,46	1	4,46	0,17	0,70	0,22
Erro	106,40	4	26,60			-
* Significativo a 90 % de confiança ($p < 0,10$).					R ² =0,95	R ² _{aju} = 0,75

Figura 5.22 - Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 90% de confiança e erro puro com 4 graus de liberdade para a produção de etanol.

Tabela 5.9 - Análise de variância com erro total para os principais efeitos e suas interações, durante a fermentação, sob diferentes condições de (NH₄)₂SO₄ (1), KH₂PO₄ (2), MgSO₄ (3), extrato de levedura (4) e da concentração inicial de células (5) em meio semisintético sobre a produção de etanol, por *K. marxianus* NRRL Y-6860.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
1 - (NH ₄) ₂ SO ₄	5,39	1	5,39	0,92	0,39	0,70
2 - KH ₂ PO ₄	64,60	1	64,60	11,04	0,03	8,35
3 - MgSO ₄	23,79	1	23,79	4,06	0,11	3,08
4 - Ext. de Levedura	154,69	1	154,69	26,43	0,01	20,00
5 - Inóculo	397,30	1	397,30	67,88	0,001	51,38
1 e 2	3,64	1	3,64	0,62	0,47	0,47
1 e 3	16,26	1	16,26	2,78	0,17	2,10
1 e 4	19,56	1	19,56	3,34	0,14	2,53
1 e 5	1,72	1	1,72	0,29	0,62	0,22
2 e 3	24,53	1	24,53	4,19	0,11	3,17
2 e 4	0,17	1	0,17	0,03	0,87	0,02
2 e 5	19,12	1	19,12	3,27	0,15	2,47
3 e 4	0,14	1	0,14	0,02	0,89	0,02
3 e 5	7,06	1	7,06	1,21	0,33	0,91
4 e 5	11,95	1	11,95	2,04	0,23	1,55
Erro	23,41	4	5,85			-
* Significativo a 90 % de confiança ($p < 0,10$).					R ² =0,97	R ² _{aju} = 0,86

Os resultados da análise estatística confirmaram os efeitos sugeridos pela análise direta dos dados, ou seja, o aumento da concentração inicial de células exerceu um efeito positivo sobre ambos os parâmetros fermentativos avaliados, já o extrato de levedura em sua menor concentração apresentou um efeito positivo, enquanto que o aumento de KH_2PO_4 proporcionou um efeito positivo somente sobre a concentração de etanol, ao nível de 90% de confiança. A análise estatística também revelou que as interações entre as variáveis não foram significativas para ambas as respostas estudadas, mostrando que na faixa de estudo, há um favorecimento na produção de etanol quando o meio continha uma menor concentração de extrato de levedura (3 g/L), maior concentração de inóculo (5 g/L) e de KH_2PO_4 (1,5 g/L). Nestas condições, as quais correspondem aos ensaios 4 e 7, a produção de etanol atingiu um valor médio de 48 g/L, com 83% de glicose consumida, o que confere um Q_P de 3,97 g/L.h e $Y_{P/S}$ de 0,48 g/g.

Os resultados do presente trabalho são superiores aos obtidos por Limtong et al. (2007) que, utilizando caldo de cana (220 g/L de sacarose), suplementado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g/L), KH_2PO_4 (0,5 g/L) e MgSO_4 (1,5 g/L) com 5% de inóculo, a 37 °C, obtiveram 87 g/L de etanol, com uma produtividade de 1,45 g/L.h e uma eficiência de 77,5%, durante a fermentação com *K. marxianus* DMKU 3-1042, em condições otimizadas.

Comparando a média das fermentações que atendem as condições que favorecem a produção de etanol, ensaios 4 e 7, com as fermentações realizadas antes do planejamento a 43 °C, os quais continham 1,0 g/L de inóculo; 5,0 g/L de extrato de levedura; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 2,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,3 g/L de Mg SO_4 (discutidos anteriormente no item 5.2), observa-se melhora na fermentabilidade de *K. marxianus* (Figura 5.23).

Em relação ao consumo de glicose (Figura 5.23-A), nota-se uma maior assimilação de açúcar por *K. marxianus* NRRL Y – 6860 nos ensaios selecionados do planejamento (cerca de 20%) em relação aos ensaios anteriores (resultados do item 5.2 a 43 °C). Quanto ao etanol (Figura 23-B), observa-se um aumento de 25% na produção deste álcool após o planejamento, verificando, portanto, a eficiência da metodologia e a necessidade da otimização destas variáveis.

Figura 5.23 - Comparação do perfil de consumo de glicose (A) e perfil de produção de etanol (B) antes e após análise do planejamento.

Os valores de Q_P para cepas industriais de *S. cerevisiae*, na produção de etanol a partir de glicose, têm sido reportados na faixa de 3,5 g/L.h, como pode ser observado no trabalho de Lu et al. (2011). Estes resultados são semelhantes ao valores observados no presente trabalho empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860, mostrando o potencial desta linhagem ser usada em indústrias.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

➤ A linhagem *K. marxianus* NRRL Y-6860 demonstrou características de termotolerância, por apresentar crescimento em temperaturas de até 43 °C. No entanto, a formação de biomassa foi favorecida a 35 °C, apresentando uma produtividade celular de 0,38 g/L.h, sendo este parâmetro desfavorecido com o aumento da temperatura.

➤ Na faixa de temperatura avaliada (35 a 45 °C), o aumento da temperatura favoreceu a produção de etanol por *K. marxianus* até 43 °C. Nesta temperatura, a linhagem *K. marxianus* NRRL Y-6860 apresentou um consumo de glicose de 70%, atingindo 38 g/L de etanol após 12 horas de cultivo, o que correspondeu a uma produtividade volumétrica em etanol de 3,2 g/L.h e eficiência de 80%.

➤ A adição de etanol no início da fermentação afetou de forma negativa a fermentação de *K. marxianus* NRRL Y-6860, em que foi observada uma maior interferência do etanol na temperatura mais elevada (45 °C). Na temperatura de 43 °C a concentração de etanol capaz de inibir completamente o crescimento da levedura foi de 45 g/L, enquanto que na maior temperatura cerca de 30 g/L de etanol já foi suficiente para causar o mesmo efeito.

➤ A concentração inicial de células exerceu um efeito positivo sobre o consumo de glicose e produção de etanol, já o extrato de levedura apresentou efeito negativo, enquanto que o KH_2PO_4 proporcionou um efeito positivo somente sobre a concentração de etanol. Os melhores resultados em termos de consumo de glicose e produção de etanol por *K. marxianus*, foram obtidos em meio

suplementado com 3,0 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de inóculo e 1,5 g/L de KH_2PO_4 .

➤ Este estudo permitiu reduzir o nível de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 e extrato de levedura na formulação do meio de cultivo, além de elevar em 19, 25, 25 e 16% sobre o consumo de glicose, produção de etanol, Q_P e eficiência do processo, respectivamente, quando comparados aos resultados obtidos na primeira etapa do trabalho.

Referências

ABDEL-BANAT, B. M. A et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861-7, jan. 2010.

ALBERS, E. et al. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996.

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, n. 1, p. 20-27, 1998.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. Processo de produção de álcool: controle e monitoramento. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996.

ANDERSON, P. J.; MCNEIL, K.; WATSON, K. High-Efficiency Carbohydrate Fermentation to Ethanol at Temperatures above 40 degrees C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* Isolated from Sugar Mills. **Applied and environmental microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1314-20, jun. 1986.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 259-263, 1992.

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

BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 34–42, Oct. 2001.

BERGKAMP, R. J.; GEERSE, R. H.; VERBAKEL, J. M.; PLANTA, R. J. Cloning and sequencing of the URA3 gene of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. In: **Yeast**, v. 9, p. 677–681, 1993.

BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9-10, p. 678-687, June 2000.

BISSON, L. Stuck and sluggish fermentations. **Am. J. Enol. Viticult**, v. 50, n. 1, p. 107-119, 1999.

CASTRO, R. C. A. **Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena-SP. p. 102. 2011.

CAZETTA, M. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Effects of Culture Conditions on the Production of Inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 53, p. 701-707, 2010.

CAZETTA, M. L.; CONTIERO, J. Influence of nitrogen source and sucrose concentration on inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in fed-batch fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 56, p. 12012-12017, 2011.

COWAN, J.A. **The biological chemistry of magnesium.** New York: VCH Publisher, 1995. 254 p.

COX, M. M.; NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 1273, 2010

CRUZGUERRERO, A., GARCIAPENA, I., BARZANA, E., GARCIAGARIBAY, M., GOMEZRUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* cdbb-I-278- a wild inulinase hyperproducing strain. **J. Ferment. Bioeng**, v. 80, p. 159–163, 1995.

D'AMORE, T.; CELOTTO, G.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40 °C. **Enzyme Microbial. Technol**, v. 11, n. 7, p. 411-416, 1989.

D'AMORE, T.; PANCHAL, D. J.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. A study of ethanol tolerance in yeast. **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 9, n. 4, p. 287-304, 1990.

D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 9, p. 322-330, 1987.

DE SÁNCHEZ, S. B., CASTILLO, F. J. Effect of pH on the growth of *Kluyveromyces fragilis* on deproteinized whey. **Acta Cient Venez.**, v. 31, p. 24–26. 1980.

DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 52, n. 5, p. 975-981, 1986.

DUNLAP, P. V. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. São Paulo:pearson Education do Brasil, s.d. p. 1160

FABRE, C. E.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 1207-1212, 1995.

FLEET, G. H., MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **Int J Food Microbiol.**, v. 4, p.45–155. 1987.

FLYNN, S. G. O.; MARCHANT, C. J. H. R. Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast , *Kluyveromyces marxianus* IMB3 : simplex optimization of media supplements. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 46, p. 187-190, 1996.

FONSECA, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-54, jun. 2008.

GROENEVELD, P.; STOUTHAMER, A. H.; WESTERHOFF, H. V. Super life – how and why “ cell selection ” leads to the fastest-growing eukaryote. **The FEBS Journal**, v. 276, p. 254-270, 2009.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microbiology and technol**, v. 16, p. 933-942, 1994.

HANG, Y. D., WOODAMS, E. E., HANG, L. E. Utilization of corn silage juice by *Klyuveromyces marxianus*. **Bioresour. Technol.**, v. 86, p. 305–307. 2003.

HIDENO, A., KAWASHIMA, A., ENDO, T., HONDA, K., MORITA, M., Ethanol-based organosolv treatment with trace hydrochloric acid improves the enzymatic

digestibility of Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*) by exposing nanofibers on the surface. **Bioresource Technology**. v.132, p. 64-70, 2013.

HOLST, O.; MANELIUS, A.; KRAHE, M.; MÄRKL, H.; RAWEN, N.; SHARP, R.; Thermophiles and Fermentation Technology. **Comp Biochem Physiol**. v.118A, p. 415-422 1997.

HONG, J.; WANG, Y.; KUMAGAI, H.; TAMAKI, H.; Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. **J. Biotechnol.**, v. 130, p.114–123, 2007.

HUGHES, D. B.; TUDROSZEN, N. J.; MOYE., C. J. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnol Lett**, v. 6, p. 1-6, 1984.

KADAR, Z., SZENGYEL, Z., RECZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Ind. Crops Prod.**, v. 20, p. 103–110. 2004.

KOURKOUTAS, Y., DIMITROPOULOU, S., KANELLAKI, M., MARCHANT, R., NIGAM, P., BANAT, I. M., KOUTINAS, A. A., High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. **Bioresour. Technol.**, v. 82, p. 177–181. 2002.

KUMAR, S. et al. Kinetic studies of ethanol fermentation using *Kluyveromyces* sp . IPE453 Short title : Kinetic studies of ethanol fermentation. **Journal of Chemical Technology& Biotechnology**, v. 88, p. 1874-1884. 2013.

KURTZMAN, C. P. et al. Proposal to conserve *Kluyveromyces* with a conserved type (Ascomycota: Hemiascomycetes, Saccharomycetaceae). **Taxon** 50. [S.l.] : [s.n.]. p. 907-908. 2001.

KURTZMAN, C. P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces* , *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae* , and the proposal of the new genera *Lachancea* , *Nakaseomyces* , *Naumovia* , *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizula*. **FEMS Yeast**, v. 4, p. 233-245, 2003.

LACHANCE, M. A. 236 Vb. Descriptions of teleomorphic ascomycetous genera and species. In: ***Kluyveromyces van der Walt emend, van der Walt***. [S.l.] : [s.n.]. p. 236-238. 1998.

LAFON-LAFOURCADE, S., GENEIX, C., RIBÉREAU-GAYON, P. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeast. Their elimination by yeast ghosts. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 47, p. 1246–1249. 1984.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, fev. 2010.

LASZLO, A. Evidence for two states of thermotolerance in mammalian cells. **Int. J. Hyperther.**, v. 4, n. 5, p. 513-526, 1988.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3, 2001.

LIMTONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource technology**, v. 98, n. 17, p. 3367-74, dez. 2007.

LOUREIRO-DIAS, M. C.; PEINADO, J. M. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 4, n. 11, p. 721-724, 1982.

LOUREIRO, V., FERREIRA, H. G. On the intracellular accumulation of ethanol in yeast. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 25, p.2263–2269. doi: 10.1002/bit.260250911. 1983.

LU, Y.; CHENG, Y.-F.; HE, X.-P.; GUO, X.-N.; ZHANG, B.-R. Improvement of robustness and ethanol production of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* under co-stress of heat and inhibitors. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 2011.

MAGALHÃES, K. T. et al. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v. 126, p. 249-253, 2011.

MAGER, W.; MORADAS-FERREIRA, P.; Stress response to yeast. **Biochem J.** v. 290, p.1–13. 1993

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R.; By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotech. Bioeng.** v. 25, p. 103 - 121. 1983.

MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. Effect of sugar concentration in Jerusalem artichoke extract on *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production. **Applied and environmental microbiology**, v. 45, n. 2, p. 723-725, 1983.

MEEHAN, C.; BANAT, I. M.; MCMULLAN, G.; NIGAM, P.; SMYTH, F.; MARCHANT, R. Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Environ. Int.** v. 26, p. 75–79. 2000.

MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 294–298, 1989.

MORRIS, E. **The chemistry and biology of yeasts**. New York, Academic Press, 1958.

NAGODAWITHANA, T. W.; STEINKRAUS, K. H. Influence of the Rate of Ethanol Production and Accumulation on the Viability of *Saccharomyces cerevisiae* in “Rapid Fermentation”. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 158-162, 1976.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S. Five new combinations in the yeast genus *Zygodospora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 1, p. 39-46, mar. 2002.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed., São Paulo: Sarvier Editora Livros Médicos, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5.ed., Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. **Biotechnol. Bioeng.** v. 27, p. 280-285. 1981.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). **Enzyme Microb. Technol.** v. 41, p. 876–880. 2007.

PARRONDO, J.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 03, p. 445-456, 2009.

PASTEUR, L. C. R. Experiences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. **Acad. Sci.**, v. 52, p. 1260–1264, 1861.

PECOTA, D. C., RAJGARHIA, V., DA SILVA, N. A. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. **J. Biotechnol.** v. 127, p. 408–416. 2007.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo. Makron Books, 1997.

PEREIRA, F. B., GUIMARÃES, P. M. R., TEIXEIRA, J. A, DOMINGUES, L., Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 112, p. 130–6. 2011.

PESSANI, N. K. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: the effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10618-24, nov. 2011.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 756-762, 2000.

PINHEIRO, R., BELO, I., MOTA, M. Growth and beta-galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 37, p. 438–442, 2003.

RAJOKA, M. I. Kinetic parameters and thermodynamic values of b-xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2212-2219, 2007.

ROCHA, S. N.; ABRAHÃO-NETO, J.; GOMBERT, A. K. Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species [corrected]. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 4, p. 619-30, nov. 2011.

ROSA, M. F.; SÁ-CORREIA, I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 14, p. 23-27, 1992.

ROSE, A. H.; HARRISSON, J. S. **The yeast - yeast and the environment**. 2. ed. London: Academic Press,. 1987. p. 309.

SALMON, J. M.; MURICO, J. C. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnol. Lett.**, v. 16, n. 1, p. 89-94, 1994.

SIEKSTELE, R.; BARTKEVICIUTE, D.; SASNAUSKAS, K., Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG1). **Yeast** v. 15, p. 311–322. 1999.

SINGH, R. S.; SOOCH, B. S.; PURI, M. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. **Bioresource technology**, v. 98, p. 2518-2525, 2007.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Appl Microbiol**, v. 109, n. 1, p. 13-24, Jul 2010.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. 2001Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 2001. 215p

STEENSMA, H. Y.; JONGH, F. C. M. DE; LINNEKAMP, M. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. **Current Genetics**, v. 14, p. 311-317, 1988.

STREHAIANO, P.; MOTA, M.; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 2, p. 135-140, 1983.

SZCZODRAK, J., Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Mol. Catal. B-Enzym.** 10, 631–637, 2000.

TOMÁS-PEJÓ, E.; OLIVA, J. M.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. **Fuel**, v. 88, p. 2142-2147, 2009.

VAN DER WALT, J. P. The emendation of the genus *Kluyveromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 31. ed. [S.] : [s.n.]. v. 31p. 341-348. 1965

VAN DIJKEN, J. P., WEUSTHUIS, R. A., PRONK, J. T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, p. 343– 352. 1993.

VISSER, W.; SCHEFFERS W. A.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W. H.; VAN DIJKEN, J. P. Oxygen requirements of yeasts. **Appl Environ Microbiol** v. 56, n. 12, p. 3785–3792. 1990.

VOET, D.; VOET J. G **Bioquímica**. 4. ed . Local: São Paulo: pearson Education do Brasil, s. d. p.1160. ARTMED, 2013.

WALKER, G.M. The roles of magnesium in biotechnology. In: **Critic Rev Biotechnol.**, v. 14, p. 311–354, 1994.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: Wiley, 1998. p. 362.

WATSON, K. Temperature relations. ROSE, A. H.; HARRISON, J.S. (Eds.), **The Yeast: Yeast and Environment**, London: Academic Press, 1987. vol. 2, p. 41–71.

WINGREN, A., GALBE, M., ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnol Prog.**, v. 19, p. 1109– 1117, 2003.

YANASE, S. et al. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 381-8, set. 2010.