

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

ESTUDO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus*
ATCC 36907 COM AUXÍLIO DE MODELAGEM FENOMENOLÓGICA

BRUNA TAVARES

CASCAVEL – PARANÁ
2017

BRUNA TAVARES

**ESTUDO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus*
ATCC 36907 COM AUXÍLIO DE MODELAGEM FENOMENOLÓGICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Professora Dr^a. Luciane Sene

CASCADEL – PARANÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T228e

Tavares, Bruna

Estudo do desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica ./ Bruna Tavares. -- Cascavel, 2017.
97 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Sene

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola

1. Biotecnologia - Etanol. I. Sene, Luciane. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 20.ed. 660.6
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9^a/965

Revisor Português, Inglês, e Normas de monografia do PGEAGRI: José Carlos da Costa
Data da Revisão: 04/05/2017

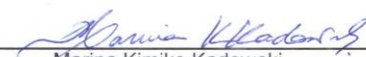
BRUNA TAVARES

Estudo do Desempenho Fermentativo da Levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com Auxílio de Modelagem Fenomenológica

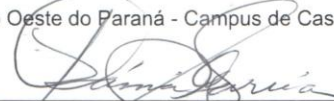
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Rita de Cássia Garcia Simão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Júlio César dos Santos

Universidade de São Paulo (USP)


Maria Das Graças de Almeida Felipe

Universidade de São Paulo (USP)

Cascavel, 20 de fevereiro de 2017

BRUNA TAVARES

**ESTUDO DO DESEMPENHO FERMENTIVO DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus*
ATCC 36907 COM AUXÍLIO DE MODELAGEM FENOMENOLÓGICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, para aprovação pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Sene

Cascavel, 20 de Fevereiro de 2017

BIOGRAFIA

Filha de Flordeli Pacífico e Osmino Alcides Tavares, nascida em 7 de janeiro de 1986, em Vilhena/Rondônia. Graduada em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE em 2009. Foi estagiária na Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNDETEC/CVEL, onde desenvolveu análise de alimentos, água, efluentes, rações e bebidas. Pós-Graduada em Docência no Ensino Superior, pela União Pan-Americana de Ensino Superior - UNIPAN, em 2011. Concluiu o curso de mestrado em Engenharia Agrícola - UNIOESTE, na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, em 2013, desenvolvendo pesquisa na área de produção de etanol de segunda geração, a partir de resíduos lignocelulósicos. No mesmo ano, iniciou o curso de doutorado no mesmo programa, dando continuidade à mesma linha de pesquisa, com bolsa Capes.

As verdadeiras conquistas,
as únicas de que nunca nos arrependemos,
são aquelas que fazemos contra a ignorância.

Napoleão Bonaparte

A Deus, pelo seu poder e cuidado com minha vida,
à minha mãe Flordeli Pacifico, pelo amor e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos que me acompanharam nesta caminhada e que me ajudaram a cumprir mais este sonho que hoje se materializa.

À minha mãe, pelo incentivo de uma vida inteira, pois sempre acreditou em mim, mais que eu mesma.

Aos amigos que conquistei ao longo desses anos na UNIOESTE: Cristiane Adreani, Rafaela Nicolau, Davi Marcondes Rocha, Isamara Godoi, Danielle Camargo, Lillian Leonel, Mariana Dario, Mariana Andrade, Débora Nakadomari e Denise Indras, que muito me auxiliaram a suportar a distância da minha família, tornando esta caminhada mais alegre e divertida. Ao aluno de Iniciação Científica Getúlio Tominc, pela grande ajuda na primeira fase deste trabalho.

Agradeço imensamente à minha orientadora professora Dr^a. Luciane Sene, pela paciência, ajuda e empenho para a realização deste e de outros trabalhos realizados ao longo de oito anos de parceria.

Agradeço a todos os professores do PGEAGRI que dedicaram seu tempo e sua sabedoria para minha formação e, em especial, à professora Dr^a. Rita, que participou das bancas em todas minhas defesas realizadas na UNIOESTE.

Agradeço em especial aos amigos de Lorena - SP: Paulo Marcelino, Ruly Teran, Flaviana Chaves, Danielle Verde, Tamires e Cristina Sene, que não só me auxiliaram no laboratório, como também fizeram minha estadia ser mais agradável.

Aos professores da Escola de Engenharia de Lorena – USP: Dr^a. Maria das Graças, Dr. Júlio César e Dr. Félix Monteiro, pelo auxílio e orientação na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

ESTUDO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 COM AUXÍLIO DE MODELAGEM FENOMENOLÓGICA

RESUMO

A levedura *Kluyveromyces marxianus* vem despertando interesse na área da Biotecnologia por sua grande diversidade metabólica e elevado grau de polimorfismo. Suas potencialidades estão sendo investigadas para diversas aplicações, como a produção de enzimas de interesse do setor alimentício como as β -galactosidases, β -glucosidase e poligalactosidase, na produção de compostos aromáticos e álcoois superiores como o fenil-etanol e, também, no setor das biorrefinarias na produção de etanol de segunda geração. Assim, essa levedura torna-se interessante para a produção de bioetanol devido à capacidade em assimilar diferentes carboidratos da biomassa lignocelulósica, e ao seu amplo espectro de termotolerância. O etanol celulósico desponta como uma possibilidade para o aumento da produtividade nas usinas sucroalcooleiras e como uma das alternativas para aliviar a crise que afeta o setor. A biomassa da cana-de-açúcar, um subproduto da indústria sucroalcooleira, como todo o material lignocelulósico, é formada por três frações principais: celulose, hemicelulose e lignina. As fibras lignocelulósicas após passarem por pré-tratamentos para a separação e quebra desse complexo originam açúcares fermentescíveis que podem ser biotransformados em etanol. O pré-tratamento por hidrólise ácida é um processo bem estabelecido, em que há a liberação de monômeros, em maior proporção a xilose, a partir da hemicelulose, tendo em vista a obtenção de celulignina. Após a deslignificação, a celulose deve ser submetida a processos de hidrólise ácida ou enzimática para a solubilização da glicose. A hidrólise enzimática e a fermentação podem ocorrer separadamente (SHF) ou de forma simultânea (SSF), tendo esta última a vantagem de realizar essas duas etapas no mesmo reator. Por outro lado, a condução desse processo requer leveduras termotolerantes capazes de suportar temperaturas próximas de 50°C, faixa otimizada para atuação das celulasas. Além disso, outro entrave para a produção de etanol é o seu acúmulo no meio, o qual acarreta na inibição pelo produto durante o processo fermentativo e toxicidade para as leveduras utilizadas. A levedura *K. marxianus* possui características metabólicas interessantes capazes de superar tais dificuldades encontradas na produção de etanol celulósico. Porém, são necessários maiores estudos, uma vez que não se tem conhecimento sobre as concentrações iniciais ótimas de substrato para a produção de etanol pela levedura e sobre sua tolerância ao produto. Por essa razão, este trabalho teve como objetivos avaliar o comportamento fermentativo da levedura *K. marxianus* ATCC 36907 em meio semi-definido, com variações nas concentrações de substrato (glicose) e temperatura utilizando a modelagem fenomenológica bem como avaliar o efeito da remoção de etanol sobre sua atividade fermentativa. Na primeira etapa do trabalho, as fermentações foram conduzidas em incubadora com agitação pelo emprego do meio semidefinido suplementado com peptona, extrato de malte e extrato de levedura, com variações nas concentrações de glicose (50, 120 e 190 g L⁻¹) e temperatura (30, 35, 40 e 45 °C). Os resultados experimentais foram agregados matematicamente para obtenção de um modelo teórico do processo por meio de modelagem fenomenológica com auxílio do software Scilab. Os modelos obtidos representaram, de forma satisfatória, as curvas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol. O processo de otimização da fermentação etílica indicou a utilização da temperatura de 40 °C e concentração de substrato de 90 g L⁻¹ para maximização da concentração de produto, com isso, foram obtidos, em média, 22,5 g L⁻¹ de etanol e rendimento de 0,24 g g⁻¹. Na segunda etapa do trabalho, as fermentações foram conduzidas em triplicatas nas condições otimizadas em fermentador com volume de 1,2 L. As fermentações-controle foram realizadas em triplicata sem a extração de etanol por vácuo e alimentadas após 36 horas. Todavia, as outras fermentações, também em triplicata, foram conduzidas nas mesmas condições, porém com extração do produto por vácuo. Nas fermentações com vácuo, após o primeiro ciclo de 36 horas, a concentração de etanol foi de 34,13 g L⁻¹ ($Y_{P/S}$ 0,38 g g⁻¹ e Q_P 0,94 g L⁻¹ h⁻¹), atingindo 40,90 g L⁻¹ de etanol ($Y_{P/S}$ 0,18 g g⁻¹ e Q_P 0,43 g L⁻¹ h⁻¹) no final do segundo ciclo.

Um comportamento diferente foi observado no experimento controle, no qual a produção de etanol ocorreu apenas no primeiro ciclo (36,37 g L⁻¹, Y_{P/S} 0,4 g g⁻¹ e Q_P 1,01 g L⁻¹ h⁻¹), enquanto no segundo ciclo o consumo do substrato foi de apenas 8% e a produção de etanol não foi observada. A modelagem fenomenológica mostrou que os dados experimentais foram melhor representados pelo modelo, o qual considerou a ocorrência de uma fase de latência no início do segundo ciclo e indicou fortemente a inibição do metabolismo pelo acúmulo do produto. A levedura *K. marxianus* recuperou seu metabolismo fermentativo e voltou a produzir etanol, demonstrando o papel relevante da remoção do produto na melhoria do processo.

PALAVRAS-CHAVE: Etanol, metabolismo, inibição pelo produto, remoção do produto, vácuo, modelagem fenomenológica

STUDY OF YIELD PERFORMANCE OF *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 YEAST BY PHENOMENOLOGICAL MODELING SUPPORT

ABSTRACT

Kluyveromyces marxianus yeast has been arousing importance in the Biotechnology area due to its high metabolic diversity and high degree of polymorphism. Its potentialities have been under study for several applications such as enzymes production of great interest in the food industry such as β -galactosidases, β -glucosidase and polygalactosidase, in the production of aromatic compounds and higher alcohols such as phenyl ethanol, also in biorefineries to produce the second generation ethanol. This yeast has great interest due to bioethanol production and its ability on assimilating different carbohydrates from lignocellulosic biomass as well as its broad spectrum of thermotolerance. Cellulosic ethanol has been presented as a possibility for increasing yield in sugarcane mills and as one of the alternatives to decrease the crisis that affects this sector. Sugarcane biomass, just like all lignocellulosic material, is formed by three main fractions: cellulose, hemicellulose and lignin. The lignocellulosic fiber, after going through pretreatments for separation and break this complex, originates fermentable sugars that can be biotransformed into ethanol. Acid hydrolysis pretreatment is a well-established process, in which monomers are released, and xylose is released from hemicellulose in higher rate, in order to obtain the cellulignin. After biomass delignification, cellulose must be submitted to acid hydrolysis or enzymatic processes to solubilize glucose. Enzymatic hydrolysis and fermentation can occur separately (SHF) or simultaneously (SSF), and this last one has an advantage of performing these two steps in the same reactor. Furthermore, this process requires thermotolerant yeasts able to withstand near to 50 °C, an optimized range for cellulase performance. In addition, another obstacle to produce ethanol is its accumulation in the medium, leading to inhibition by the product during the fermentation process and toxicity for the yeast. *K. marxianus* yeast has interesting metabolic characteristics that are able of overcoming such difficulties during cellulosic ethanol production. So, it requires more studies, since there is no knowledge about the optimal initial concentrations of substrate for ethanol production by this yeast and on its endurance to the product. Thus, this trial aims at evaluating the fermentative behavior of *K. marxianus* ATCC 36907 yeast in semi-defined medium with variations in substrate and temperature concentrations using phenomenological modeling, as well as evaluating the effect of ethanol removal on its fermentative activity. In the first step of this trial, fermentations were obtained in a shaking incubator using a semi-defined medium supplemented with peptone, malt extract and yeast extract, with variations in glucose concentrations (50, 120 and 190 g L⁻¹) and temperature (30, 35, 40 and 45 °C). The experimental results were put mathematically together to obtain a theoretical model of the process by the phenomenological modeling with Scilab software. The obtained models represented satisfactorily cell development curves, substrate consumption and ethanol production. The optimization ethanol fermentation process indicated 40 °C as temperature and a substrate concentration of 90 g L⁻¹ to maximize the product concentration, resulting in an average of 22.5 g L⁻¹ ethanol and 0.24 g g⁻¹ yield. During its second step, the fermentations were carried out in triplicates under the optimized conditions in a 1.2-L volume fermenter. Control fermentations were carried out in triplicate without ethanol extraction by vacuum and fed after 36 hours, while the other fermentations, also in triplicate, were carried out under the same conditions, but with the product extraction by vacuum. After the first 36-hour cycle, ethanol concentration was 34.13 g L⁻¹ ($Y_{P/S}$ 0.38 g g⁻¹ and Q_P 0.94 g L⁻¹ h⁻¹), reaching 40.90 g L⁻¹ ethanol ($Y_{P/S}$ 0.18 g g⁻¹ and Q_P 0.43 g L⁻¹ h⁻¹) at the end of the second cycle. A different behavior was observed in the control experiment, in which ethanol production occurred in the first cycle (36.37 g L⁻¹, $Y_{P/S}$ 0.4 g g⁻¹ and Q_P 1.01 g L⁻¹ h⁻¹), whereas in the second cycle, the substrate consumption was 8% and ethanol production was not observed. The phenomenological modeling showed that the experimental data were better represented by the model that took into account the occurrence of a latency phase at

the beginning of the second cycle and strongly indicated a metabolism inhibition by product accumulation. *K. marxianus* yeast recovered its fermentative metabolism and produced ethanol again, demonstrating the relevant role of product removal in improving such process.

KEYWORDS: Ethanol, metabolism, inhibition by the product, product removal, vacuum, decreased inhibition, phenomenological modeling.

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Produção de etanol no Brasil.....	3
2.2 Princípio da utilização da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração.....	5
2.3 Etapas da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, pré- tratamento e hidrólise da biomassa.....	8
2.3.1 Fermentação dos açúcares provenientes da biomassa lignocelulósica	12
2.3.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	15
2.3.3 Fatores de estresse durante o processo fermentativo	18
2.3.3.1 Efeitos inibitórios do etanol no processo fermentativo	20
2.3.4 Recuperação do produto	23
2.3.5 Utilização da modelagem matemática para descrever sistemas biológicos	25
REFERÊNCIAS	27
ARTIGO 1 AUXÍLIO DA MODELAGEM FENOMENOLÓGICA NA COMPREENSÃO DOS FATORES DE ESTRESSE DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DA LEVEDURA <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907	38
1 INTRODUÇÃO	40
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1 Manutenção celular	41
2.2 Inóculo.....	41
2.3 Fermentação	41
2.4 Métodos analíticos.....	42
2.5 Modelagem matemática e estimativa de parâmetros.....	42
2.5.1 Análise da variância	42
2.6 Otimização das condições do processo.....	44
3 RESULTADOS.....	44
3.1 Cinética de fermentação.....	44
3.2 Parâmetros fermentativos.....	50

3.3	Análise estatística da regressão	51
3.4	Modelos obtidos para consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol	52
3.4.1	Modelo para o consumo de glicose	52
3.4.2	Modelo para o crescimento celular	52
3.4.3	Produção de etanol durante o metabolismo fermentativo controlado pela disponibilidade de oxigênio para o crescimento.....	53
3.5	Gráficos de ajuste para os modelos	54
3.6	Otimização da temperatura e concentração de substrato	56
4	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
 ARTIGO 2 EXTRAÇÃO DE ETANOL POR VÁCUO DURANTE A FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 COMO ESTRATÉGIA PARA SUPERAR A INIBIÇÃO PELO PRODUTO		
1	INTRODUÇÃO	64
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1	Preparação de microrganismo e inóculo.....	65
2.2	Efeito da remoção de etanol na atividade fermentativa de <i>K. marxianus</i>	66
2.3	Determinação da concentração celular.....	67
2.4	Análise cromatográfica	67
2.5	Modelagem matemática	67
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

LISTAS DE TABELAS

TABELAS DA PARTE GERAL

Tabela 1	Principais métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol.....	10
Tabela 2	Comparação entre metabolismo de espécies de <i>Kluyveromyces</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16

TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1	Parâmetros fermentativos da média dos ensaios realizados com a levedura <i>K. marxianus</i> em diferentes temperaturas e concentrações de substrato	50
Tabela 2	Análise estatística da regressão para a média dos ensaios para produto (etanol, P), substrato (glicose, S) e biomassa (X) empregando <i>K. marxianus</i>	51

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1	Concentrações de glicose e etanol e parâmetros fermentativos durante as fermentações controle - FC e fermentações por extração à vácuo - FV com <i>K. marxianus</i> . O vácuo foi aplicado na segunda fase de VF	70
Tabela 2	Comparação dos resultados obtidos no ajuste do modelo matemático dos dados experimentais	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA PARTE GERAL

Figura 1	Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.....	6
Figura 2	Estrutura química da celulose.....	6
Figura 3	Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.....	7
Figura 4	Fórmula estrutural da lignina: (A) unidade de fenilpropano; (B) estrutura química da lignina.	8
Figura 5	Esquema simplificado das etapas de produção de etanol de segunda geração. .	9
Figura 6	Esquema simplificado do metabolismo de xilose em fungos e bactérias para a produção de etanol.....	13
Figura 7	Morfologia da levedura <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 em microscopia óptica, aumento de 100x (A) e em microscopia eletrônica, ampliação de 5000X (B).....	15

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1	Produção de etanol por <i>K. marxianus</i> nas temperaturas de 30 (■), 35 (●), 40 (▲) e 45°C (▼), com concentração de glicose (A) 50 g L ⁻¹ , (B) 120 g L ⁻¹ e (C) 190 g L ⁻¹	45
Figura 2	Produção de ácido acético por <i>K. marxianus</i> nas temperaturas 30 (■), 35 (●), 40 (▲) e 45°C (▼), com concentração de glicose (A) 50 g L ⁻¹ , (B) 120 g L ⁻¹ e (C) 190 g L ⁻¹	46
Figura 3	Produção de biomassa por <i>K. marxianus</i> nas temperaturas de 30 (■), 35 (●), 40 (▲) e 45°C (▼), com concentração de glicose (A) 50 g L ⁻¹ , (B) 120 g L ⁻¹ e (C) 190 g L ⁻¹	46
Figura 4	Consumo de glicose por <i>K. marxianus</i> nas temperaturas 30 (■), 35 (●), 40 (▲) e 45°C (▼), com concentração de glicose (A) 50 g L ⁻¹ , (B) 120 g L ⁻¹ e (C) 190 g L ⁻¹	49
Figura 5	Gráficos de ajuste do modelo para consumo de S experimental (+), S modelo (—), P experimental (●), P modelo (—), X experimental (◇) e X modelo (—) em	

	ensaios empregando <i>K. marxianus</i> em função da temperatura e concentração de substrato.....	55
Figura 6	Otimização das condições experimentais temperatura (—) e substrato (....) para a fermentação empregando a levedura <i>K. marxianus</i>	57
Figura 7	Ajuste do modelo aos dados experimentais para a condição otimizada da levedura <i>K. marxianus</i> , Substrato, R2 0,99, modelo (—); S experimental (+); Produto, R2 0,93, modelo (●), experimental (■); Biomassa, R2 0,97, X modelo (- -) e experimental (◇).	58

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura 1	Gráficos do perfil cinético das fermentações empregando <i>K. marxianus</i> : (A) fermentação controle, (B) fermentação com remoção a vácuo: consumo de glicose (★), produção de etanol (△), biomassa (—*—), ácido acético (●) e glicerol (▼).....	69
Figura 2	Foto da levedura <i>K. marxianus</i> em microscopia eletrônica de varredura (MEV), ampliadas 5000X. Células antes da utilização do vácuo (A) e células após a extração de etanol por vácuo (B).	72
Figura 3	Comparação dos perfis cinéticos para P modelo (—), P experimental (○), S modelo (— →) e S modelo (△) entre as abordagens: (A) Abordagem 1 Controle; (B) Abordagem 1 Vácuo; (C) Abordagem 2 Controle; (D) Abordagem 2 Vácuo.	74
Figura 4	Gráfico da produtividade de etanol na segunda fase de fermentação por <i>K. marxianus</i> com extração a vácuo considerando o tempo morto da batelada, Q_P batelada simples (—) e Q_P extração (—).	75

LISTA DE ABREVIATURAS

S	= Valores experimentais do substrato (glicose);
X	= Valores experimentais do crescimento celular;
P	= Valores experimentais do produto (etanol e/ou glicerol e ácido acético);
$\hat{S}$	= Valores estimados pelo modelo do substrato (glicose);
$\hat{X}$	= Valores estimados pelo modelo do crescimento celular;
$\hat{P}$	= Valores estimados pelo modelo do produto (etanol e/ou glicerol e ácido acético);
S_m	= Valores máximos obtidos experimentalmente para o substrato (S);
X_m	= Valores máximos obtidos experimentalmente para o crescimento celular (X);
P_m	= Valores máximos obtidos experimentalmente para o produto (P);
SQR	= Soma quadrática ponderada da regressão;
GLR	= Graus de liberdade da regressão;
SQr	= Soma quadrática ponderada dos resíduos;
GLr	= Graus de liberdade dos resíduos;
SQep	= Soma quadrática ponderada do erro puro;
GLEp	= Graus de liberdade do erro puro;
F	= Valor de F (Fischer);
R^2	= Coeficiente de determinação;
R^2	= Coeficiente de correlação máximo;
m	= Índice da manutenção celular;
r_x	= Índice da velocidade máxima de crescimento celular;
μ_{max}	= Índice da velocidade específica máxima de crescimento celular;
k	= Constante da velocidade da reação;
$Y_{P/S}$	= Rendimento em etanol;
$Y_{X/S}$	= Rendimento em células;
n	= Expoente do termo de inibição não linear.

1 INTRODUÇÃO

O campo da Biotecnologia está em constante crescimento, uma vez que desperta grande interesse do setor industrial, por auxiliar na obtenção de produtos de alto valor agregado e com redução de custos. Nas indústrias em que o produto é obtido por meio de fermentação, a escolha de microrganismos resistentes às injúrias do processo é fundamental para garantir a qualidade do produto e maiores rendimentos e, consequentemente, maior lucro ao setor.

As leveduras vêm sendo utilizadas ao longo do tempo nos processos industriais na obtenção de produtos alimentícios e farmacológicos, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* predominantemente a mais utilizada na produção de etanol de primeira geração (1G), a partir da fermentação do caldo de cana. Por outro lado, a levedura *Kluyveromyces marxianus* vem despertando interesse industrial por sua diversidade metabólica e tem se mostrado muito promissora para produção de etanol de segunda geração, devido à sua capacidade de assimilação de diferentes açúcares, por ter um amplo espectro de termotolerância e uma elevada taxa de crescimento.

O etanol de segunda geração é uma fonte de energia alternativa oriunda da biomassa vegetal e sua produção é estratégica para o setor automotivo. No Brasil as atividades agrícolas e a agroindústria são grandes geradoras de resíduos e ou subprodutos vegetais, ou seja, de biomassa que pode ser transformada em energia.

Esses materiais constituem as fibras vegetais que são compostas por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, cuja hidrólise resulta no rompimento das fibras, gerando açúcares de menor massa molar que podem ser utilizados como substrato para fermentações e produção de etanol de segunda geração. Os açúcares provenientes da fração hemicelulósica são em sua grande maioria pentoses (xilose e arabinose). Entretanto, tornar disponível as unidades de glicose provenientes da fração celulósica exige a superação de alguns entraves: pré-tratamentos com a utilização de ácidos, comumente utilizados para a quebra dos açúcares provenientes da fração hemicelulósica, requerem uma alta concentração de ácidos o que prejudicaria o material dos reatores e levaria à formação de inibidores. Já a hidrólise enzimática é a mais estudada e realizada por meio reações catalisadas por um complexo enzimático denominado de celulases, porém, têm custo elevado. Por outro lado, os melhores rendimentos são alcançados quando a hidrólise e a fermentação acontecem concomitantemente, ou seja, a sacarificação simultânea à fermentação (SSF). Entretanto, a condução do processo SSF requer leveduras termotolerantes, capazes de suportar temperaturas próximas a 50 °C,

temperatura ótima para atuação das celulasas. Outra dificuldade para a produção de etanol é o seu acúmulo no meio, acarretando na inibição pelo produto durante o processo fermentativo. Apesar da sua reconhecida termotolerância, há poucos relatos na literatura de pesquisas sobre o comportamento de *K. marxianus* frente a outros fatores de estresse, como a concentração inicial de substrato e a presença de etanol.

Sendo assim, dada a necessidade iminente em contribuir com novas alternativas para a produção de etanol a partir da fração celulósica, este trabalho teve como objetivo avaliar o processo fermentativo da levedura *K. marxianus* ATCC 36907, em meio semidefinido com diferentes concentrações iniciais de substrato (glicose) e temperatura, utilizando a modelagem fenomenológica, bem como avaliar o efeito da remoção do etanol do meio de cultivo sobre o desempenho fermentativo dessa levedura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de etanol no Brasil

No Brasil, as indústrias de açúcar e álcool estiveram sempre intimamente ligadas desde o tempo do descobrimento. Deduz-se que a produção de álcool iniciou na capitania de São Vicente, porque nela foi montado o primeiro engenho de açúcar no país, após a vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar trazidas da Ilha da Madeira, em 1532. Porém, a primeira destilaria de álcool anidro só foi construída no país em 1931 e, devido à crise decorrente da I Guerra Mundial, o governo brasileiro estabeleceu a adição de 5% de álcool à gasolina, como alternativa para reduzir a importação de combustível (BORZANI *et al.*, 2008).

Em resposta às crises do petróleo da década de 70, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool - Proálcool. Esse programa, lançado em 1975, tinha como objetivo garantir o suprimento de combustível para o país, substituir a gasolina por um combustível renovável e encorajar o desenvolvimento tecnológico da indústria da cana-de-açúcar e do álcool, o qual deu origem nos dias de hoje ao maior sistema de produção de energia comercial a partir da biomassa do mundo. O Proálcool obteve grande resultados, pois alcançou que, durante parte da década de 1980, mais de 70% da frota nacional de automóveis fosse movida a álcool hidratado. A partir de 1989, o programa sofreu uma crise prolongada, mas o álcool ainda continua sendo um importante componente do combustível usado no Brasil, com um percentual atual de 27% de mistura à gasolina, percentual esse inédito no mundo.

Em 1994, o Brasil tinha mais de 4,6 milhões de carros movidos a álcool. Contudo, quando os preços do petróleo começaram a cair, a partir do final da década de 1980, o governo reduziu os subsídios e, assim, começou o declínio da produção. No final da década de 1990, a venda de carros a álcool representava apenas 1%. O etanol só ressurgiu em meados dos anos 2000 e, atualmente, estima-se que 85% dos automóveis em circulação no país sejam do tipo *Total Flex* (LIMA, 2004; SILVA, 2007, NOVACANA, 2015). Logo, a motivação principal das políticas de estímulo ao desenvolvimento de energia renováveis nem sempre foi predominantemente ambiental. Pelo contrário, na maior parte das vezes o motivo esteve associado à segurança energética, isto é, à disponibilidade e acessibilidade dos combustíveis necessários para se fazer movimentar a frota de veículos e sua produção (FARINA, 2013).

As vendas de etanol, pelas unidades produtoras da região centro-sul do Brasil, destinadas ao mercado doméstico totalizaram 2,30 bilhões de litros, em março de 2015, que corresponde a uma aumento de 21,80% sobre o mesmo período do ano anterior. Esse forte crescimento deve-se à expansão recorde do volume comercializado de etanol hidratado: 1,44 bilhão de litros, o maior valor para este mês na história da sua produção. As vendas internas de etanol anidro, por sua vez, somaram 866,06 milhões de litros, ante 905,04 milhões de litros registrados em março de 2014 (NOVACANA, 2016).

No acumulado de abril de 2014 a março de 2015, o volume global comercializado de etanol alcançou 25,17 bilhões de litros, praticamente o mesmo valor contabilizado no mesmo período do ano safra anterior - 25,67 bilhões de litros. Desse volume, 23,67 bilhões de litros direcionaram-se ao abastecimento interno (alta de 2,45% sobre o resultado da última safra), sendo 9,62 bilhões de litros de etanol anidro e 14,05 bilhões de litros de etanol hidratado. No tocante às exportações acumuladas, totalizaram 1,50 bilhão de litros na safra 2014/2015, expressiva queda de mais de 1 bilhão de litros sobre o montante exportado no ciclo 2013/2014 (2,57 bilhões de litros) (UNICA, 2015).

No Brasil, a maior parte do etanol é produzido por um processo de fermentação em batelada alimentada com reciclo de fermento (em torno de 80% do total). O restante do etanol é produzido por fermentação contínua multiestágio com reciclo de fermento, cujo processo é baseado na fermentação contínua. O processamento industrial da cana para etanol, como realizado hoje, é uma tecnologia que já atingiu sua maturidade plena. Houve grandes avanços entre 1970 e 1990, mas, nos últimos anos, os ganhos de produtividade e eficiência foram pequenos. Desse modo, o setor industrial deverá evoluir de forma mais destacada, incorporando tecnologias mais radicalmente diferentes e certamente com a implementação de novos produtos (BORZANI *et al.*, 2008; NAE, 2005).

Para viabilizar os avanços tecnológicos na direção do aumento da produção de etanol, nas últimas décadas intensificaram os estudos referentes ao uso da biomassa para a produção de etanol de segunda geração (2G). A implantação dessa tecnologia em indústrias sucroalcooleiras no Brasil requereria menor investimento, o que tornaria muito promissora a produção de etanol celulósico nessas unidades (SCALCOOL *et al.*, 2010). Para o Brasil, o desenvolvimento dessa tecnologia é de grande importância, pois representa a manutenção do domínio tecnológico no setor energético e a possibilidade de aprimorar a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, principal matéria-prima utilizada no país (CTBE, 2014).

Nas últimas décadas, intensificou-se o interesse pela produção de etanol de segunda geração no Brasil, devido à abundância de resíduos gerados pela agroindústria. A empresa Bioflex Agroindustrial Ltda., unidade industrial da Granbio, foi a primeira empresa a iniciar a produção do E2G no Brasil, com a usina Bioflex I localizada em São Miguel dos Campos, no Estado de Alagoas, em setembro de 2014. Com a capacidade de produzir 82 milhões de

litros por ano, a unidade utiliza palha e bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima. Não é uma usina integrada a uma unidade de E1G e, segundo os seus proprietários, a meta é atingir um preço do bioetanol 20% mais baixo do que o E1G (NOVACANA, 2016).

Em novembro de 2014, a empresa Raízen iniciou sua primeira planta industrial para a fabricação, em escala comercial, do biocombustível de segunda geração em Piracicaba (SP), inaugurada em julho de 2015. A Raízen prevê em 10 anos a construção de mais 7 fábricas de E2G no país. Em 2016, a usina obteve sua primeira safra com produção contínua de etanol de segunda geração (2G), produzindo 7,1 milhões de litros de etanol. A meta de produção para a safra 2016/2017, que se inicia em abril deste ano, é de 15 a 20 milhões de litros. A empresa pretende atingir uma produção de 42 milhões de litros de etanol 2G, até 2018, apostando em custos de produção menores do que os do 1G, até o fim da década. Segundo estudo divulgado em 2015 pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), em parceria com o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), a redução de custos deve ocorrer mesmo em 2020, quando produzir o 2G custará entre R\$ 0,70 e R\$ 0,50 por litro, enquanto o custo do 1G será: R\$ 0,90 a R\$ 0,70 (NOVACANA, 2016; NOVACANA, 2017).

2.2 Princípio da utilização da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração

Nas últimas décadas tem havido um grande esforço em utilizar o bagaço de cana-de-açúcar ou outros resíduos agroindustriais para a produção de etanol de segunda geração, ou seja, obtido a partir dos açúcares derivados da biomassa lignocelulósica. O etanol de segunda geração deve trazer uma nova onda de expansão no segmento, que perdeu competitividade, nos últimos anos, devido à política do governo de controle de preços da gasolina (UNICA, 2015).

De fácil obtenção e presente em altas quantidades na natureza, os materiais lignocelulósicos constituem uma das principais fontes de matéria orgânica do planeta. Os principais componentes das fibras vegetais são celulose, hemicelulose e lignina. As plantas lenhosas típicas são constituídas de 40-50% de celulose, 20-30% de hemicelulose e 20-28% de lignina, além de outras substâncias em menores teores (ARAÚJO; WALDMAN; DE PAOLI, 2008). Na Figura 1, apresenta-se uma esquematização geral de uma fibra vegetal.

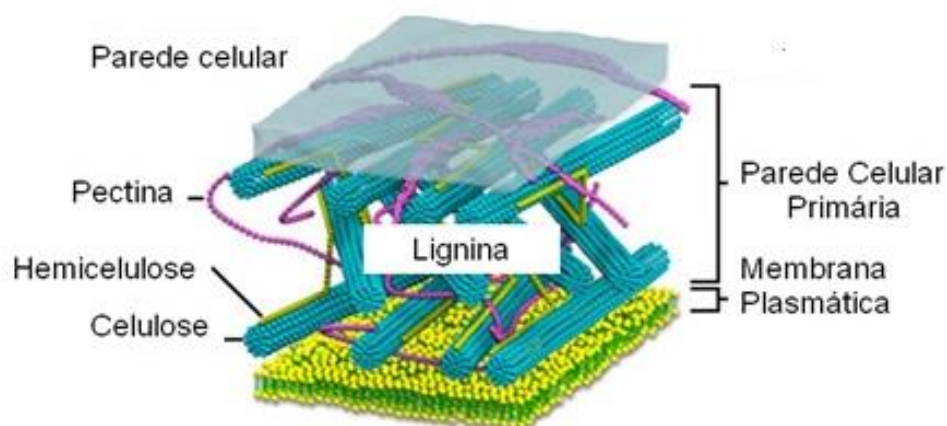


Figura 1 Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.

Fonte: RURAL PECUÁRIA (2016).

A celulose, principal componente da parede celular dos vegetais, é um polissacarídeo linear, formado por unidades anidroglicosídicas interligadas por ligações do tipo β - 1,4 e de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. É uma substância fibrosa, resistente, insolúvel em água e constitui a maior parte da massa da madeira (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002; GOLDSTEIN *et al.*, 1978) (Figura 2). As cadeias de celulose têm uma tendência de se ligarem entre si por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals intra e intermolecular, através dos grupos de hidroxila em suas unidades de glicose, o que promove agregações de celulose e levam a uma estrutura cristalina (PÉREZ *et al.*, 2002).

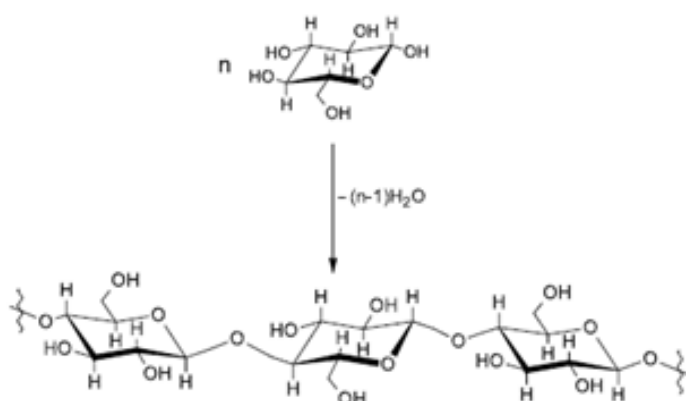


Figura 2 Estrutura química da celulose.

Fonte: Moraes, Nascimento e Melo (2005).

Ligada fortemente à celulose por pontes de hidrogênio está a hemicelulose, que é formada por vários monossacarídeos polimerizados, incluindo carboidratos de cinco carbonos (como xilose e arabinose), carboidratos de seis carbonos (como galactose, glicose e manose), ácido 4-O-metil glucurônico e resíduos de ácido galacturônico. A unidade mais

abundante na hemicelulose, em vegetais lenhosos, é a xilose, que se une por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4 (SILVA *et al.*, 2009). A hemicelulose é bastante hidrofílica, contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, com natureza altamente amorfa e grau de polimerização variando entre menos de 100 a no máximo 200. Ela difere da celulose no fato de apresentar ramificações com cadeias laterais curtas e, em contraste com a celulose, os polímeros são mais facilmente hidrolisáveis (PÉREZ *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2009). Na Figura 3 está demonstrada a estrutura molecular dos açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.

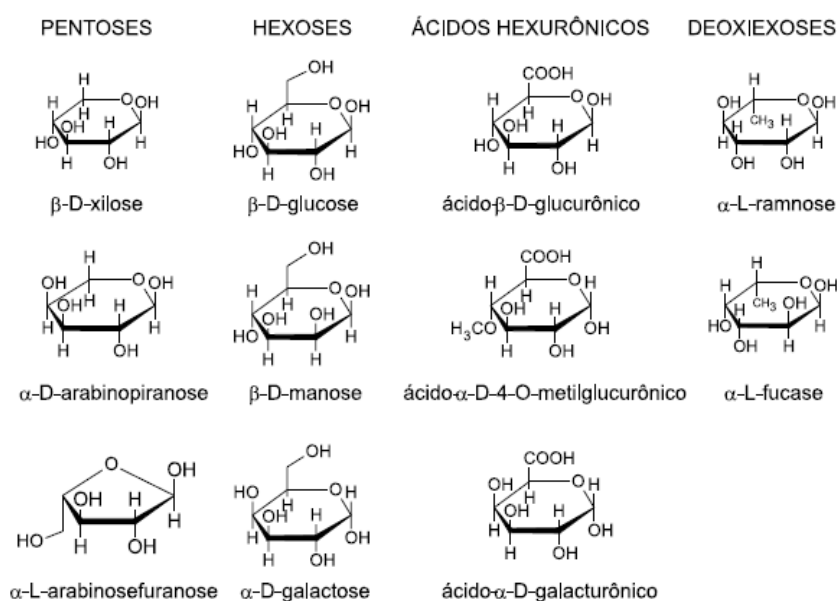


Figura 3 Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.

Fonte: Moraes, Nascimento e Melo (2005).

A lignina é um polímero fenólico cuja função é conferir rigidez, impermeabilidade e resistência mecânica e microbiológica aos tecidos vegetais (TSAO, 1986). Sua estrutura é tridimensional e complexa, altamente ramificada, constituída de um polímero formado por ligações cruzadas, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano (JOHN; THOMAS, 2008), características químicas que a tornam insolúvel em água e altamente recalcitrante (WONG, 2009) (Figura 4).

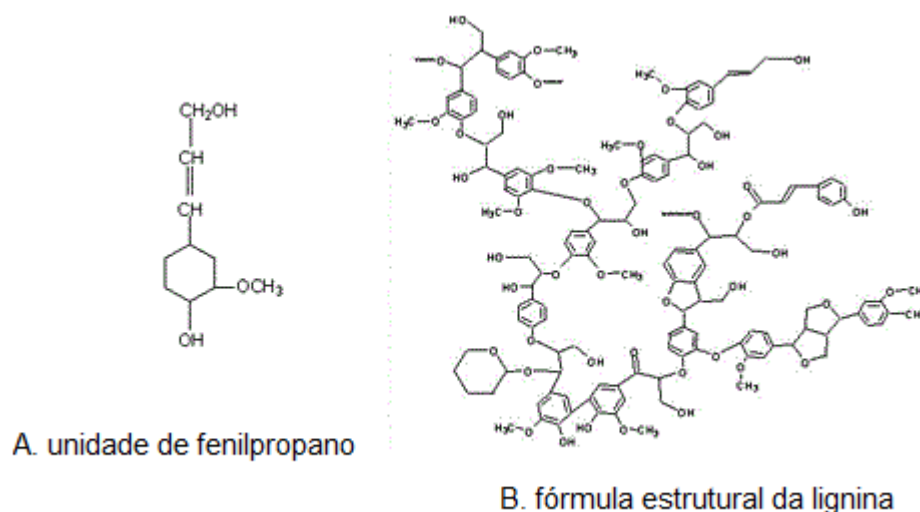


Figura 4 Fórmula estrutural da lignina: (A) unidade de fenilpropano; (B) estrutura química da lignina.

Fonte: Naturplás (2012).

As tecnologias para a obtenção de etanol de segunda geração, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis e sua posterior fermentação. Para executar essa tarefa, o processo de hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina (PEREIRA JR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

2.3 Etapas da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, pré-tratamento e hidrólise da biomassa

Os materiais lignocelulósicos apresentam teor de celulose que varia de 20 a 60% e de hemicelulose de 20 a 40%, dependentes do tipo de biomassa vegetal (STICKLEN, 2008). Tais frações são passíveis de serem utilizadas para a produção de etanol, para isso é necessário um fracionamento seletivo, o que implica a ruptura do complexo lignina-celulose-poliose e a remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento e deslignificação. Esses processos de separação podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação desses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim a que se destina o processo. Pré-tratamentos que combinam métodos físicos, químicos e enzimáticos são mais eficazes (GHOSH; SINGH, 1993; RAMOS; SADDLER, 1994; RUDOLF *et al.*,

2007). A Figura 5 esquematiza de forma simplificada a separação dos principais componentes dos materiais lignocelulósicos e os processos utilizados, citados na literatura.

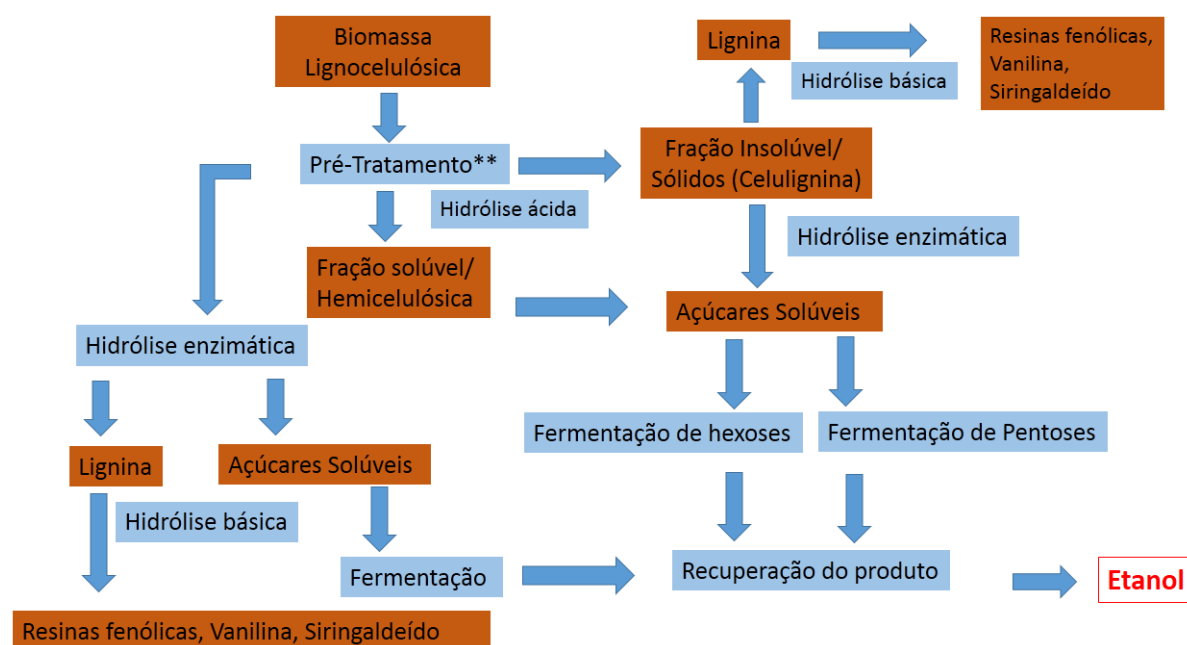


Figura 5 Esquema simplificado das etapas de produção de etanol de segunda geração.

Nota: *Ver Tabela 1, sobre tipos de pré-tratamentos.

A utilização de materiais lignocelulósicos para produzir etanol envolve basicamente as etapas de pré-tratamento, hidrólise da celulose e hemicelulose em açúcares monoméricos, fermentação dos açúcares em etanol e, finalmente, destilação e purificação do etanol (JAFARI *et al.*, 2011).

Para a utilização mais eficiente dos polissacarídeos da celulose, haja vista sua estrutura rígida e complexa é necessário um pré-tratamento a fim de remover eficientemente a porção hemicelulósica e a lignina como estratégia para facilitar o rompimento das fibras, e assim aumenta-se a área superficial da biomassa, expondo e disponibilizando a molécula de celulose (SANTOS *et al.*, 2008; MOSIER *et al.*, 2005).

Os pré-tratamentos físicos podem ser classificados em: redução mecânica, micro-ondas e explosão por vapor. O pré-tratamento de redução mecânica é baseado na redução do tamanho da partícula através de moagem, aumentando o desempenho da enzima pelo aumento da área superficial e, em alguns casos, pela redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose (OGEDA; PETRI, 2010). O método de pré-tratamento com micro-ondas utiliza a alta eficiência do aquecimento de um forno de micro-ondas. As ondas eletromagnéticas promovem vibrações sobre as ligações polares existentes na estrutura lignocelulósica facilitando o rompimento das estruturas (SARKAR *et al.*, 2012). A explosão

por vapor consiste no tratamento da biomassa com vapor saturado de água, sob alta pressão, em seguida a pressão é diminuída repentinamente, provocando a explosão das fibras no momento da descompressão (SUN; CHENG, 2002).

Sem dúvida, devido ao baixo custo e fácil empregabilidade, pré-tratamentos químicos são mais estudados e empregados. Os processos químicos apresentam características variáveis, sendo empregados ácidos (sulfúrico, clorídrico), bases (hidróxidos de sódio, potássio e de cálcio), líquidos iônicos (sais orgânicos compostos por cátions e ânions), solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona, etilenoglicol e álcool tetrahidrofurfúrico) (ALVIRA *et al.*, 2010). O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído tem se mostrado mais eficaz do que outros tratamentos ácidos. Pré-tratamentos que combinam métodos físicos e químicos têm sido apontados na literatura como os mais eficientes. Em pré-tratamentos catalisados por ácidos a camada de hemicelulose é hidrolisada, enquanto que nos pré-tratamentos catalisados por bases parte da lignina é removida e a hemicelulose tem que ser hidrolisada pelo uso de hemicelulases (OGEDA; PETRI, 2010).

O pré-tratamento biológico consiste na utilização de enzimas produzidas por microrganismos, como espécies de fungos, a fim de degradar a lignina da biomassa lignocelulósica, aumentando a acessibilidade da celulose para posterior hidrólise enzimática (SHI *et al.*, 2009).

Tabela 1 Principais métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol

Métodos físicos	Métodos químicos	Métodos biológicos	Métodos combinados
Vapor	Ozonólise	Pré-tratamento por fungos (de decomposição branca, parda)	Explosão a vapor
Radiação (micro-ondas)	Hidrólise com ácido diluído (H_2SO_4 , HCl, HNO_3 , H_3PO_4)	Pré-tratamento Bioorganossolv (tratado com <i>Ceriporiopsis subvermispore</i> seguido de etanólise)	Hidrotérmico
Moinho de bola e moinho tipo martelo Barra giratória	Hidrólise com ácido concentrado (H_2SO_4) Ácido Acético Hidrólise alcalina ($NaOH$, $Ca(OH)_2$)	Uso de enzimas comerciais (celulases)	SO_2 e vapor NO_2 e irradiação Alcalino e moinho de bolas
Umidificação e calor úmido	Amônia		Amônia e vapor (AFEX)
Pirólise	SO_2 Deslignificação oxidativa Processo Organossolv		Explosão com CO_2 Hidrotermal alcalino

Nota: Adaptado de Silva (2009) e Gonçalves (2011).

A hidrólise enzimática da celulose é o procedimento mais comum para a redução dos polissacarídeos em monossacarídeos como a glicose. Nesse procedimento, os materiais são submetidos à redução dos polímeros, usualmente através de uma mistura de diversas enzimas (celulases). Os três maiores grupos de celulases que estão envolvidas no processo de hidrólise são as endoglucanases; exoglucanases e β -glucosidases (SUN; CHENG, 2002). As exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91) hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades, liberando celobioses, as endo 1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória e as 1,4- β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir celuoligossacarídeos (ERIKSSON; KARLSSON; TJERNELD, 2002). A hidrólise enzimática da celulose, geralmente, é conduzida em condições brandas de pH e temperatura e, dessa forma, não causa problemas de corrosão e permite maiores rendimentos (75-85%), possibilitando o processo de fermentação (PHILIPPIDIS; SMITH, 1995; MOSIER *et al.*, 2005; ALVIRA *et al.*, 2010). Na natureza há vários microrganismos capazes de produzir celulases, pois se desenvolvem na matéria orgânica e a utilizam como fonte de carbono principal, como as bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium* e fungos filamentosos, como os fungos do gênero *Trichoderma* (usualmente utilizados em escala industrial para a produção de celulases) e do gênero *Aspergillus* (LYND *et al.*, 2002).

Entretanto, a hidrólise ácida é bastante eficiente. A quantidade de açúcares fermentescíveis pode ser recuperada em 90% da biomassa vegetal e, em comparação com a hidrólise enzimática, torna-se mais viável economicamente (NEVES, 2001). A hidrólise ácida da celulose é uma alternativa bastante usada além de ser usada a mais tempo. Azzini *et al.* (1987) realizaram uma hidrólise com ácido sulfúrico diluído em 1%, tempo de reação sob refluxo em chapa de aquecimento por 120 minutos e uma relação entre o peso seco da amostra e o volume da solução (1:30) e obtiveram rendimento de até 15 L de etanol por 100 kg de cavacos de bambu e 56% de fibra celulósica, que foi destinada à fabricação de papel. Silva *et al.* (2014) realizaram hidrólise com ácido sulfúrico a 2% do bagaço de cana-de-açúcar também pré-tratado com ácido sulfúrico a 1% e obtiveram 70 gL⁻¹ de glicose no hidrolisado celulósico, após a concentração.

Porém, a hidrólise ácida produz vários compostos inibidores que, potencialmente, prejudicam o processo fermentativo, como os compostos fenólicos e o ácido acético (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). Esses compostos são derivados da própria constituição dos materiais lignocelulósicos, o ácido acético origina-se dos grupamentos acetil da fração hemicelulósica e os compostos fenólicos são originados dos materiais lignocelulósicos ricos em açúcares (a xilose dá origem ao furfural e a glicose ao hidroximetilfurfural). (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Além disso, a natureza corrosiva do ácido requer

o uso de ligas caras na construção de canos e trocadores de calor nos biorreatores (OGEDA; PETRI, 2010).

2.3.1 Fermentação dos açúcares provenientes da biomassa lignocelulósica

A fermentação etílica é um processo bioquímico que ocorre no citoplasma do microrganismo, responsável por converter uma fonte de carboidrato em etanol. As leveduras são capazes de converter glicose em etanol e gás carbônico, porém o número de espécies envolvidas em processos industriais de produção de etanol é bastante reduzido (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002 ; OSTROWSKI; WOODS; RICHARD, 2006).

Para o processo de produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos, é utilizada a atividade de microrganismos eficientes e adaptados às condições de realização desse processo (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010).

No processo de fermentação da fração hemicelulósica, proveniente da hidrólise ácida, pré-tratamento mais comumente utilizado, o hidrolisado é rico em pentoses (xilose e arabinose). Esses carboidratos não são diretamente fermentescíveis por leveduras industriais, sendo a biotransformação dessas pentoses a etanol um dos desafios mais importantes a ser resolvido no âmbito científico e tecnológico (PARISI, 1989). As espécies de leveduras mais promissoras que vem sendo estudadas para a fermentação das pentoses são a *Candida shehatae*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* e a *Pachysolen tannophilus* (KUHAD *et al.*, 2011). A assimilação da xilose por leveduras está condicionada à habilidade que determinadas leveduras apresentam em sintetizar enzimas específicas para o metabolismo da xilose (NIGAM, 2001). As leveduras convertem a xilose a xilitol desidrogenase, por duas reações de oxirredução realizadas pelas enzimas xilose redutase (XR) e pela xilitol desidrogenase (XDH), em seguida, a xilulose, a qual sofre uma fosforilação para a xilulose 5-fosfato por meio da xilulose quinase, resultando nesta primeira etapa o consumo de ATP, essa segue para a via das pentoses fosfato, na qual é convertida a piruvato que segue para via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Em condições anaeróbias ou de baixa oxigenação, o piruvato é convertido em etanol por catálise com duas enzimas: piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase. Em condições de aerobiose, o piruvato é oxidado na cadeia respiratória (fosforilação oxidativa), pelo Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (Krebs), como demonstrado na Figura 6 (OLIVEIRA, 2010; SILVA, 2007; BRITO, 2000; AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

As enzimas XR e XDH se apresentam, então, como catalisadores-chave no metabolismo de xilose, sendo altamente dependentes de coenzimas cuja regeneração está ligada ao processo respiratório celular. Dessa forma, é importante determinar um nível de

oxigênio que permita altas taxas de produção de etanol, concomitante com baixo crescimento celular, sem prejuízo da viabilidade e capacidade produtora da célula (KUHAD et al., 2011; OLIVEIRA, 2010; AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

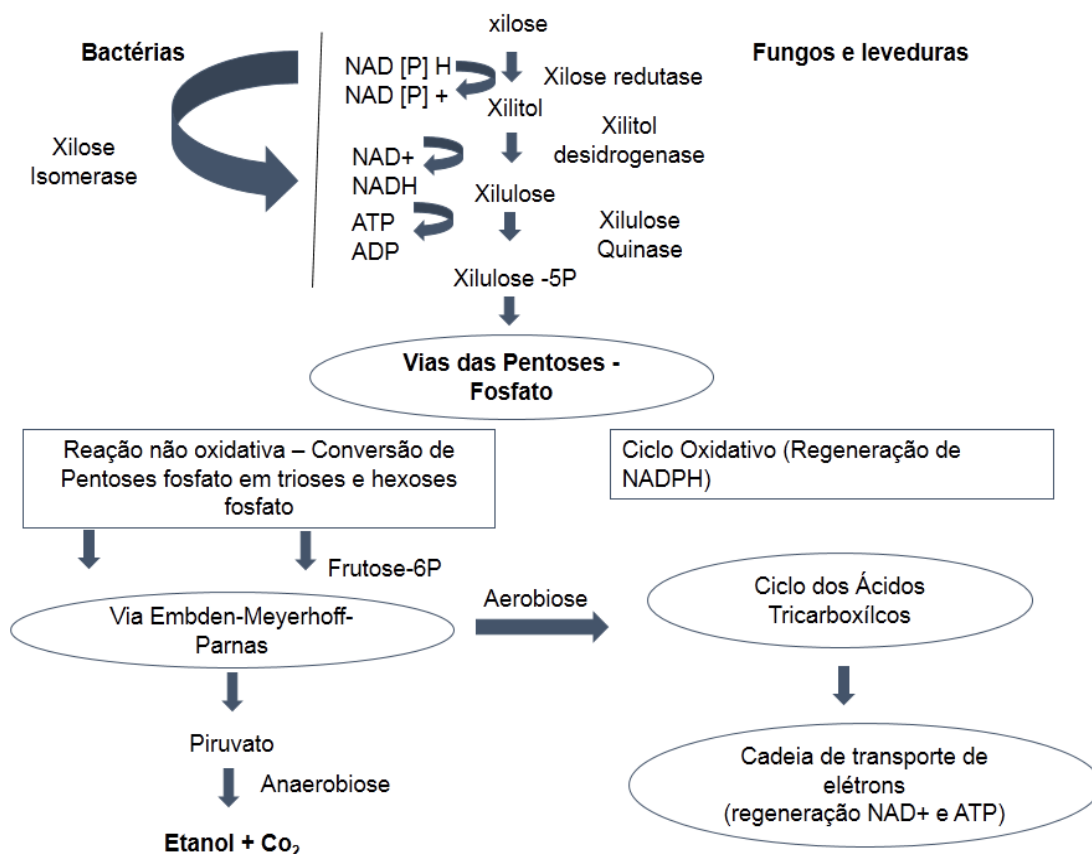


Figura 6 Esquema simplificado do metabolismo de xilose em fungos e bactérias para a produção de etanol.

Nota: Adaptado de Oliveira (2010) e Kuhad et al. (2011).

Com relação à produção de bioetanol a partir da fração celulósica, após um pré-tratamento da biomassa para a remoção da hemicelulose e lignina, a celulose é submetida mais comumente à hidrólise enzimática para a transformação dos polissacarídeos em monossacarídeos como a glicose (SUN; CHENG, 2002). A fermentação da glicose proveniente da celulose pode ser conduzida de forma sequencial ao processo de hidrólise enzimática denominada (SHF) ou ainda pode ocorrer de maneira simultânea, ou seja, sacarificação simultânea à fermentação (SSF) (OGEDA; PETRI, 2010).

No processo SHF, o material lignocelulósico obtido após o pré-tratamento é submetido à hidrólise enzimática por um período que varia de 48 a 96 h. Após a sacarificação da celulose, o hidrolisado resultante é fermentado e convertido a etanol em um reator separado (SANCHEZ; CARDONA, 2008). O problema na operação da SHF é que a glicose e a celobiose permanecem no mesmo meio que a celulose e as celulasas, esses

mono e dissacarídeos inibem a ação das enzimas (OGEDA; PETRI, 2010). Outra desvantagem do SHF é a possibilidade de contaminação. Como a etapa de hidrólise requer tempos muito longos, o hidrolisado rico em açúcares torna-se uma fonte disponível para fermentações secundárias (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

A vantagem da utilização de hidrólise e fermentação de forma separada é que ambos processos podem ser otimizados individualmente (por exemplo, temperatura ótima de 45-50 °C, durante a hidrólise e 30 °C para a fermentação), visto que ocorrem em reatores diferentes (DASHTBAN; SCHRFAT; QIN, 2009). A hidrólise enzimática é conduzida em condições amenas de pH (4,8) e de temperatura (45-50 °C) e exibe elevada especificidade, o que elimina a chance de ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) para as células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado. Porém, sua maior limitação está relacionada ao elevado custo de produção dos biocatalisadores (DASHTBAN; SCHRFAT; QIN, 2009).

Uma opção mais atrativa para produção de etanol lignocelulósico é a realização da hidrólise enzimática juntamente com a fermentação, ao invés da forma sequencial, já que resulta em um processo mais rentável (KADAR; SZENGYEL; RECZEY, 2004). No caso do processo SSF, as enzimas e as leveduras são adicionadas ao mesmo tempo no reator, o que reduz o tempo de processamento e a inibição das celulasas pelo acúmulo de seus produtos (celobiose e glicose), uma vez que a glicose liberada por hidrólise é rapidamente convertida a etanol pelos microrganismos da fermentação (SANTOS; SOUTO-MAIOR; GOUVEIA, 2010; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996; BALLESTEROS *et al.*, 2004). Além disso, o processo SSF é menos complexo e requer menor investimento de capital, quando comparado ao SHF, pois reduz o número de reatores e diminui o risco de contaminação, devido à manutenção de baixas concentrações de açúcar livre no meio reacional (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

No trabalho realizado por Santos *et al.* (2008), comparando os dois tipos de processo: SHF e SSF, para a produção de etanol a partir de bagaço de cana deslignificado, a maior produtividade volumétrica ($0,3 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ocorreu em SSF, com uma etapa de pré-sacarificação em 16 horas de fermentação, com conversão de celulose a etanol em 60%, em 24 horas, enquanto que a SHF apresentou produtividade de $0,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Camargo, Gomes e Sene (2014) estudaram a SSF, empregando como agente de fermentação a levedura *K. marxianus*, e relataram rendimentos promissores, sendo $27,88 \text{ g L}^{-1}$ de etanol, rendimento de $0,47 \text{ g g}^{-1}$, produtividade de $0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e uma conversão enzimática de 87,06%.

Por outro lado, as principais desvantagens da SSF são a necessidade de encontrar condições favoráveis (por exemplo, temperatura e pH), tanto para a hidrólise enzimática como para fermentação e a dificuldade de reciclar os organismos e as enzimas

(OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008). No entanto, leveduras termotolerantes têm sido investigadas para que sejam capazes de produzir etanol em temperaturas elevadas. Isolados da *Kluyveromyces marxianus* estão sendo sugeridas como alternativa viável para substituir a *Saccharomyces cerevisiae* (NONKLANG *et al.*, 2008).

2.3.2 *Kluyveromyces marxianus*

Para um bom desempenho na indústria, as leveduras devem apresentar algumas características, como: elevada velocidade de fermentação, tolerância ao álcool, bom rendimento, resistência e estabilidade (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999).

As leveduras têm uma longa tradição de aplicação em Biotecnologia e a *Saccharomyces cerevisiae* tem sido a representante dominante e mais utilizada na fermentação e produção industrial de etanol, sendo capaz de fermentar glicose, manose, frutose, galactose em condição de anaerobiose e pH mais baixo (VAN MARIS *et al.*, 2006). Entretanto, estudos atuais e abordagens moleculares mais modernas têm seu foco renovado sobre a Biologia e o potencial industrial de outras leveduras. A levedura *Kluyveromyces marxianus* pertence à subclasse dos *Saccharomycotina*, antigo *Hemiascomycetes*, que compreende leveduras unicelulares e elípticas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011), como pode ser observado na Figura 7. Na Tabela 2 está a descrição de algumas características do metabolismo das espécies de *Kluyveromyces*.

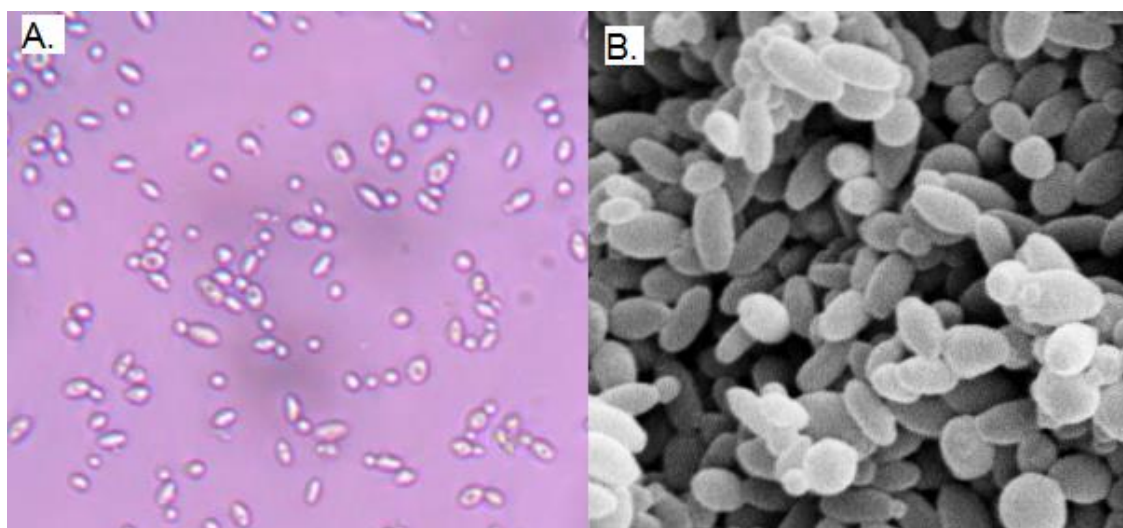


Figura 7 Morfologia da levedura *K. marxianus* ATCC 36907 em microscopia óptica, aumento de 100x (A) e em microscopia eletrônica, ampliação de 5000X (B).

Tabela 2 Comparação entre metabolismo de espécies de *Kluyveromyces* e *Saccharomyces cerevisiae*

Leveduras	Assimilação de lactose	Fermentação de glicose	$\mu_{\max}$	Temperatura máxima (°C)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	0,37	35
<i>Kluyveromyces aestaurii</i>	-	+	n/a	35
<i>Kluyveromyces nonfermentans</i>	-	-	n/a	42
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	-	+	0,43	37
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	+	0,5	37
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	0,6	52
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	-	+	n/a	35

Nota: *n/a não analisado.

Fonte: Lane e Morrissey (2010).

A *K. marxianus* possui características que a tornam interessante em aplicações industriais por apresentar taxa mais elevada de crescimento, ser termotolerante e possuir a capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares (LANE; MORRISEY, 2010; LANE *et al.*, 2011).

Linhagens pertencentes à espécie *K. marxianus* têm sido isoladas de uma grande variedade de *habitats*, o que resulta em uma alta diversidade metabólica e um substancial grau de polimorfismo intraespecífico. Como consequência, diversas aplicações biotecnológicas têm sido investigadas com esta levedura, como a produção de enzimas (β -galactosidase, β -glicosidase, e poligalacturonases, inulinase entre outras), de proteínas para alimentação animal ou humana, de compostos aromáticos como fenil-etanol e de biocombustíveis como o etanol (FONSECA *et al.*, 2008). Por ser classificada como *Generally regarded as safe* (GRAS) e *Qualified presumption of safety* (QPS), essa levedura vem despertando interesse na indústria alimentícia e farmacêutica graças a sua capacidade de produzir enzimas de interesse no setor, como a β -galactosidase, que desempenha importante papel no processamento de produtos lácteos, como a obtenção de leite com baixo teor de lactose, para consumo por indivíduos intolerantes e na prevenção da cristalização em produtos de laticínio (SANTIAGO *et al.*, 2004). Pinheiro, Belo e Mota (2003), Bellaver *et al.* (2004) e inúmeros outros trabalhos produziram essa enzima usando o soro de leite como substrato pra a levedura *K. marxianus*.

A *K. marxianus* é classificada como Crabtree negativa, enquanto que *S. cerevisiae* é classificada como positiva. O metabolismo Crabtree é caracterizado quando na presença de excesso de substrato, mesmo em ambientes aeróbios, as enzimas do metabolismo

respiratório são inibidas, devido ao excesso transitório de piruvato e este é transferido para a fermentação alcoólica. No entanto, a *K. marxianus* possui a capacidade de produzir ATP, de forma a direcionar seu metabolismo, preferencialmente, para o ciclo do ácido tricarboxílicos ou por meio da fermentação alcoólica. Portanto, é considerada como uma levedura respiro-fermentativa, ou seja, que é capaz de realizar, simultaneamente, fermentação e respiração, o que dependerá do equilíbrio exato entre essas duas vias. Esse efeito é caracterizado pela fermentação alcoólica em aerobiose, em elevadas concentrações de carboidratos ou cultivos com alta taxa de crescimento. A intensidade desse efeito varia dentre as espécies de *Kluyveromyces*, o que explica a razão de algumas cepas, mas não todas, serem boas produtoras de etanol e, devido a essas características, considera-se que o fator mais importante para a determinação do metabolismo fermentativo da *Kluyveromyces* é a concentração de oxigênio disponível no meio (GONZALÉZ-SISO *et al.*, 2000; PRONK *et al.*, 1996; FONSECA *et al.*, 2008; LANE; MORRISSEY, 2010; DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1986). No entanto, outros autores assumem, a partir de uma comparação entre a produção de CO₂ e o consumo de O₂ em diferentes leveduras, que a taxa de crescimento é o principal fator que aciona a fermentação aeróbia em leveduras aeróbias-respiratórias e aeróbias-fermentativas (FONSECA *et al.*, 2007).

Outra característica peculiar desta levedura é a sua capacidade de crescer num amplo intervalo de temperaturas, variando entre 30 °C e 52 °C (ROSSI *et al.*, 2009; LANE; MORRISSEY, 2010). Assim, com o objetivo de viabilizar o processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF), tem-se buscado o isolamento de leveduras termotolerantes, especialmente as linhagens pertencentes às espécies *S. cerevisiae* e *K. marxianus* (VAN DEN BROEK; DE BRUIJNE; VAN STEVENINCK, 1987, ABRANCHES *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 1998, FONSECA *et al.*, 2008; PESSANI *et al.*, 2011).

A *K. marxianus* IMB3 foi utilizada, na Índia, na produção industrial de etanol de primeira geração a partir de melaço de cana-de-açúcar em regime de batelada e demonstrou rendimentos semelhantes à *S. cerevisiae* e tempos mais curtos de fermentação (20 h) (SINGH *et al.*, 1998). Além disso, a possibilidade do processo fermentativo ocorrer em temperatura mais elevada diminui o risco de contaminação e promove a redução de custos pela contínua evaporação do etanol do mosto sob pressão reduzida (BANAT *et al.*, 1998), o que tem tornado a *K. marxianus* uma boa alternativa para superar esses obstáculos. Ballesteros *et al.* (2004) realizaram SSF para a produção de etanol a partir de diversos materiais lenhosos (álamo, eucalipto, sorgo etc.) tratados inicialmente com explosão a vapor; a fermentação foi conduzida a 42 °C com 15 FPU g⁻¹ de celulase comercial e empregaram a levedura *K. marxianus* estirpe CECT 10875. Esses pesquisadores relataram a obtenção de rendimentos promissores de 50-72% em 72-82 horas, com teor de 16-19 g.L⁻¹ de etanol, dependendo da biomassa lignocelulósica testada.

Apesar da importância dessas características e significativa exploração do setor de Biotecnologia, a investigação do potencial da levedura *K. marxianus* em bioprocessos está apenas emergindo. Com a disponibilidade de novas ferramentas moleculares e de maiores estudos sobre a *K. marxianus*, sobre seu metabolismo e interessantes características celulares, esta provavelmente apresentará grande potencial para se tornar o líder dos processos fermentativos e biotecnológicos (LANE; MORRISEY, 2010).

2.3.3 Fatores de estresse durante o processo fermentativo

Assim como as células do organismo humano necessitam de um meio em equilíbrio para poder regular o meio intracelular, seres unicelulares, como as leveduras, também necessitam de um meio intracelular específico e balanceado, pois qualquer perturbação ao meio pode interferir no metabolismo e danificar as estruturas celulares, alterando gradientes químicos e levando à inviabilidade celular (GASCH et al., 2001). A resposta aos diferentes tipos de perturbação é uma característica fundamental na adaptação dos organismos vivos às condições de estresse geradas nas condições adversas nas quais se encontram (SWAN; WATSON, 1998).

A resposta ao choque térmico é um programa de transcrição antigo e altamente conservado, que resulta na síntese imediata de uma bateria de genes citoprotetores na presença de tensões térmicas e ambientais. Muitos desses genes codificam chaperones moleculares, potentes modeladores de proteínas com capacidade de proteger e de interagir com outras proteínas de transporte da membrana (VERGHESE et al., 2012). A temperatura é o fator de estresse mais comumente estudado, em resposta ao choque térmico em todos os seres vivos, assim como em bactérias e leveduras, ocorrendo a síntese de proteínas específicas denominadas proteínas de choque térmico ou *heat shock proteins* (Hsp), que funcionam como chaperonas nos processos de desnaturação e recuperação de proteínas danificadas (MARESCA; LINDQUIST, 1991). Elas também são sintetizadas em resposta à alteração salina no meio, à concentração de etanol, baixos valores de pH, escassez de nutrientes e presença de metais pesados no meio (KIANG; TSOKOS, 1998), ou seja, elas são sintetizadas em condições adversas para auxiliar na síntese e maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas afetadas pelo estresse metabólico (BUKAU; HORWICH, 1998).

A tolerância cruzada é a capacidade de obtenção de respostas adaptativas a um estresse moderado, resultando numa maior resistência a diferentes fatores estressantes num tratamento subsequente. Essa resposta geral ao estresse envolve funções celulares para proteção celular, metabolismo de energia e produção de proteínas de proteção (HSPs)

ou estocagem de carboidratos como trealose (STANLEY *et al.*, 2010). Células de *S. cerevisiae* submetidas ao choque térmico antes da inoculação foram capazes de tolerar não somente o calor, como também o estresse osmótico e estresse etanólico através da produção de trealose (BALAKUMAR; ARASARATNAM, 2012).

O estresse osmótico leva à perda natural de água da célula microbiana, para sua proteção alguns microrganismos acumulam alguns compostos na forma de solutos, como íons, aminoácidos e compostos polihidroxílicos (NEVOIGT; STAHL, 1997). A produção de glicerol tem um papel importante para a manutenção do equilíbrio redox além da regeneração de cofatores importantes como o NAD⁺. Segundo Larsson *et al.* (1993), o glicerol estimula a captação de água no meio extracelular, fato verificado na levedura *S. cerevisiae* em estresse osmótico, que acumulou em seu meio intracelular o glicerol para recuperar a perda de água e, assim, equilibrar a turgidez celular pelo processo de difusão passiva. De Gier, Mandersloot e Van Deenen (1968) associaram a possibilidade do acúmulo de glicerol no meio intracelular da levedura *S. cerevisiae* ao aumento de NaCl no meio e, em resposta, obtiveram uma modificação da composição da membrana celular, com a substituição de ácidos graxos por cadeias mais longas (C16 para C18), modificações que possivelmente diminuem a difusão de glicerol. Arruda e Felipe (2008) observaram que além da proteção celular em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, que contém compostos inibidores, o glicerol também é uma importante fonte de carbono para a levedura *Candida guilliermondii*, substituindo até mesmo a xilose como substrato principal.

A tolerância à acidez é outra característica importante para as leveduras industriais. Sabe-se que valores muito baixos de pH, além de ocasionarem perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, podem aumentar a sensibilidade ao etanol e aos ácidos orgânicos (LIMA *et al.*, 2001). Maiorella, Blanch e Wilke (1983) observaram em seu trabalho, com extração a vácuo de etanol, a influência de metabólicos secundários na inibição do processo fermentativo. A viabilidade e a morfologia da células da levedura *S. cerevisiae* não foram alteradas pela concentração inibitória de etanol (25 g L⁻¹), porém, foram prejudiciais à concentração de ácido acético (0,5-9 g L⁻¹), pois o acetato é solúvel nos lipídios da membrana celular e inibe por interferência no mecanismo de transporte de íons fosfato. O transporte de fosfato pela membrana é ativo, ou seja, há gasto de ATP. A interferência de ácido acético resulta num aumento de ATP para a função de manutenção e a produção de célula diminui. Da mesma forma outros ácidos gerados pelo metabolismo secundário da levedura atuam no processo de inibição, como o ácido fórmico e o ácido láctico.

No processo de hidrólise química, principalmente ácida, do material lignocelulósico há a formação de compostos tóxicos que conferem a capacidade de retardar ou, até mesmo, impedir completamente a etapa de fermentação do hidrolisado (CASTRO; PEREIRA JR, 2010), isto porque esses inibidores atuam sobre a expressão de

transportadores de açúcares e transporte de íons na membrana da célula, essencial para a produção de etanol (KLINKE; THONSEN; AHRING, 2004). Na hidrólise da hemicelulose há a formação de ácido acético e furfural, na fração celulósica há a formação de hidroximetilfurfural (GOUVEIA *et al.*, 2009) e na fração de lignina há a formação de compostos fenólicos (FELIPE, 2004). Vários tipos de tratamentos podem ser aplicados com o objetivo de diminuir a toxicidade ou reduzir os efeitos inibitórios desses compostos, como os procedimentos que incluem submeter o hidrolisado a alterações do pH do meio, pela adição de ácidos/bases e a utilização de carvão ativo (TAMANINI; HALLY, 2004).

Outro fator de estresse comum em processos fermentativos é a inibição pelo excesso de substrato, comumente explicado pelo modelo cinético de Michaelis-Menten. Esse modelo explica a influência das concentrações iniciais de enzima e de substrato na velocidade da reação enzimática. Uma das hipóteses básicas consiste na concentração do substrato maior que a concentração da enzima (BORZANI *et al.*, 2008). Em fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*, o excesso de glicose no meio inibe as enzimas do metabolismo respiratório e, assim, aumenta a produção de etanol. Esse fenômeno é conhecido por efeito Crabtree. A levedura *Kluyveromyces marxianus* é Crabtree negativo, ou seja, seu metabolismo não é tão sensível quanto o da *S. cerevisiae* às concentrações de substrato (GONZALÉZ-SISO *et al.*, 1996; PARRONDO; GARCÍA; DIAZ, 2009; VAN URK *et al.*, 1990). Bellaver *et al.* (2004) observaram que aumentando a concentração de substrato (lactose e glicose) da levedura *K. marxianus* CBS 6556, a atividade de algumas enzimas como a fosfoglicomutase e glucose-6 fosfato desidrogenase aumentaram ou permaneceram inalteradas. Os autores sugerem que a baixa tendência para a formação de etanol em seu trabalho se deve a capacidade dessa levedura de manter o fluxo glicolítico constante.

2.3.3.1 Efeitos inibitórios do etanol no processo fermentativo

Cepas que apresentam elevada tolerância ao etanol são bastante desejáveis nos processos fermentativos industriais, o que pode trazer muitas vantagens. Pode-se citar, entre elas, a economia de vapor na destilação e ganho de produtividade dos aparelhos de destilação. Quanto maior for a tolerância da levedura ao etanol, mais elevada pode ser a concentração deste produto no meio (MISHRA; PRASSAD, 1989).

Observa-se que durante a fermentação alcoólica, a presença do álcool etílico ocasiona queda na viabilidade celular, ou seja, ocorre inibição pelo acúmulo do produto durante a fermentação alcoólica (ROFFLER; BLANCH; WILKE, 1984, BROWN *et al.* 1981). Essa queda é de maior intensidade quando o álcool é gerado endogenamente, pois, durante o processo fermentativo, ocorre a formação de outros álcoois em menor proporção, como o n-propanol, isobutanol, isoamílico e amílico que afetam a membrana lipoprotéica (LEÃO;

VAN UDEN, 1984). Portanto, a presença de etanol no meio afeta o crescimento e a viabilidade celular, bem como a composição celular (THOMAS; ROSE, 1979).

Algumas substâncias químicas chamadas desacopladores podem impedir que a energia liberada pelo sistema de transporte de elétrons seja armazenadas na forma de ATP. Descobriu-se que essas substâncias, na verdade, acabam destruindo a força promotiva, por atuarem como condutores de elétrons (PELCZAR: REID; CHAN, 1996). Segundo Leão e Van Uden (1984), o etanol é uma destas substâncias que promove um aumento exponencial da constante de difusão do fluxo de prótons e, conseqüentemente, aumenta o pH citosólico. Meyral *et al.* (1995) observaram que a atividade da enzima ATPase foi reduzida em até 60%, em presença de etanol proveniente do processo fermentativo, o que afetou o transporte de açúcar transmembrana, reduzindo o crescimento celular e a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*). Rosa e Sá-Correia (1992) verificaram que a atividade da ATPase era inibida, na presença de etanol no meio, em 5-7% (v/v) para *K. marxianus* e 8-10% (v/v) para *S. cerevisiae*.

Sancha, Correia e Novais (1988) observaram que a tolerância máxima a etanol das leveduras *S. cerevisiae*, *K. marxianus* e *Saccharomyces bayanus*, sob condições isotérmicas (30°C), ocorreu com o volume máximo de etanol no meio de 20% (v/v). Em trabalho com a linhagem *S. stipitis* NRRI Y-7124, esses autores verificaram que a máxima concentração de etanol que inibiu o crescimento foi de 33,6 g.L⁻¹ de etanol, em meio com glicose, e 44,7 g.L⁻¹ de etanol em meio com xilose (LEE *et al.*, 2000).

O fluxo de íons H⁺ para o exterior da membrana da levedura é acionado por uma proteína transmembrana H⁺-ATPase, sendo esta a mais abundante na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*. Esta ATPase é o principal mecanismo responsável pelo controle de pH citosólico e para criação de força motriz de prótons através da membrana plasmática. O movimento deste íon para o meio intracelular não é tão bem caracterizado, mas sabe-se que íons H⁺ podem cruzar a membrana plasmática de forma passiva (LEÃO; VAN UDEN, 1984).

Há trabalhos que citam, entre outras observações, que o etanol está envolvido na inibição de mais de 9 enzimas da via glicolítica (MILLAR; GRIFFITHS-SMITH; ALGAR, 1982), além de vários trabalhos que descrevem o efeito inibitório do etanol no transporte de açúcares e aminoácidos pela membrana celular (THOMAS; ROSA, 1979; LEÃO; VAN UDEN, 1984).

As concentrações crescentes de etanol no meio fermentativo também revelam o aumento do teor de ácidos graxos monoinsaturados nos lipídeos que constituem a membrana celular em resposta à sua toxicidade, o que afeta a fluidez e o transporte de membrana (BEAVEN; CHARPENTIER; ROSE, 1982).

Segundo You, Rosenfield e Kniple (2003), a tolerância ao etanol apresentada por algumas leveduras se deve à incorporação de ácido oleico em membranas lipídicas, causando uma redução compensatória da fluidez da membrana que neutraliza os efeitos de fluidização de etanol. Porém, acima da concentração na qual a levedura é tolerante ao etanol, é relatado dano ao DNA mitocondrial e desativação de algumas enzimas, como a hexoquinase e desidrogenase, essenciais para sua sobrevivência. Um estudo das membranas de leveduras com microscopia de força atômica e microscopia de fluorescência confirmou o papel de lipídeos insaturados e ergosterol na tolerância ao etanol (VANEGAS *et al.*, 2012).

A incorporação de ácidos graxos insaturados à membrana lipídica de *Kluyveromyces fragilis* (JANSSENS *et al.*, 1983) e de *S. cerevisiae* (YOU; ROSENFELD; KNIPLE, 2003), resultante da suplementação do meio com esses ácidos, bem como a sua incorporação via engenharia genética mostraram-se determinante na tolerância ao etanol. Diferentemente, a resposta adaptativa de *Kluyveromyces lactis* ao etanol foi a redução da insaturação dos ácidos graxos da membrana (HEIPIEPER; ISKEN; SALIOLA, 2000).

É importante ressaltar que a maioria dos estudos sobre *K. marxianus* são direcionados à exploração do seu potencial biotecnológico, porém, poucos trabalhos tem dado ênfase a sua bioquímica, metabolismo e fisiologia, ou seja, o que ocorre ao nível intracelular (FONSECA *et al.*, 2008). Comparado com o seu congênere e organismo modelo, *K. lactis*, o conhecimento acumulado sobre *K. marxianus* é muito menor e distribuído entre um número de cepas diferentes (LLORENTE *et al.*, 2000). A estirpe *K. marxianus* KCTC17555 teve seu genoma sequenciado recentemente (JEONG *et al.*, 2012).

Sendo assim, devido à diversidade metabólica da levedura *K. marxianus* e seu potencial emprego na produção de etanol celulósico, há necessidade de um maior conhecimento sobre seu metabolismo fermentativo, o que pode ser possível através da modelagem matemática, ferramenta que vem sendo utilizada não somente para a otimização do processo, mas que também permite a sua melhor compreensão. A inibição pelo produto é algo comum nos processos fermentativos e estratégias para contornar esse problema vêm sendo amplamente estudadas, sendo a extração por vácuo uma alternativa de operação simples e barata, o que justifica sua empregabilidade. No entanto, seu uso poderá trazer prejuízos à morfologia e ao metabolismo da levedura, fazendo-se necessários maiores estudos nesse campo.

2.3.4 Recuperação do produto

A recuperação do etanol de primeira geração ocorre por destilação. O princípio da destilação baseia-se no ponto de ebulição da mistura, água (100°C) e etanol (78,4°C). Essa mistura apresenta ponto de ebulição variável em função do grau alcoólico. Assim, o ponto de ebulição de uma solução hidroalcoólica é intermediário entre aquele da água e do álcool e será tanto mais próximo deste último quanto maior for o grau alcoólico da solução. A destilação ocorre em colunas, fazendo-se a alimentação contínua do aparelho e retirando-se continuamente a vinhaça pela base e o destilado no topo (BORZANI *et al.*, 2008).

Vários processos podem ser usados para a recuperação de etanol de segunda geração durante o processo fermentativo, como: adsorção, pervaporação, *gás stripping*, extração líquido-líquido, osmose reversa, membrana de destilação, extração híbrida etc. (VANE, 2008).

Se, por um lado, processos como a destilação por membrana e adsorção são menos onerosos no que diz respeito ao gasto de energia e possibilita a obtenção de um etanol “mais seco”, por outro lado, são processos que devem superar grandes desafios técnicos como a obtenção de membranas mais seletivas (SRIVASTAVA; VOLESKY, 1990). As membranas usadas na destilação por membrana são porosas e hidrofóbicas. O transporte através da membrana depende do gradiente de pressão de vapor causada pela diferença de temperatura através da membrana. A taxa de fluxo e a seletividade dependem das temperaturas de alimentação e do líquido de refrigeração, como também da volatilidade dos compostos em que se tem interesse (BANAT; SIMANDL, 1999).

O método de pervaporação foi estudado como um processo para a recuperação de produtos voláteis produzidos durante a fermentação, como etanol e butanol, entretanto, a obstrução da membrana e baixos fluxos de permeabilidade impuseram limitações sobre a eficácia do processo (SCHMIDT *et al.*, 1997).

A extração por solventes é um método que consiste em manter uma baixa concentração de etanol no caldo de fermentação. Em particular, se o agente de extração for de baixa volatilidade, a purificação e evaporação de etanol seria um processo simples e consideravelmente econômico quanto ao gasto de energia. Os requisitos para um extrator são um alto coeficiente de distribuição para o etanol, uma elevada seletividade ao etanol em comparação com a água do meio e não apresentar toxicidade aos micro-organismos. Matsumura e Markl (1984) investigaram a capacidade de 25 solventes orgânicos para extrair etanol e examinaram os seus efeitos sobre o crescimento de vários micro-organismos produtores de etanol. A maior parte dos solventes inibiram o crescimento celular.

Novos processos estão em desenvolvimento, nos quais o etanol é removido seletivamente a partir do caldo da fermentação para eliminar os efeitos da inibição de etanol. Esses processos podem concentrar produtos secundários menores para o ponto em que eles se tornam tóxicos para a levedura. A fermentação a vácuo concentra seletivamente produtos voláteis no caldo de fermentação e, assim, mecanismos diferentes são propostos para os diversos efeitos de inibição observados no processo (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983).

O sistema de recuperação a vácuo foi desenvolvido para a produção de forma contínua, assim seria possível a reciclagem celular e o aumento da velocidade do processo (CYSEWSKI; WILKE, 1977). Além disso, esse sistema tem algumas características positivas como a facilidade de operação, baixo custo, eliminação da exigência de trocador de calor, reduz drasticamente a manutenção e os custos do processo, reduz as condições inibitórias para as células da levedura e a concentração de etanol no meio e, também, reduz o risco de contaminantes (SILVA; RODRIGUES; MAUGERI, 1999).

Na fermentação a vácuo, o vácuo é ajustado à pressão de vapor da solução álcool-água na temperatura de fermentação (30 – 40 °C). Embora a fermentação a vácuo permita que soluções de açúcares altamente concentradas sejam fermentadas, existe a desvantagem de ter que recomprimir grandes quantidades dióxido de carbono que saem juntamente com o álcool e vapor d'água. Além disso, a pequena quantidade de oxigênio requerida pela levedura deve ser suprida como oxigênio puro, por sua baixa solubilidade à pressão reduzida do fermentador. Por outro lado, na fermentação *flash*, o fermentador permanece à pressão atmosférica, enquanto o meio circula numa câmara de vácuo ou evaporador *flash*, acoplado à unidade de fermentação. Ao separar a câmara de vácuo e o fermentador, o dióxido de carbono produzido no fermentador não precisa ser comprimido (ROFFLER; BLANCH; WILKE, 1984).

A fermentação utilizando o sistema de vácuo para retirar o etanol do meio foi uma estratégia utilizada no trabalho de Lee *et al.* (1981), utilizando estipe de *Zymomonas mobilis*. O sistema foi desenvolvido com o fermentador à pressão atmosférica de 50 mm Hg e uma câmara de vácuo exterior, sendo que a operação sequencial da câmara de vácuo estava sob controle de um microprocessador. O uso de *Z. mobilis*, juntamente com o desenho de duas fases do sistema de vácuo, foi encontrado para superar os problemas de adição de oxigênio e a possibilidade de contaminação relatada anteriormente para fermentações de vácuo com leveduras. A produtividade de 85 g.h⁻¹ encontrada nas experiências de reciclagem contínua de células foi semelhante à relatada anteriormente para uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*, em trabalho realizado pelos mesmos autores.

Silva e Maugeri (1999), com o objetivo de aumentar o rendimento e a produtividade na extração de etanol no processo fermentativo, estudaram o método de fermentação e

extração a vácuo. Trata-se de um tanque acoplado a uma bomba de vácuo, tanque *flash*, acoplado ao tanque de fermentação contínua. Estudou-se a otimização da fermentação alcoólica extrativa através de simulação em computador e uso de métodos de planejamento fatorial e posterior análise de superfície de resposta. Assim, foi possível otimizar o processo para a conversão de 99,2% dos açúcares do meio com uma produtividade de 21 g.L⁻¹.h⁻¹. Este valor de produtividade foi 166% superior ao obtido no processo convencional.

Em seu trabalho, Cheng *et al.* (2009) sugeriram a necessidade de estudar e melhorar o processo de extração a vácuo do produto, uma vez que submeter a levedura *S. cerevisiae* ao vácuo gera estresse e requer a sua adaptação ao processo, através de mudanças de proteínas de membrana.

2.3.5 Utilização da modelagem matemática para descrever sistemas biológicos

A utilização de modelos matemáticos para descrever o comportamento de sistemas biológicos tem sido muito reconhecida, pois pode reduzir o número de experimentos necessários, eliminar as possibilidades extremas de inibição e fornecer expressões matemáticas que descrevam quantitativamente o mecanismo de processos fermentativos, conforme a sua necessidade de otimização e controle (AMENAGHAWON; OKIEIMEN; OGBEIDE, 2012).

A equação ou conjunto de equações que compõe um modelo é uma aproximação do processo real, no entanto, o modelo não pode incorporar todas as características tanto macroscópicas como microscópicas do processo real. Os modelos matemáticos podem ser obtidos de forma teórica, empírica ou por analogia (GARCIA, 2005).

A modelagem fenomenológica é obtida de forma teórica, ou seja, esse modelo é desenvolvido aplicando-se princípios básicos da física e/ou da química. Neste caso, divide-se o sistema em subsistemas, cujas propriedades sejam bem compreendidas de experiências anteriores. Basicamente, isso significa que se empregam “leis da natureza” (relações do sistema, que correspondem às leis básicas da física, como as de Newton, de Kirchhoff e equações de balanço) e outras relações bem definidas que são baseadas em trabalhos experimentais anteriores. Esses subsistemas são então agregados matematicamente e um modelo do sistema completo é obtido. Ao se desenvolver um modelo teórico há a necessidade de se conhecer certos parâmetros do processo, os quais usualmente devem ser avaliados a partir de experimentos feitos no processo ou obtidos de dados operacionais do mesmo (GARCIA, 2005; BORZANI *et al.*, 2008).

Na Engenharia Bioquímica, a modelagem fenomenológica é comumente utilizada na formulação de um modelo matemático fenomenológico convencional cujo objetivo principal é

prever o comportamento dinâmico e estacionário do processo, inclusive em condições não testadas empiricamente, possibilitando a determinação das condições operacionais economicamente ótimas para o sistema, auxiliando no projeto e ajuste de algoritmos de controle. Os processos fermentativos incorporam uma série de características que os diferenciam dos processos químicos, o que pode explicar as dificuldades encontradas na formulação de modelos matemáticos que representem adequadamente esses processos, entre essas características, pode-se citar a complexidade do meio que é dinâmico e eventuais toxicidades no processo fermentativo (BORZANI et al., 2008).

Lee (1997) utilizou a modelagem matemática para otimizar a produção de ácido poli β hidroxibutírico (PHB) por *Alcaligenes eutrophus*. Para isso, foi necessário modelar as concentrações experimentais de glicose e hidróxido de amônio. A modelagem permitiu uma produção máxima de células em 40 horas de 141 g L^{-1} e 105 g L^{-1} de PHB, o que antes só conseguia uma concentração celular de 117 g L^{-1} e PHB de $83,8 \text{ g L}^{-1}$.

Rufino et al. (2008) utilizaram a estratégia da otimização por *design* experimental para a produção de biosurfactante por *Candida lipolytica*, utilizando resíduo da extração do óleo de soja. Para isso realizaram um fatorial completo, variando nutrientes como extrato de levedura, ácido glutâmico e o substrato resíduo. A modelagem permitiu avaliar a concentração ótima desses nutrientes, em comparação com a qualidade do biosurfactante produzido diante de características como estabilidade frente às faixas de calor, pH e concentrações de NaCl, o que é muito importante para compostos tensoativos.

Tavares, Sene e Christ (2016) também utilizaram a estratégia da otimização da fermentação de hidrolisado hemicelulósico de farelo de girassol para a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis*, trabalhando fatores como temperatura, agitação e pH, o que permitiu realizar a análise de um fatorial completo com poucos ensaios e aumentou a produção de etanol em 4,1%, no final do processo.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES J.; MORAIS P. B.; ROSA C. A.; MENDONÇA-HAGLER L. C.; HAGLER N. A. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadian, v. 43, p. 328–336, 1997.

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, Stuttgart, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, 2008.

ALVIRA, P.; TOMAS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 13, p. 4851-61, 2010.

AMENAGHAWON, N. A.; OKIEIMEN, C. O.; OGBEIDE, S. E. Kinetic modelling of ethanol inhibition during alcohol fermentation of corn stover using *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Engineering Research**, Washington, v. 2, p. 798-803, 2012.

ARAÚJO, J. R.; WALDMAN, W. R.; DE PAOLI, M. A. Thermal properties of high density polyethylene composites with natural fibres: coupling agent effect. **Polymer Degradation and Stability**, Amsterdam, v. 93, p.1770-1775, 2008.

ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 274-278, 2008.

AZZINI, A; ARRUDA, M. C. Q.; CIARAMELLO, D.; SALGADO, A. L. B.; TOMAZELLO FILHO, M. Produção conjunta de fibras celulósicas e etanol a partir de bambu. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 46, p. 17-25, 1987.

BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V. Osmo- termo- and ethanol- tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* S₁. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, p. 157-166, 2012.

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, New York, v. 39, n. 12, p. 1843-1848, 2004.

BANAT, F. A.; SIMANDL, J. Membrane distillation for dilute ethanol separation from aqueous streams. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 163, p. 333–348, 1999.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, A. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: a review. Part I – yeast in general. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, n. 14, p. 809–821, 1998.

BEAVEN, M. J.; CHARPENTIER, C.; ROSE, A. H. Production and tolerance of ethanol in regulation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 451. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 1447-1455, London, 1982.

BELLAVER, L. H.; CARVALHO N. M. B.; ABRAHÃO NETO J.; GOMBERT, A. K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus*

CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, London, v. 4, p. 691–698, 2004.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; URGEL, A.L.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**, v. 2, p. 123-174, Ed. Blucher, São Paulo, 2008.

BRITO, F. **Bioprodução de etanol de hidrolisado de bagaço de cana utilizando diferentes formas de operação do bioprocesso**. 2000. 61 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

BROWN, S. W.; OLIVER, S. G.; HARRISON, D. E. F.; RIGHELATO, R. C. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 11, p. 151-155, 1981.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell Press**, Amsterdam, v. 92, n. 3, p. 351-366, 1998.

CAMARGO, D.; GOMES, S. D.; SENE, L. Ethanol production from sunflower meal biomass by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 37, n. 11, Stuttgart, 2014.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.1, p. 181-188, 2010.

CHENG, J. S.; ZHOU, X.; MING-ZHU DING; YING-JIN YUAN. Proteomic insights into adaptive responses of *Saccharomyces cerevisiae* to the repeated vacuum fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v. 83, p. 909-923, 2009.

CYSEWSKI, G.R.; WILKE, C.R. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 19, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.v19:8/issuetocp>. 1125–1143, 1977.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, New South Wales, v. 5, p. 578-595, 2009.

DE GIER, J.; MANDERSLOOT, J. G.; VAN DEENEN, L. L. M. Lipid composition and permeability of liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 150, p. 666-675, 1968.

DELGENES, J. O.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. The effect of aeration on D-xilose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, Stuttgart, v. 8, n. 12, p. 897-900, 1986.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Stuttgart, v. 101, p. 41–60, 2002.

FARINA, E.; RODRIGUES, L.; SOUSA, E. L. A política de petróleo e a indústria de etanol no Brasil. **Revista Interesse Nacional**, Brasil, v. 6, n. 22, p. 64-75, 2013.

FELIPE M. G. A. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic. Advances in Biodegradation and biotransformation lignocellulosics. **American Chemical Society**, New York, v. 889, p. 300-317, 2004.

FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **Federation of European Microbiological Societies**, Stuttgart, n. 7, p. 422-435, 2007.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v. 79, n. 3, p. 339-54, 2008.

GARCIA C. **Modelagem e simulação de processos industriais e de sistemas eletromecânicos**. 2. ed. São Paulo: Edusp, 2005. p. 19-26.

GASCH, A. P.; HUANG, M.; METZNER S.; BOTSTEIN, D.; ELLEDGE S. J.; BROWN, P. O. Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. **Molecular Biology of the Cell**, California, v. 10, p. 2987-300, 2001.

GHOSH, P.; SINGH, A. Physiochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Advances Applied Microbiology**, San Diego, v. 39, p. 295-333, 1993.

GOLDSTEIN, C. H.; GLAYPOOL, T. A.; McCracken, L. D.; MAUN, C. M.; UENG, P. P.; TSAO, G. T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 25, p. 85-102, 1978.

GONÇALVES, R. J. S. **Variabilidade genética para a produção de etanol e para a resistência a *Meloidogyne enterolobii* em coleção de clones de batata doce**. 2011. 110 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Departamentos de Biologia, Fitopatologia e Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

GONÇALVES, F. A.; RUIZ, H. A.; SANTOS, E. S.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, G. R. Hidrólise enzimática, sacarificação e fermentação simultânea de materiais lignocelulósicos usando *Saccharomyces cerevisiae* CA11. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 19, 2013. Foz do Iguaçu. **Anais XIX SINAIFERM, X SHEB**, Foz do Iguaçu: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2013. p. 1-4.

GONZALÉZ-SISO, M. I.; FREIRE PICOS, M. A.; CERDAN, M. E. Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose by *Kluyveromyces lactis* rag2 mutants. **Federation of European Biochemical Societies – FEBS Letters**, Norway, n. 387, p. 7-10, 1996.

GONZALÉZ-SISO, M. I.; FREIRE PICOS, M. A.; RAMIL, E.; GONZALEZ-DOMINGUEZ, M.; RODRIGUEZ TORREZ, A.; CERDAN, M. E. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, n. 26, p. 699-705, 2000.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HEIPIEPER, H.; ISKEN, S.; SALIOLA, M. Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in *adh* multiple and null mutants of *Kluyveromyces lactis*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 9, p. 777-784, 2000.

JAFARI, H.; IDRIS, M. H.; OURDIJINI, A.; RAHIMI, H.; GHOBADIAN, B. EIS Study of corrosion behavior of metallic materials in ethanol blended gasoline containing water as a contaminant. **Fuel**, Leiden, v. 90, p. 1181-1187, 2011.

JANSSENS, J. H.; BURRIS, N.; WOODWARD, A.; BAILEY, R. B. Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n. 2, p. 598-602, 1983.

JEONG, H.; LEE, D. H.; KIM, S. H.; KIM, H. J.; LEE, K.; SONG, J. Y.; KIM, B. K.; SUNG, B. H.; PARK, J. C.; SOHN, J. H.; KOO, H. M.; KIM, J. F. Genome sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 11, n. 12, p. 1584-1585, 2012.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymer**, Philadelphia, v. 71, p. 343-364, 2008.

KADAR, Z. S.; SZENGYEL, Z. S.; RECZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Journal Industrial Crops and Products**, Leiden, v. 20, p. 103-110, 2004.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacol Therapeut Journal**, Leiden, v. 2, p.183-20, 1998.

KLINKE, H. B.; THONSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v.66, p.10-26, 2004.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; ZHANG, H. P. Bioethanol production from pentose sugars: current status and future prospects. **Journal Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 15, p. 4950-4962, 2011.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**. 1. ed. Elsevier, Amsterdam, p. 111-121, 2011.

LABORATÓRIO NACIONAL DE CIÊNCIA E BIOTECNOLOGIA DO BIOETANOL – CTBE. **A posição do Brasil na corrida pelo etanol celulósico**. Disponível em: <http://ctbe.cnpem.br/pt-br/>. Acesso em: 12 dez. 2016.

LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R.; WOLFE, K.H.; O'BYRNE C.P.; MORRISSEY J.P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Stuttgart, n. 100, p. 507-519, 2011.

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

LARSSON, K.; ANSELL, R.; ERIKSSON, P.; ADLER, L. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, New Jersey, v.10, p. 1101-11, 1993.

LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 774, p. 43-48, 1984.

LEE, S. S.; ROBISON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 11, p. 641-649, 1981.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, p.1-24, 1997.

LEE, T.; KIM, M.D.; KIM, K.Y.; WAORYU, Y.; SEO, J.H.A. Parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, South Korea, v. 5, p. 27-31, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 225-230.

LIMA, P. C. R. **O biodiesel e a inclusão social**. Brasília: Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados, 2004. p. 8-10.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDLL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3.

LLORENTE, B.; MALPERTUY, A.; BLANDIN, G.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; DUJON, B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12: *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*. **FEBS Letters**, New Jersey, v. 487, p. 71–75, 2000.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; H. VAN ZYL, W.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, 506-577, 2002.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 25, p. 103–121, 1983.

MARESCA, B.; LINDIQUIST, S. **Heat Shock**. 1. ed. Stuttgart: Springer, 1991. p. 55-56.

MATSUMURA, M.; MARKL, H. Application of solvent extraction to ethanol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v. 20, p. 371-377, 1984.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; ROMIEU, C.; MOLETTA, R.; GUNOT, A. M. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or D-glucose. **Enzyme and Microbial. Technology**, Amsterdam, v. 17, p. 535-540, 1995.

MILLAR, D. G.; GRIFFITHS-SMITH, K.; ALGAR, E. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. **Biotechnology Letters**, Stuttgart, v. 4, n. 9, p. 601-606, 1982.

MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 30, p. 294-298, 1989.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, p. 673-686, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Optimal experimental conditions for hemicellulosic hydrolyzate treatment with activated charcoal for xylitol production. **Biotechnology Progress**, New York, v.20, p.134-139, 2004.

NATURPLAS. **Polissacarídeos**. 2012. Disponível em: <<http://cvnaturplas.dnsalias.com/materiais-naturais/polimeros-biodegradaveisde-origem-natural>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

NEVES, R. Enzyme based biomass to ethanol technology: an update. **NREL International Development Seminar on Fuel Ethanol**, Washington DC, 2001.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, New Jersey, v. 21, p. 231-241, 1997.

NIGAM, J. N. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v. 90, p. 208-215, 2001.

NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT B. M. A. ; CHA-AM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S.; YAMADA, M.; AKADA, R. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 7514–7521, 2008.

NOVACANA. **Produção de etanol de segunda geração**. Disponível em: <https://www.novacana.com/tag/116-segunda-geracao/>. Acesso em: 10 dez. 2016.

NOVACANA, **Raízen fala em ampliar produção de etanol celulósico ou construir uma nova usina**. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/raizen-ampliar-producao-etanol-celulosico-construir-nova-usina-220317/>. Acesso em: 10 abr. 2017.

NÚCLEO DE ASSUNTOS ESTRATÉGICOS DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA – **Etanol Verde**. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/publicacoes/etanol/NAEBiocombustiveis.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2016.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, F. P. **Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares**. 2010. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, Stuttgart, v. 7, p. 1-14, 2008.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO AÇÚCAR - OIA. **Produção de etanol no Brasil**. Disponível em: <http://www.apla.org.br/producao-de-etanol-no-brasil-crescera-137-preve-oia>. Acesso em: 10 dez. 2016.

OSTROWSKI, E. A.; WOODS, R. J.; RICHARD, E. L. The genetic basis of parallel and divergent phenotypic responses in evolving populations of *Escherichia coli*. **Proceeding of the Royal Society**, London, v. 275, p. 277-284.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, New York, v. 74, p. 25 - 33, 2000.

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Washington, v. 38, p. 53-87, 1989.

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**, São Paulo, v. 26, n. 3, 2009.

PELCZAR, M.; REID, R. K.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1996. v. 1. 1072 p.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, Rio de Janeiro: Amiga Digital UFRJ, 2008. v. 2. 45 p.

PÉREZ, J.; MUNOZ-DORADO, J.; RUBIA, T. L.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 5, p. 53-63, 2002.

PESSANI, N. K.; ATIYEH, H. K.; WILKINS, R.; BELLMER, D. D.; BANAT, I. M. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, n. 22, p. 10618-10624, 2011.

PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K. Limiting factors in the Simultaneous Saccharification and Fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Stuttgart, v. 51/52, p. 117-124, 1995.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, New Jersey, v. 37, p. 438-442, 2003.

PRONK, J. D.; STEENSMA, Y.; VAN DIJKEN, J. P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, London, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996;

RAMOS, L. P.; SADDLER, J. N. Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded. **Journal Applied Biochemistry and Biotechnology**, Washington, v. 45, n. 46, p. 193-207, 1994.

RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER, S. A. G.; HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira**. Piracicaba, 1999. Apostila. Impresso v. 2, p. 7-25.

ROFFLER, S. R.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. In situ recovery of fermentation products. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 2, p. 129-136, 1984.

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

ROSSI, M.; BUZZINI, P.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; SALA, M.; RAIMONDI, S.; PONZONI, C.; PAGNONI, U. M.; MATTEUZZI, D. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. **FEMS Microbiology Ecology**, New York, v. 69, p. 363-372, 2009.

RUDOLF, A.; BAUDEL, H.; ZACCHI, G.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDÉN, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 99, n. 4, p. 783-790, 2007.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G, M. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v. 35, n. 8, p. 907–914, 2008.

RURAL PECUÁRIA. **Utilização da cana-de-açúcar tratada com cal virgem como alternativa na alimentação bovina.** Disponível em: <http://blog.ruralpecuaria.com.br/2011/08/utilizacao-de-cana-de-acucar-tratada.html>. Acesso em: 10 dez. 2016.

SANCHA, P. S.; CORREIA, I. S. A.; NOVAIS, J. M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 54 p. 903-909, 1988.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L. RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Food Science and Technology**, Brasil, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina grande, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K. BANNERJEE, S. AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 37, p. 19-27, 2012.

SCALCOOL. **Etanol atravessa sua pior crise.** Disponível em: <http://www.scalcool.com.br/noticias/etanol-atravessa-sua-pior-crise/>. Acesso em: 11 nov. 2016.

SCHIMDT, SL.; MYERS, MD.; KELLEY, SS.; MCMILLAN, JD.; PADUKONE, N. Evaluation of PTMSP membranes in achieving enhanced ethanol removal from fermentation by pervaporation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Stuttgart, v. 63-65, p. 469-482, 1997.

SHI, N.-Q.; CRUZ, J.; SHERMAN, F.; JEFFRIES, T. W. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. **Yeast**, Malden, v. 19, p. 1203-1220, 2002.

SHI, D.J.; WANG, C. L.; WANG, K. M. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 36, p. 139–147, 2009.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 661-671, 2009.

SILVA, F.L.H.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F. Dynamic modelling, simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, New Jersey, v. 74, p. 176-182, 1999.

SILVA, D. D. V.; ARRUDA, P. V.; VICENTE, F. M. C. F.; SENE, L.; SILVA, S. S.; FELIPE M. G. A. Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Annals of Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 687–694, 2014.

SILVA, F. L. H.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Dynamic modelling, simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, New Jersey, v. 74, p. 176-182, 1999.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007. 144 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, n. 162, p. 1306–1315, 2010.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009. ISSN 0100-4042.

SINGH, D.; BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. **Biotechnology Letters**, Stuttgart, v. 20, n. 8, p. 753-755, 1998.

SRIVASTAVA, A. K.; VOLESKY, B. Characterization of transient cultures of *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology Progress**, New York, v. 6, p. 408-420

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Review. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v. 109, p. 13-24, 2010.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews**, Michigan, v. 9, p. 433-443, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolyses of lingo cellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 83, p. 1-11, 2002.

SWAN, T. M.; WATSON, K. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **Microbiology Letters**, New Jersey, v. 169, p. 191-197, 1998.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-base hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **Bioresources Technology**, Stuttgart, v. 2, n. 6, p. 472-499, 2000.

TAMANINI, C; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330. 2004.

TAVARES, B.; SENE, L.; CHRIST, D. Valorization of sunflower meal through the production of ethanol from the hemicellulosic fraction. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 20, n. 11, p. 1036-1042, 2016.

THOMAS, D. S.; ROSE, A.H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. **Archives of Microbiology**, Stuttgart, v. 122, p. 49-55, 1979.

TSAO, G. T. Structures of cellulosic material and their hydrolysis by enzymes. In: ALANI, D. I.; MOO-YOUNG, M. **Perspectives biotechnology and applied microbiology**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, p. 205-212.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. **Produção de etanol celulósico no Brasil**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/29810917920343378786/usina-pioneira-de-etanol-celulosico-coloca-brasil/>: Acesso em 11 nov. 2015

VAN DEN BROEK, P. J., DE BRUIJNE, A. W.; VAN STEVENINCK, J. The role of ATP in the control of H⁺-galactoside symport in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemical Journal**, London, v. 242, p. 729-734, 1987.

VAN MARIS A. J.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

VAN URK, H.; LEOPOLD VOLL, W. S.; ALEXANDER SCHEFFERS; W.; VAN DIJKEN, J. P. Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 1, p. 281-287, 1990.

VANE, L. M. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, New Jersey, v. 2, p. 553-588, 2008.

VANEGAS J. M.; CONTRERAS, M. F.; FALLER R.; LONGO M. L. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. **Biophysical Journal**, Amsterdam, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22325273v>. 102, n. 3, p. 507-516, 2012.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N.; SOUZA, M. B. J.; PEREIRA, N Jr. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 137-140, n. 1, p. 141-153, 2007.

VERGHESE, J.; ABRAMS, J.; WANG, Y.; MORANO, K. A. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model

system. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New Jersey, v. 76, p.115-158, 2012.

WONG, D. W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009.

YOU, K. M.; ROSENFELD, C. L; KNIPPLE, D. C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n.3, p. 1499-1503, 2003.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 452- 481, 2006.

**ARTIGO 1 AUXÍLIO DA MODELAGEM FENOMENOLÓGICA NA COMPREENSÃO
DOS FATORES DE ESTRESSE DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DA
LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**

RESUMO: A levedura *Kluyveromyces marxianus* tem se mostrado promissora para a produção de etanol de segunda geração devido a sua capacidade em assimilar diferentes açúcares da biomassa lignocelulósica e pelo amplo espectro de termotolerância. Porém, não se tem conhecimento sobre o comportamento metabólico dessa levedura na presença de fatores como o estresse osmótico e a presença de etanol. Por essa razão, este trabalho teve o objetivo de avaliar o desempenho fermentativo da *K. marxianus* ATCC 36907 frente a diferentes concentrações de substrato, temperaturas e tolerância ao etanol. Foram realizados ensaios em triplicata com 12 condições experimentais em shaker a 200 rpm, os quais variaram na concentração inicial de substrato (50, 120 e 190 gL⁻¹) e à temperatura (30, 35, 40 e 45 °C). Os resultados experimentais foram agregados matematicamente para obtenção de um modelo teórico do processo por modelagem fenomenológica com auxílio do software Scilab. Os modelos obtidos representaram de forma satisfatória as curvas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol. O processo de otimização da fermentação alcoólica indicou a utilização da temperatura de 40 °C e concentração de substrato de 90 g L⁻¹ para maximização da concentração de produto, com isso, foram obtidos, em média, 22,5 g L⁻¹ de etanol com rendimento de 0,24 g g⁻¹. Foi possível observar que a produção de etanol em todas as condições não ultrapassou 22 g L⁻¹, demonstrando o limite de tolerância ao produto, exceto na otimização. Ressalta-se que a temperatura ótima obtida pela modelagem situa-se próxima à temperatura de atuação das celulasas, o que reforça a importância do emprego da levedura *K. marxianus* em processos como o de sacarificação simultânea à fermentação (SSF).

Palavras-Chave: Modelagem fenomenológica, etanol de segunda geração, inibição pelo substrato, inibição pelo produto

**PAPER 1 SUPPORT OF PHENOMENOLOGICAL MODELING IN UNDERSTANDING
STRESS FACTORS DURING THE FERMENTATION PROCESS OF *Kluyveromyces
marxianus* ATCC 36907**

ABSTRACT: *Kluyveromyces marxianus* has shown to be a promising yeast to produce the second generation ethanol due to it assimilates different sugars from the lignocellulosic biomass and its broad spectrum of thermo-tolerance. On the other hand, there is no knowledge on its metabolic behavior in the presence of factors such as osmotic stress and ethanol. Thus, this trial aims at evaluating the fermentation performance of *K. marxianus* ATCC 36907 against different substrate concentrations, temperatures and its tolerance to ethanol. Triplicate assays were carried out with 12 experimental conditions in shaker at 200 rpm, which varied on the initial glucose concentration (50, 120 and 190 gL⁻¹) and temperature (30, 35, 40 and 45 °C). The experimental results were mathematically put together in order to obtain a theoretical model of the process by phenomenological modeling using the Scilab software. The obtained models represented satisfactorily the cell development curves, substrate consumption and ethanol production. The optimization process of alcoholic fermentation indicated the use of temperature at 40 °C and an initial substrate concentration of 90 gL⁻¹ to maximize product concentration. This resulted in an average of 22.5 g L⁻¹ ethanol and 0.24 g g⁻¹ yield. It was possible to observe that ethanol production under all conditions did not exceed 22 g L⁻¹, demonstrating the tolerance limit to this product, except in optimization. It should be observed that the optimal temperature obtained by the modeling is close to cellulase temperature, which reinforces the importance of using *K. marxianus* yeast in processes such as simultaneous saccharification and fermentation (SSF).

KEYWORDS: Phenomenological modeling, second generation ethanol, substrate inhibition, product inhibition

1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol de segunda geração em escala industrial requer a superação de vários desafios. Etapas como a de pré-tratamento e recuperação do produto são consideradas os maiores gargalos na sua produção. No entanto, a seleção de leveduras com bom desempenho, que possuam elevada velocidade de fermentação, tolerância ao etanol, bom rendimento e estabilidade são fundamentais para a obtenção do sucesso no processo fermentativo (VAN MARIS *et al.*, 2006, FONSECA *et al.*, 2008). Cepas que apresentam elevada tolerância ao etanol são bastante desejáveis nos processos fermentativos industriais, pois, quanto maior for sua tolerância, mais elevada poderá ser a concentração desse produto no meio (MISHRA; PRASSAD, 1989).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* possui ampla diversidade metabólica e elevado grau de polimorfismo e, por isso, vem despertando bastante interesse em aplicações biotecnológicas (FONSECA *et al.*; 2008), inclusive para a produção de etanol de segunda geração. Isso porque essa levedura apresenta características interessantes para esse setor, como assimilar uma variedade de açúcares e ser termotolerante (crescer em temperaturas que variam entre 40 a 45 °C) (LANE; MORRISEY, 2010; LANE *et al.* 2011), o que auxiliaria na etapa de sacarificação, pois as celulasas apresentam melhor atuação em temperaturas em torno de 50 °C (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

A utilização de modelos matemáticos para descrever o comportamento de sistemas em reações físico-químicas é bastante comum, porém, ainda é pouco explorada em processos biológicos. Os bioprocessos são bastantes difíceis de modelar, uma vez que a sua operação envolve o crescimento microbiano em condições bastante dinâmicas. Entretanto, tem sido muito reconhecida atualmente a necessidade de se obterem modelos matemáticos simples, porém, realistas, o que pode reduzir o número de experimentos necessários para eliminar as possibilidades extremas de inibição e fornecer expressões matemáticas que descrevam quantitativamente o mecanismo do processo fermentativo, conforme a sua necessidade de otimização e controle (RIVERA *et al.*, 2007; AMENAGHAWON; OKIEMEN; OGBEIDE, 2012)

Apesar das importantes características de *K. marxianus*, os estudos sobre as diversas potencialidades dessa levedura estão apenas emergindo. Portanto, este trabalho teve o propósito determinar o efeito da concentração inicial de substrato no cultivo da levedura *K. marxianus* ATCC 36907, sob diferentes condições de temperatura, utilizando a modelagem fenomenológica como ferramenta na compreensão do processo em termos de inibição pelo substrato e pelo produto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Manutenção celular

Os ensaios foram conduzidos com a levedura termorresistente *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, adquirida da Coleção de culturas tropicais, da Fundação André Tosello. A levedura foi mantida em tubos com meio *Malt Extract Agar* (Extrato de malte 3 g L⁻¹, peptona micológica 5 g L⁻¹ e ágar 15 g L⁻¹), a 4 °C.

2.2 Inóculo

O preparo do inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio *Yeast malt peptone medium* – YMP (10 g L⁻¹ glicose, 3 g L⁻¹ extrato de malte, 3 g L⁻¹ extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de peptona) a 200 rpm, temperatura de 30 °C, pH 5,5, por 16 horas. As células foram centrifugadas assepticamente a 2240 g por 20 minutos, lavadas com água destilada estéril e após nova centrifugação, ressuspensas em água destilada estéril, para então serem utilizadas como inóculo, a uma concentração celular inicial de 0,05 g L⁻¹.

2.3 Fermentação

O teste fermentativo foi realizado em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio *Yeast malt peptone medium* (YMP), variando a concentração de glicose no meio em 50, 120 e 190 g L⁻¹. O pH inicial do meio era de 5,5 - 5,7, sem tamponamento. As fermentações foram conduzidas em diferentes temperaturas (30, 35, 40 e 45°C) a 200 rpm, durante 96 horas. Em intervalos regulares, foram retiradas amostras, as quais, após determinação da D.O._{600nm}, foram centrifugadas a 2240 g e armazenadas em freezer a -20 °C para análises posteriores.

2.4 Métodos analíticos

Para a quantificação de glicose, etanol, ácido acético e glicerol, as amostras foram previamente filtradas em Seppak® e analisadas em cromatógrafo líquido, empregando coluna Phenomenex Rezex ROA_Organic Acid H⁺ (8%); 150 X 7,8 mm; fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol L⁻¹; fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 65 °C.

2.5 Modelagem matemática e estimativa de parâmetros

A modelagem fenomenológica foi realizada a partir da análise dos resultados experimentais com base em modelos clássicos descritos na literatura. O ajuste do modelo aos dados experimentais foi realizado utilizando-se o método de Levenberg-Marquadt disponível no *software* Scilab, função *lsqrsolve*. A solução do sistema de equações diferenciais foi obtida utilizando-se a função *ode* do Scilab. O método de Levenberg-Marquadt foi utilizado para minimizar a *função objetivo* (*fo*), dada pela Equação 1:

$$fo = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{\hat{S} - S}{S_m} \right)^2 + \left(\frac{\hat{X} - X}{X_m} \right)^2 + \left(\frac{\hat{P} - P}{P_m} \right)^2 \right]_i \quad (1)$$

em que: n é o número de pontos experimentais distintos; S , X , e P são os valores experimentais, calculados a partir da média entre os valores replicados, para a concentração de glicose, células e etanol, respectivamente; $\hat{S}$, $\hat{X}$, e $\hat{P}$ são, os valores estimados pelo modelo para X , S e P ; S_m , X_m e P_m são os valores máximos obtidos experimentalmente para X , S e P .

2.5.1 Análise da variância

Para verificar a qualidade da regressão, foi realizada uma análise da variância. A partir dos resultados obtidos pelo modelo foram calculados os parâmetros a seguir:

- soma quadrática ponderada da regressão (SQR):

$$SQR = \sum_{i=1}^{ns} \sum_{j=1}^m \left(\frac{y_{i,j} - \bar{y}}{y_m} \right)^2 \quad (2)$$

- graus de liberdade da regressão (GLR): $GLR = 1$ (uma única variável independente, o tempo);

- soma quadrática ponderada dos resíduos (SQr):

$$SQr = \sum_{i=1}^{ns} \sum_{j=1}^m \left(\frac{y_{i,j} - \hat{y}_i}{y_m} \right)^2 \quad (3)$$

- graus de liberdade dos resíduos (GLr):

$$GLr = n \cdot m - np \quad (4)$$

- soma quadrática ponderada do erro puro (SQep):

$$SQep = \sum_{i=1}^{ns} \sum_{j=1}^m \left(\frac{y_{i,j} - \bar{y}_i}{y_m} \right)^2 \quad (5)$$

- graus de liberdade do erro puro (GLEp):

$$GLEP = ne \cdot m - NE \quad (6)$$

- valor de F (Fischer):

$$F = \frac{SQR/GLR}{SQr/GLr} \quad (7)$$

- análise da significância da regressão (p): se $p < 0,05$ a regressão é significativa para o nível de confiança de 95%;

- coeficiente de determinação (R^2):

$$R^2 = \frac{SQR}{SQR + SQr} \quad (8)$$

- coeficiente de correlação máximo (R^2_{max}):

$$R^2_{max} = \frac{SQR - SQep}{SQR} \quad (9)$$

- $y_{i,j}$ = variável dependente (X, S ou P), obtida experimentalmente para cada ponto experimental obtido (i) em cada réplica experimental (j);

- $\bar{y}$ = valor médio entre todos os valores de cada variável dependente, entre todos os experimentos (para cada valor de temperatura);

- $\hat{y}_i$ = valor estimado para cada variável dependente para cada valor de tempo;

- $\bar{y}_i$ = valor médio entre as réplicas experimentais de cada variável dependente para cada valor de tempo;

- n_e = número de pontos com relação à variável independente tempo ou número de tempos experimentais, calculado pelo número total de pontos experimentais dividido pelo número de réplicas experimentais;
- m = número de replicatas experimentais.
- y_m = valor máximo experimental para a variável dependente, estimado entre os valores médios entre as réplicas experimentais, utilizado para uma melhor distribuição de pesos entre os resíduos, pois a variação dos valores numéricos das variáveis dependentes não são uniformes (S pode variar de 0 a 190 g L⁻¹, X de 0,05 a 10 g L⁻¹ e P de 0 a 21 g L⁻¹), o que poderia gerar uma preferência na minimização dos quadrados dos resíduos para a concentração de substrato em detrimento das variáveis de menor valor numérico.

2.6 Otimização das condições do processo

Para a obtenção de melhores condições de concentração inicial de substrato e temperatura, foi realizada uma otimização, utilizando-se a interpolação por *spline* cúbico com auxílio das funções *splin* e *interp* do Scilab. A interpolação foi realizada com a finalidade de se obterem os valores dos parâmetros para os valores intermediários de concentração inicial de substrato e temperatura, respeitando os limites utilizados no experimento (50 a 190 g L⁻¹ e 30 a 45°C).

A otimização foi realizada com o algoritmo genético, presente na função *optim_ga* do Scilab utilizando como refinamento o algoritmo de Nelder-Mead, função *fminsearch* do Scilab. Para a otimização, consideraram-se valores de tempo fixos (entre 48 e 120 horas) e como função custo, a ser minimizada, a concentração de produto multiplicada por -1.

3 RESULTADOS

3.1 Cinética de fermentação

Nas figuras a seguir (1, 2 e 3), são exibidos os perfis cinéticos dos valores experimentais, dados não modelados, utilizando a média dos principais produtos obtidos

durante o processo fermentativo: etanol, ácido acético e biomassa celular, nas diferentes condições de temperaturas e concentrações de glicose no meio com a levedura *K. marxianus*.

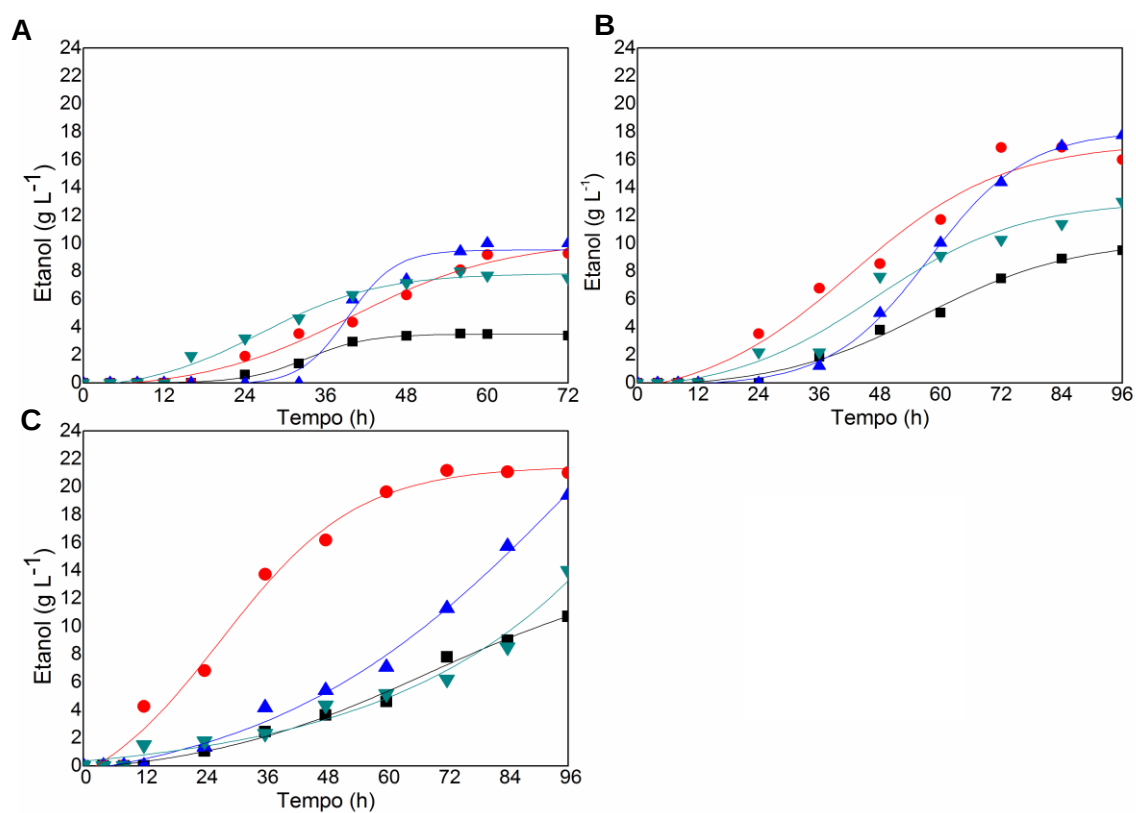


Figura 1 Produção de etanol por *K. marxianus* nas temperaturas de 30 (■), 35 (●), 40 (▲) e 45°C (▼), com concentração de glicose (A) 50 g L⁻¹, (B) 120 g L⁻¹ e (C) 190 g L⁻¹.

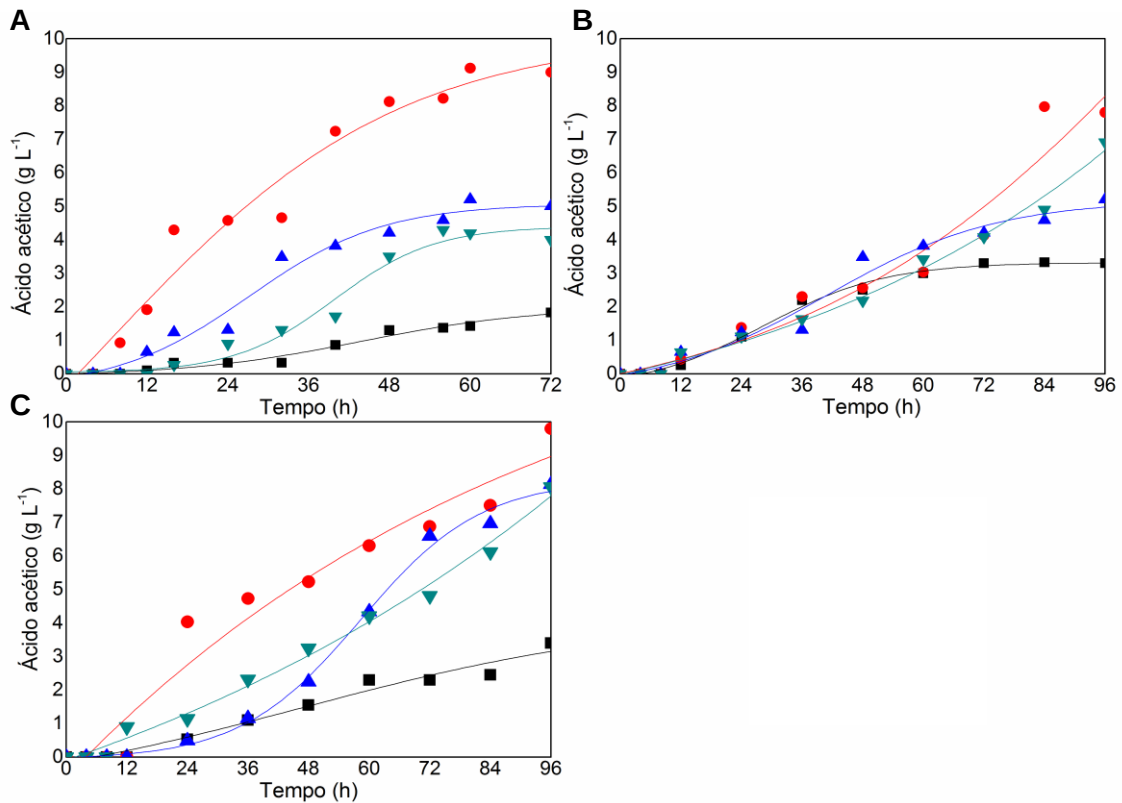


Figura 2 Produção de ácido acético por *K. marxianus* nas temperaturas 30 (■), 35 (●), 40 (▲) e 45°C (▼), com concentração de glicose (A) 50 g L⁻¹, (B) 120 g L⁻¹ e (C) 190 g L⁻¹.

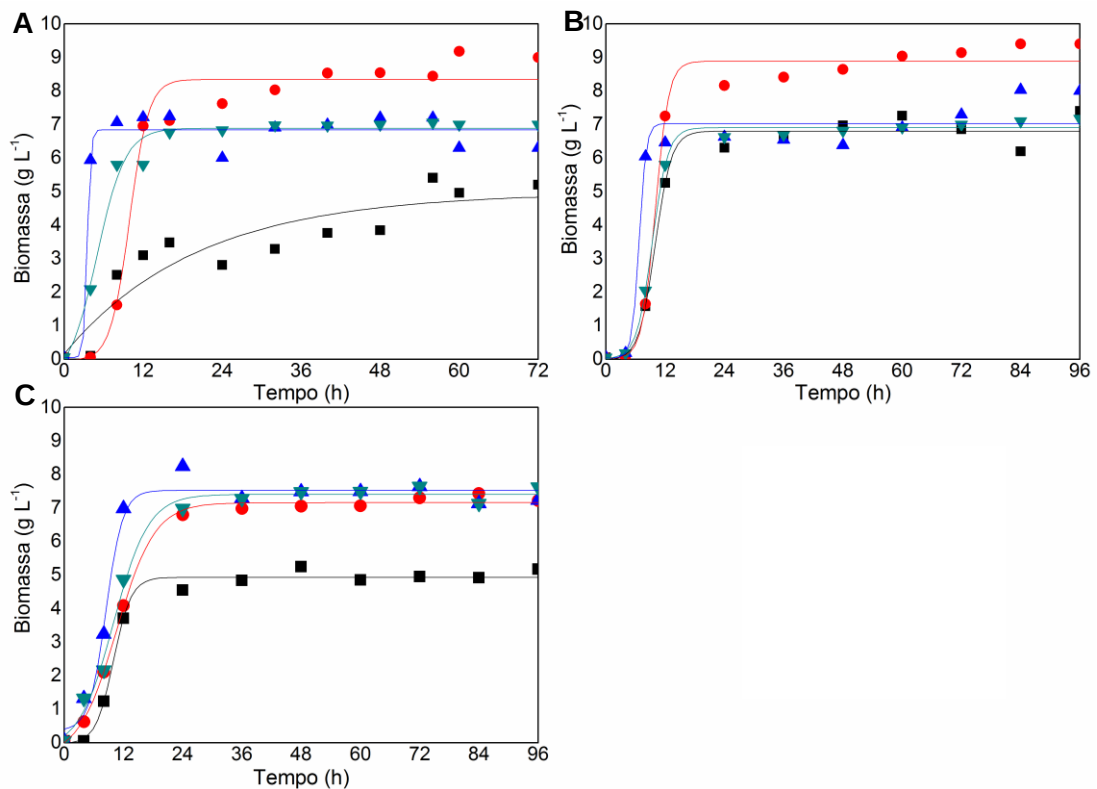


Figura 3 Produção de biomassa por *K. marxianus* nas temperaturas de 30 (■), 35 (●), 40 (▲) e 45°C (▼), com concentração de glicose (A) 50 g L⁻¹, (B) 120 g L⁻¹ e (C) 190 g L⁻¹.

Observa-se, na Figura 1, que a produção de etanol tem início após 24 horas de fermentação e que a maior produção de etanol ocorreu nas temperaturas de 35 e 40 °C, sendo a temperatura de 30 °C a condição menos favorável à formação desse produto, independente da concentração de substrato empregada. Quando a concentração inicial de substrato foi de 190 g L⁻¹ ocorreu a produção máxima de etanol de 21,06 e 19 g L⁻¹, enquanto que na concentração inicial de 120 g L⁻¹ de glicose a produção de etanol foi de 16,9 e 18,15 g L⁻¹, nas temperaturas de 35 e 40 °C, respectivamente, no tempo final de 96 horas de fermentação. Observa-se que houve pouca variação na concentração final de etanol quando a concentração de substrato variou 120 a 190 g L⁻¹ nas temperaturas de 35 e 40 °C, tendo um desvio médio da produção de etanol nestas condições de 1,74, o que é muito baixo, já que o acréscimo em substrato foi de 58 % de glicose.

Quanto à produção de ácido acético (Figura 2), nota-se um comportamento semelhante ao da produção de etanol, com maior produção nas temperaturas de 35 e 40 °C, sendo a temperatura de 30 °C menos favorável à sua formação, independente da concentração de substrato inicial utilizada. Além disso, a concentração inicial de substrato parece não ter exercido efeito na produção de ácido acético, visto que as concentrações finais máximas variaram de 8 a 10 g L⁻¹, na temperatura de 35 °C e 5,3 a 7,2 g L⁻¹ em 40 °C. A maior produção ocorreu na temperatura de 35 °C, na qual foi obtida uma concentração final média de 9,8 g L⁻¹, quando a concentração de substrato era de 190 g L⁻¹.

Em estudo Fonseca *et al.* (2007) com *K. marxianus* ATCC 26548, quando as fermentações foram realizadas com glicose como única fonte de carbono (10 gL⁻¹) em biorreator em batelada e em regime contínuo ($D = 0,51, 0,5$ e $0,1 \text{ h}^{-1}$), a 30 °C, fluxo de ar 6 Lh^{-1} e agitação de 1000 rpm, verificou-se que, de modo geral, o acetato, o piruvato e o alfa-cetoglutarato foram os ácidos formados em maiores concentrações e que, em algumas condições, superaram a formação de etanol, sendo o acúmulo de alfa-cetoglutarato atribuído a uma possível deficiência de tiamina. Em regime de batelada, o acúmulo desses metabólitos foi ainda maior, possivelmente em consequência da maior velocidade de crescimento nessa condição. Além disso, esses metabólitos foram consumidos rapidamente após a exaustão da glicose, com exceção do acetato, que foi consumido mesmo antes do esgotamento da glicose (FONSECA *et al.*, 2007).

A produção de glicerol também foi estimada, porém sua concentração em comparação ao ácido acético foi bem inferior (dados não exibidos). A maioria dos estudos tem associado a produção de glicerol à regulação do metabolismo da levedura sob estresse osmótico. A produção de glicerol tem um papel importante para a manutenção do equilíbrio redox, além da regeneração de cofatores importantes como o NAD⁺. O glicerol estimula a captação de água no meio extracelular. Larsson *et al.* (1993) observaram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em estresse osmótico, acumula em seu meio intracelular o

glicerol, para recuperar a perda de água e equilibrar a turgidez celular, pelo processo de difusão passiva.

A formação de biomassa de *K. marxianus* nas diferentes temperaturas e concentrações iniciais de glicose avaliadas está apresentada na Figura 3. Nota-se que, no tempo de 0 a 4 horas, houve um período de adaptação, pois não ocorreram grandes variações no crescimento, enquanto que no intervalo entre 4-8 horas houve grande multiplicação celular, chegando em sua concentração máxima no tempo 12 horas de fermentação, exceto para a temperatura de 30 °C e concentração de 50 g L⁻¹, condição na qual se verifica ainda um crescimento discreto ao longo do processo fermentativo. As maiores concentrações de biomassa foram verificadas na temperatura de 35 °C, chegando a valores médios de 9,40 g L⁻¹ em 50 g L⁻¹ de glicose e 8,86 g L⁻¹ em 120 g L⁻¹ de glicose.

Durante o rápido período de crescimento, ou seja, nas 12 primeiras horas, não foi verificada produção de etanol, sendo possível considerar que a baixa concentração inicial de biomassa (0,05 g L⁻¹) e a disponibilidade inicial de oxigênio do meio direcionou primariamente o metabolismo da *K. marxianus* ao crescimento, possibilitando um aumento da biomassa em até 150 vezes nesse curto período. Ademais, a produção inicial de etanol foi observada somente após esse período de crescimento, por volta das 24-36 horas de cultivo, sendo a formação de produto, portanto, não associada ao crescimento. O mesmo comportamento foi observado no trabalho desenvolvido por Kiers *et al.* (1998) com a levedura *K. lactis* CBS 2359, que não realizou fermentação alcoólica durante o crescimento celular em condições aeróbias. Neste trabalho foi observado que a enzima piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase aumentaram com a diminuição de oxigênio e, conseqüentemente, mais etanol foi produzido. Isso difere das leveduras Crabtree positivas, como a *S. cerevisiae*, com a qual o etanol é produzido dentro de segundos após um pulso de glicose em condição de aerobiose.

No trabalho de Delgenes, Moletta e Navarro (1986), o metabolismo da levedura *K. marxianus* foi investigado em condições aeróbicas, anaeróbicas e microaerófilas. Foi observado que a taxa de aeração influenciou fortemente na taxa de crescimento e de produção de etanol, sendo as condições de microaerofilia as que proporcionaram a maior produtividade de etanol e biomassa. No presente trabalho, a presença de oxigênio foi bastante determinante para seu metabolismo, visto que no início do processo a baixa concentração celular e o oxigênio disponível no meio foi o suficiente para a predileção da via respiratória pela levedura, favorecendo seu crescimento. Após o seu crescimento máximo, devido à competição por oxigênio no sistema, ocorreu uma troca no tipo de metabolismo, com favorecimento do processo fermentativo. Problemas de transferência de oxigênio são acentuados em fermentações com alta concentração de biomassa, assim, a velocidade de crescimento celular passa ser um fator determinante no processo (BORZANI *et al.*, 2008). A

formação de produtos tóxicos como o etanol, álcoois aromáticos e ácido acético inibem o crescimento celular, mesmo em concentrações baixas. Dessa forma, é desejável a diminuição desses compostos inibitórios, possibilitando o crescimento celular (THOMSON *et al.* 2005; WIEBE *et al.*, 2008).

Quanto ao consumo de glicose (Figura 4), é possível perceber que na temperatura de 45 °C, houve um consumo mais lento, quando comparado com as demais temperaturas.

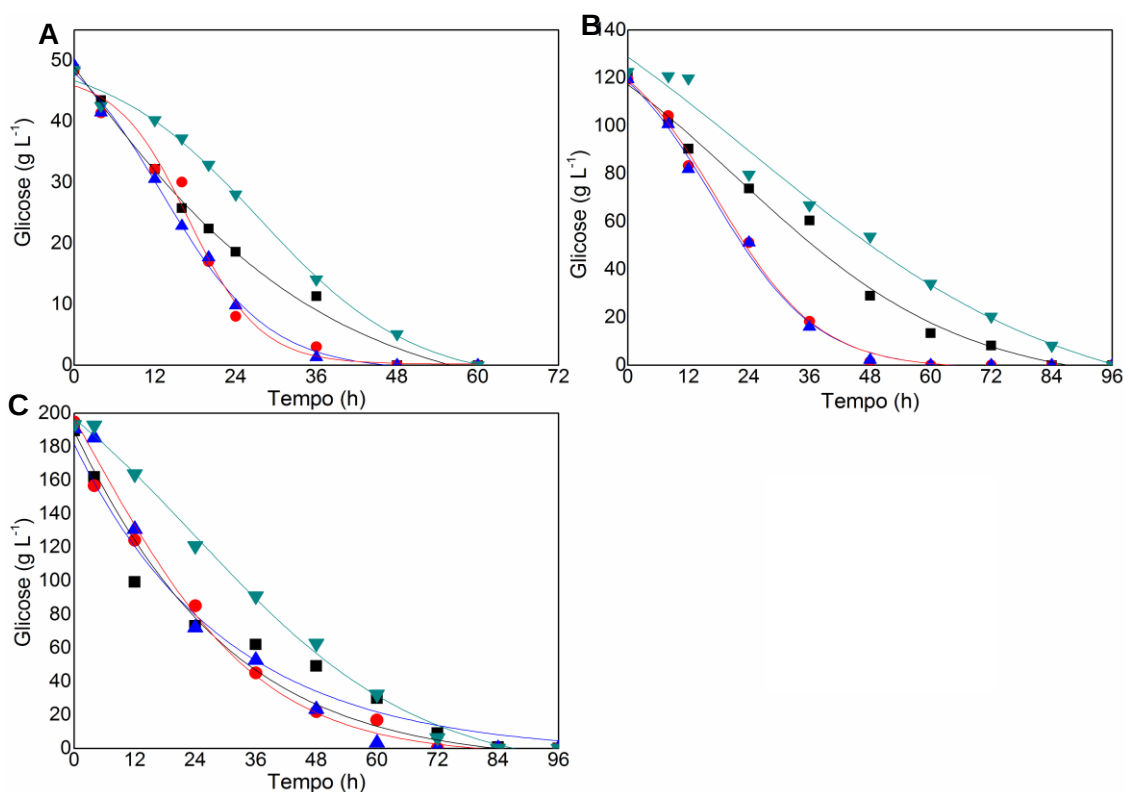


Figura 4 Consumo de glicose por *K. marxianus* nas temperaturas 30 (■), 35 (●), 40 (▲) e 45°C (▼), com concentração de glicose (A) 50 g L⁻¹, (B) 120 g L⁻¹ e (C) 190 g L⁻¹.

O consumo de glicose nas temperaturas de 35 e 40 °C foi mais rápido, e os perfis cinéticos apresentaram comportamento parecidos, que muitas vezes se sobrepuseram como o ocorrido nas concentrações de 50 e 120 g L⁻¹ e se diferenciaram um pouco mais na concentração de 190 g L⁻¹. No trabalho realizado por Rodrussamee *et al.* (2011), observando o consumo de diversos açúcares em diferentes temperaturas da levedura *K. marxianus*, verificou-se que o consumo de glicose e a produção de etanol em 35 e 40 °C foram semelhantes (1,4 g L⁻¹ h⁻¹ para ambas as condições: 0,47 e 0,48 g g⁻¹, respectivamente), comportamento semelhante foi verificado trabalho de Abdel-Banat *et al.* (2010), no qual a cinética para consumo de sacarose e produção de etanol se sobrepuseram para as temperaturas de 35 e 40 °C. Nota-se que, em todas as condições de concentração de substrato, para a temperatura de 45 °C, o consumo foi mais lento,

estendendo-se até 84-96 h nas concentrações de 120 e 190 g L⁻¹. Também nos trabalhos citados, o consumo de glicose e sacarose foram mais lentos na temperatura de 45 °C.

3.2 Parâmetros fermentativos

Os parâmetros foram ajustados utilizando-se todo o conjunto de dados experimentais obtidos em cada temperatura, sendo que os parâmetros μ_{max} , n , k e P_{max} foram estimados como uma função apenas da temperatura, gerando valores idênticos para um mesmo valor de temperatura e diferentes valores de concentração inicial de glicose.

Os demais parâmetros foram estimados como uma função da temperatura e da concentração inicial de glicose, gerando um valor de parâmetro distinto para cada condição experimental utilizada. Os parâmetros estimados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Parâmetros fermentativos da média dos ensaios realizados com a levedura *K. marxianus* em diferentes temperaturas e concentrações de substrato

T	S ₀	μ_{max}	X_{max}	n	k	P_{max}	$r_{X,limite}$	$Y_{X/S}$	m
30	50	0,577	4,222	1,629	0,185	27,87	0,127	0,216	0,220
30	120	0,577	6,857	1,629	0,185	27,87	0,127	0,185	0,185
30	190	0,577	4,812	1,629	0,185	27,87	0,190	0,162	0,040
35	50	0,662	8,516	1,667	0,165	29,96	0,204	0,176	0,515
35	120	0,662	9,204	1,667	0,165	29,96	0,210	0,261	0,252
35	190	0,662	7,357	1,667	0,165	29,96	0,433	0,249	0,078
40	50	0,937	7,843	1,952	0,474	34,23	0,091	0,155	0,426
40	120	0,937	7,146	1,952	0,474	34,23	0,113	0,408	0,384
40	190	0,937	7,686	1,952	0,474	34,23	0,123	0,468	0,229
45	50	1,074	7,500	2,091	0,383	19,14	0,114	0,1356	1,074
45	120	1,074	6,814	2,091	0,383	19,14	0,120	0,194	0,362
45	190	1,074	7,309	2,091	0,383	19,14	0,090	0,401	0,465

É possível observar que nas condições de 35 °C com concentrações de glicose de 120 e 190 g L⁻¹ a produção máxima de etanol (P_{max}) foi de 29,96 g L⁻¹ e mesmo com uma concentração de 70 g L⁻¹ (58,3%) de substrato a mais, não houve maior produção de etanol, evidenciando, assim, uma inibição da levedura *K. marxianus* pelo substrato ou pelo produto. A produção máxima de etanol ocorreu na temperatura de 40 °C (34,23 g L⁻¹) e novamente a concentração de substrato superior não alterou a produção de etanol.

A concentração máxima de células (X_{max}) ocorreu na temperatura de 35 °C e concentração de substrato de 120 g L⁻¹ (9,204 g L⁻¹) e a menor na temperatura 30 °C e concentração de substrato de 50 g L⁻¹. No entanto, na temperatura de 40 e 45 °C e concentração de substrato de 190 g L⁻¹, ocorreram os maiores índices de favorecimento da conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) (0,46 e 0,4), ou seja, o acréscimo de substrato favoreceu muito mais ao crescimento celular do que a produção de etanol. Na temperatura

de 35 °C com 190 g L⁻¹ de substrato a velocidade máxima de crescimento celular (r_x) foi de 0,43, muito superior quando comparada com as demais condições. Por outro lado, na condição mais estressante (45 °C e 190 g L⁻¹ de substrato) obteve-se o maior índice para manutenção celular (m).

Como é de se esperar, para cada temperatura há uma velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}), porém, é possível observar que as concentrações de substrato trabalhadas não alteraram esses valores. Também foi possível observar que o aumento da temperatura favoreceu o aumento da velocidade específica de crescimento.

3.3 Análise estatística da regressão

Os valores obtidos para a análise estatística da qualidade da regressão são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Análise estatística da regressão para a média dos ensaios para produto (etanol, P), substrato (glicose, S) e biomassa (X) empregando *K. marxianus*

T, var.	SQR	GLR	SQr	GLr	SQep	GLep	R ²	R ² _{max}	F	p
30, X	202	1	12,8	98	1,64	76	0,940	0,992	1537	0, 00
30, P	186	1	11,8	98	2,66	76	0,940	0,987	1543	0, 00
30, S	199	1	13,7	98	4,24	76	0,935	0,980	1420	0, 00
35, X	320	1	5,94	74	1,02	60	0,982	0,997	3988	0, 00
35, P	322	1	6,20	74	1,86	60	0,981	0,994	3842	0, 00
35, S	324	1	9,74	74	2,31	60	0,971	0,993	2462	0, 00
40, X	149	1	6,93	65	1,21	54	0,956	0,992	1396	0, 00
40, P	160	1	6,02	65	1,63	54	0,964	0,990	1532	0, 00
40, S	161	1	6,83	65	1,83	54	0,959	0,989	1533	0, 00
45, X	190	1	17,5	77	1,89	62	0,916	0,991	838	0, 00
45, P	189	1	19,9	77	1,03	62	0,905	0,995	732	0, 00
45, S	184	1	17,9	77	1,24	62	0,906	0,994	741	0, 00

Na Tabela 2, pode-se observar que os valores de soma quadrática da regressão (SQR), que consiste no desvio com relação ao valor médio das variáveis dependentes, foi similar entre as variáveis, para cada experimento, mostrando que a ponderação utilizada diminuiu a possibilidade de se favorecer uma variável dependente, em detrimento das demais. Observa-se que a regressão foi significativa no nível de confiança de 95% para todas as regressões realizadas, o que é indicativo de um bom ajuste. Observa-se que foram obtidos melhores coeficientes de determinação (R²) para os experimentos a 35 e 40 °C, indicando que, para essas temperaturas, o modelo foi capaz de representar melhor o comportamento dos dados experimentais obtidos.

3.4 Modelos obtidos para consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol

A construção dos modelos foi baseada nos resultados obtidos experimentalmente realizados em triplicata nas diferentes concentrações de substrato e temperaturas.

3.4.1 Modelo para o consumo de glicose

O modelo proposto para o consumo de glicose considera o consumo de substrato para crescimento e manutenção celular, conforme a seguinte equação:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} - mX \quad (10)$$

em que $Y_{X/S}$ é o fator de conversão de células em substrato e m (h^{-1}) é a constante de velocidade de consumo de substrato para a manutenção celular. Ambos os parâmetros são parâmetros aparentes, pois incorporam o consumo de substrato para a obtenção de produtos, sendo dependentes das condições experimentais (S_0 e T).

3.4.2 Modelo para o crescimento celular

O modelo proposto para o crescimento celular consiste na simplificação do modelo logístico generalizado, proposto por Tsoularis (2001), e é apresentado como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right)^n \quad (11)$$

Restrição: se $X > X_{max}$, $dX/dt = 0$

em que μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}); X é a concentração de células ($g\ L^{-1}$); n é o expoente do termo de inibição não linear. Considerou-se μ_{max} e n dependente apenas da temperatura e X_{max} dependente das condições experimentais (concentração inicial de substrato e temperatura).

3.4.3 Produção de etanol durante o metabolismo fermentativo controlado pela disponibilidade de oxigênio para o crescimento

Para a obtenção do modelo de produção de etanol, foi considerado o comportamento cinético do processo. Observou-se que, havendo oxigênio disponível, o microrganismo prioriza o metabolismo de crescimento. A produção de etanol inicia somente quando a velocidade de crescimento é reduzida, sendo praticamente nula para elevadas velocidades de crescimento. Para representar essa evidente mudança de metabolismo, utilizou-se um modelo linear em função da velocidade de crescimento celular com a restrição que considera que, para valores de velocidade de crescimento acima de um determinado limite ($r_{X,limite}$) não haverá produção de etanol.

Outra informação importante é que a produção de etanol continua, mesmo após a escassez total do substrato, sendo assim, conclui-se que a produção de etanol não é limitada pela escassez do substrato. Por meio da cromatografia líquida, foi possível observar a presença de um pico que se apresenta elevado no período de 24-36 horas e cai após esse período, indicando a existência de um produto intermediário que pode ter sido convertido a etanol. Vários padrões de álcoois foram analisados e foi observada a possibilidade de ser fenil-etanol ou álcool butílico. Segundo Fonseca et al. (2007), *K. marxianus* ATCC 26458 produziu elevadas concentrações de acetato, piruvato e alfa-cetoglutarato, principalmente em regime de batelada (por volta de 20,5 horas), os quais foram rapidamente consumidos após a exaustão da glicose.

Portanto, considerou-se uma concentração máxima possível de produto como sendo o fator limitante da produção de etanol, utilizando um termo de inibição linear por etanol.

$$\frac{dP}{dt} = kX \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right) \left(r_{X,limite} - \frac{dX}{dt} \right) \quad (12)$$

Restrição: Se $P > P_{max}$ ou $dX/dt > r_{X,limite}$, $dP/dt = 0$;

em que P ($g\ L^{-1}$) é a concentração de produto; k ($g\ L^{-1}$) é a constante relacionada com a velocidade de produção de etanol (dependente apenas da temperatura); P_{max} é a concentração máxima possível de produto (dependente apenas da temperatura); $r_{X,limite}$ é a velocidade limite de crescimento celular, acima da qual não ocorre produção de etanol (dependente de S_0 e T).

3.5 Gráficos de ajuste para os modelos

A seguir são apresentados os gráficos de ajuste do modelo aos dados experimentais

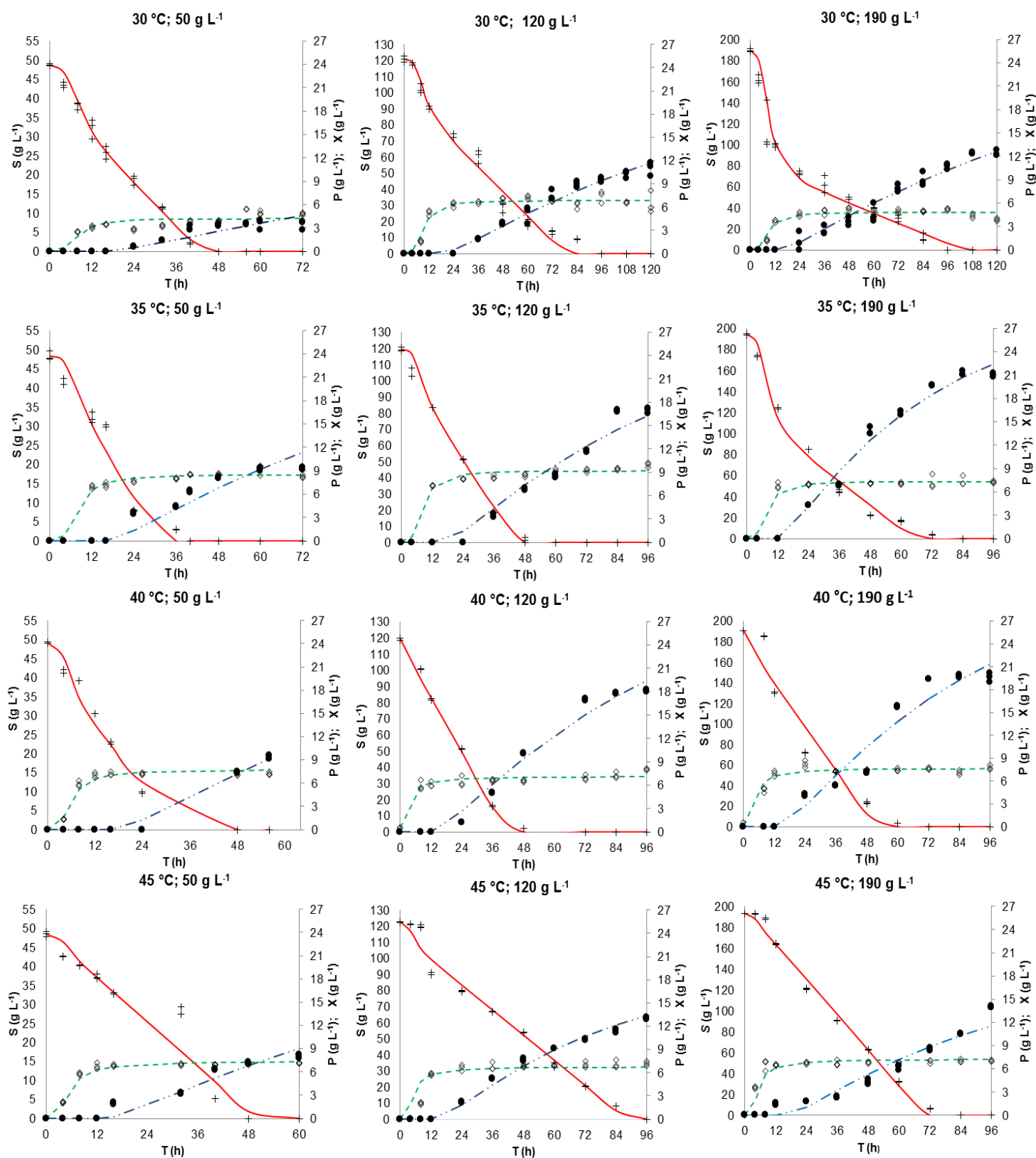


Figura 5 Gráficos de ajuste do modelo para consumo de S experimental (+), S modelo (—), P experimental (●), P modelo (---), X experimental (◇) e X modelo (···) em ensaios empregando *K. marxianus* em função da temperatura e concentração de substrato.

Nessa figura é possível observar que o crescimento celular da levedura *K. marxianus*, em todas as condições avaliadas, ocorre entre o intervalo de tempo de 0-15 h, aproximadamente, o que também foi demonstrado nos gráficos de perfil cinético (Figuras 1 e 3). Nesse intervalo, não ocorre produção de etanol, indicando que há uma possível não associação entre a produção de etanol e o crescimento celular, como já comentado. Além disso, observa-se que a velocidade de crescimento é praticamente nula, mesmo havendo substrato no meio, o que indica que o substrato não é o componente limitante para o crescimento celular nas condições experimentais, provavelmente o limitante seja a concentração de oxigênio.

Em tempos próximos a 20 h de fermentação inicia-se a produção de etanol, a qual ocorre até após o consumo total do substrato, indicando o consumo provável de um subproduto intermediário do processo fermentativo.

3.6 Otimização da temperatura e concentração de substrato

A otimização do processo foi realizada por meio da interpolação entre as curvas, obtidas pelos modelos matemáticos, utilizando as funções *splin* e *interp* do Scilab, seguida da utilização das funções *optim_ga* (algoritmo genético), para a busca de uma região ótima global e *fminsearch* (algoritmo de Nelder e Mead), para o refinamento da resposta dentro dessa região.

O gráfico obtido para as condições de temperatura (T_{ot}) e concentração inicial de substrato (S_{ot}) que maximizam a concentração de etanol (P_{max}), em função do tempo de batelada, são apresentados na Figura 6, a seguir:

:

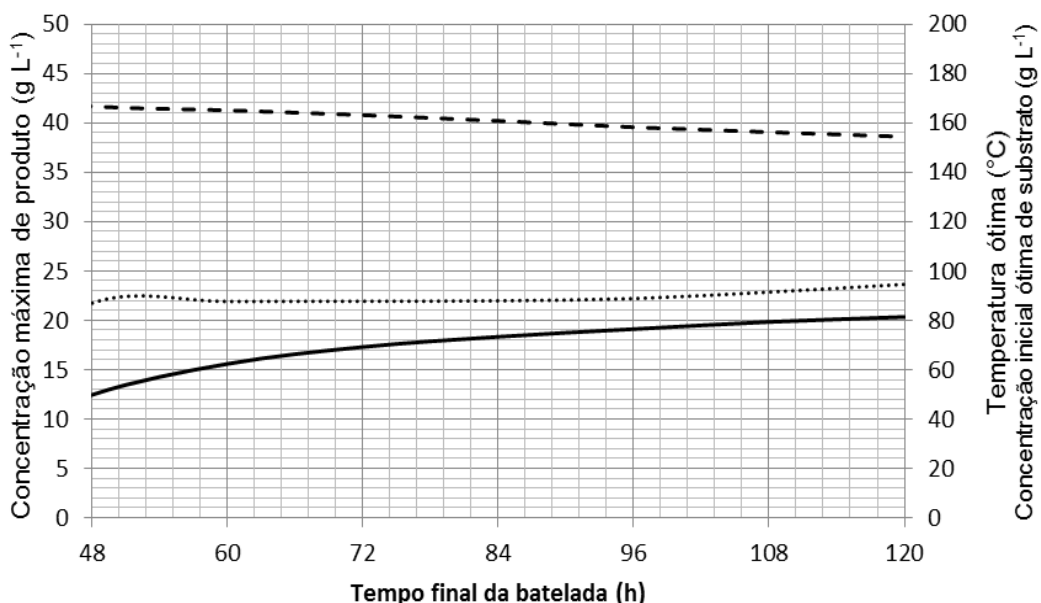


Figura 6 Otimização das condições experimentais temperatura (---) e substrato (.....) para a fermentação empregando a levedura *K. marxianus*.

Os resultados obtidos pela interpolação entre as curvas indicam a utilização de uma temperatura em torno de 40 °C e uma concentração inicial de substrato próxima a 90 g L⁻¹.

Em uma segunda abordagem, considerou-se a interpolação nos parâmetros utilizando-se equações de ajuste. Para isso, foram utilizadas abordagens diferentes para cada parâmetro.

Para a validação do modelo uma nova corrida experimental foi realizada nas condições indicadas pela otimização. Nesse caso, foi utilizada uma concentração inicial de substrato de 90 g L⁻¹, uma temperatura de 40 °C e, para minimizar o efeito da etapa de crescimento e o consequente retardo da produção de etanol, foi utilizada uma concentração inicial de células de 1 g L⁻¹. O modelo matemático que as ajustou aos dados experimentais foi apresentado nas seguintes equações:

$$\frac{dX}{dt} = 0.2965X \left(1 - \frac{X}{6.766} \right) \quad (13)$$

$$\frac{dP}{dt} = 0.2452X \left(1 - \frac{P}{23.34} \right) \quad (14)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{0.122} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{0.432} \frac{dP}{dt} \quad (15)$$

Considerando-se as alterações realizadas para a obtenção dos dados experimentais nas condições otimizadas, em especial o aumento da concentração inicial de células, foi

possível reduzir os modelos originais. Os parâmetros n , $r_{x,Max}$ e m foram retirados, pois a qualidade do ajuste mostrou-se pouco sensível à variação desses parâmetros.

No modelo obtido para as condições otimizadas, o termo de consumo de substrato para produção de etanol tornou-se mais relevante do que o aplicado para manutenção, o que pode ter sido ocasionado pela redução no atraso da produção de etanol, devido a uma maior concentração inicial de células.

O gráfico de ajuste do modelo aos dados experimentais para a condição otimizada é apresentado na Figura 7.

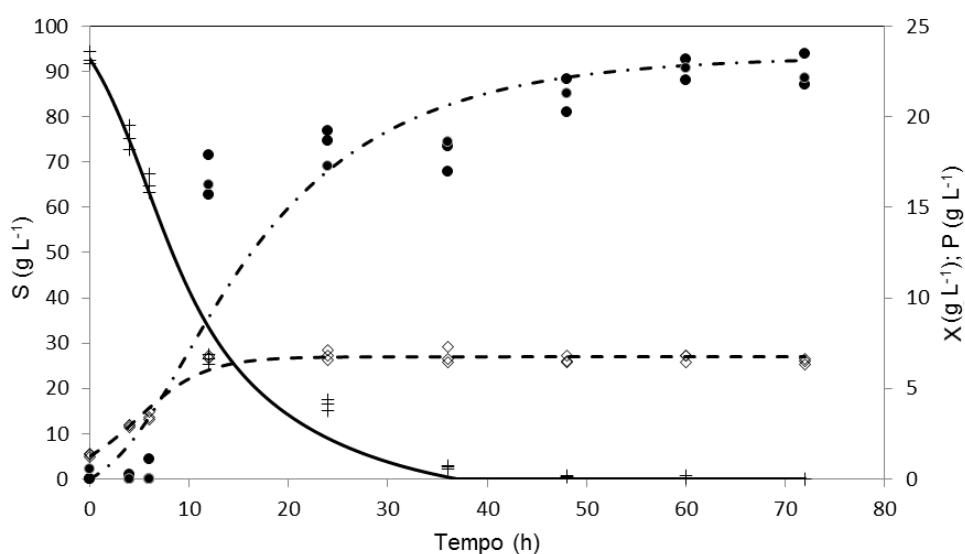


Figura 7 Ajuste do modelo aos dados experimentais para a condição otimizada da levedura *K. marxianus*, Substrato, R² 0,99, modelo (—); S experimental (+); Produto, R² 0,93, modelo (●), experimental (■); Biomassa, R² 0,97, X modelo (- -) e experimental (◇).

Observa-se que houve um bom ajuste dos modelos aos dados experimentais e que a concentração de etanol obtida pela otimização, em torno de 23 g L⁻¹, foi muito próxima àquelas previstas no procedimento de otimização adotado.

4 CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos e diante dos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se concluir que:

- O modelo construído a partir dos dados experimentais conseguiu representar de forma satisfatória as curvas de crescimento celular para a levedura *K. marxianus*, consumo de substrato e a produção de etanol para todos os experimentos.

- A elevada concentração de substrato não inibiu o metabolismo da levedura *K. marxianus*, no entanto, não houve uma maior produção significativa de etanol ao se comparar as condições concentrações de 190 e 120 g L⁻¹ de glicose no meio.

- O processo de otimização do processo fermentativo indica a utilização de uma temperatura de 40 °C e uma concentração de substrato de 90 g L⁻¹ para maximização da concentração de produto.

- O valor ótimo de temperatura obtido através da modelagem apresentou-se próximo à temperatura de atuação das celulasas, o que confirma a vantagem de se utilizar esta levedura para a produção de etanol em processos como SSF, além da possibilidade de se operar em temperatura de menor risco de contaminação.

- Os resultados obtidos no ensaio realizado na condição otimizada ficaram próximos aos resultados da otimização obtidos pelo modelo ajustado aos dados experimentais, o que valida os resultados anteriormente obtidos.

REFERÊNCIAS

AMENAGHAWON, N. A.; OKIEMEN, C. O.; OGBEIDE, S. E. Kinetic modelling of ethanol inhibition during alcohol fermentation of corn stover using *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Engineering Research**, Washington, v. 2, p. 798-803, 2012.

ABDEL-BANAT, B. M. A.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. 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**, Stuttgart, v. 85, p. 861–867, 2010.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, n. 26, p. 89–105, 2008.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; URGEL, A.L.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**, v. 2, p. 123-174, Ed. Blucher, São Paulo, 2008.

DELGENES, J. O.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. The effect of aeration on D-xilose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, Stuttgart, v. 8, n. 12, p. 897-900, 1986.

FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **Federation of European Microbiological Societies**, Stuttgart, n. 7, p. 422-435, 2007.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v. 79, n. 3, p. 339-54, 2008.

KIERS, J.; ZEEMAN, A. M.; LUTTIK, M.; THIELE, C.; CASTRILLO, J. I.; STEENSMA, H. Y.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, Stuttgart, v. 14, p. 459-469, 1998.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 17–26, 2010.

LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R.; WOLFE, K. H.; O'BYRNE C. P.; MORRISSEY J. P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Stuttgart, n. 100, p. 507-519, 2011.

LARSSON, K.; ANSELL, R.; ERIKSSON, P.; ADLER, L. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Nova Jersey, v.10, p. 1101-1111, 1993.

MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v.30, p. 294-298, 1989.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam v 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER, S. A. G.; HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira**. Piracicaba: USP, Universidade de São Paulo, 1999. Apostila. Impresso v. 2, p. 7-25.

RIVERA, E. C.; COSTA, A. C.; ANDRADE, R. R., ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIAL FILHO, R. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature-dependent kinetics of biotechnological processes. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 36, p. 157–166, 2007.

RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N.; HIRATA, K.; SUPRAYOGI; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v. 90, n. 4, p. 1573-1586, maio 2011.

THOMSON, M. J.; GAUCHER, E. A.; BURGAN, F. M.; DE KEE, W.; LI, T.; ARIS, J. P.; BENNER, S. A. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. **Journal Nature Genetics**, Stuttgart, v. 37, n. 6, p. 630-635, 2005. doi:10.1038/ng1553.

TSOULARIS, A. Analysis of logistic growth models. **Research Letters in the Information and Mathematical Sciences**, New Zealand, v. 2, p. 23-46, 2001.

VAN MARIS A. J.; ABBOTT, D. A.; BELLISIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

WIEBE, M. G.; RINTALA, E.; TAMMINEN, A.; SIMOLIN, H.; SALUSJÄRVI, L.; TOIVARI, M.; KOKKONEN, J. T.; KIURU, J.; KETOLA, E. A.; JOUHTEN, P.; HUUSKONEN, A.; MAAHEIMO, H.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. **FEMS Yeast research**, New Jersey, v. 8, n. 1, p. 140-154, 2008.

ARTIGO 2 EXTRAÇÃO DE ETANOL POR VÁCUO DURANTE A FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 COMO ESTRATÉGIA PARA SUPERAR A INIBIÇÃO PELO PRODUTO

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da remoção do produto no desempenho fermentativo de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, cultivada em meio semi-definido contendo 90 g L⁻¹ de glicose e suplementado com nutrientes. Após o esgotamento do substrato (36 horas de fermentação), o sistema foi operado sob vácuo (82 kPa) durante 30 minutos a fim de reduzir a concentração de etanol. Em seguida, o reator foi alimentado com solução saturada de glicose até atingir a concentração de 90 g.L⁻¹ de glicose. As condições de fermentação foram ajustadas e o processo foi conduzido durante mais um período de 36 horas. Após o primeiro ciclo de 36 horas, a concentração de etanol foi de 34,13 g L⁻¹ ($Y_{P/S}$ 0,38 g g⁻¹ e Q_P 0,94 g L⁻¹ h⁻¹), atingindo 40,90 g L⁻¹ de etanol ($Y_{P/S}$ 0,18 g g⁻¹ e Q_P 0,43 g L⁻¹ h⁻¹) no final do segundo ciclo. Um comportamento diferente foi observado para o controle em que o vácuo não foi aplicado. Neste caso, a produção de etanol ocorreu apenas no primeiro ciclo (36,37 g L⁻¹, $Y_{P/S}$ 0,4 g g⁻¹ e Q_P 1,01 g L⁻¹ h⁻¹). Todavia, no segundo ciclo, o consumo do substrato foi de 8% e a produção de etanol não foi observada. A modelagem fenomenológica mostrou que os dados experimentais foram melhor representados pelo modelo que considerou a ocorrência de uma fase de latência no início do segundo ciclo e indicou fortemente a inibição do metabolismo pelo acúmulo do produto. A levedura *K. marxianus* recuperou o metabolismo fermentativo e voltou a produzir etanol, demonstrando o papel relevante da remoção do produto na melhoria do processo.

PALAVRAS-CHAVE: etanol, remoção do produto, vácuo, diminuição da inibição, modelagem fenomenológica

**PAPER 2 EXTRACTION OF ETHANOL BY VACUUM DURING *Kluyveromyces*
marxianus ATCC 36907 YEAST FERMENTATION AS STRATEGY TO OVERCOME
INHIBITION BY THE PRODUCT**

ABSTRACT: This study aims at evaluating the effect of product removal in the fermentative performance of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, grown in semi-defined medium containing 90 g.L⁻¹ glucose and supplemented with nutrients. After the substrate exhaustion (36 hours of fermentation), the system was operated under vacuum (82 kPa) for 30 minutes aiming at reducing ethanol concentration. Then, the reactor was fed with a saturated solution of glucose until it had reached 90 g.L⁻¹ glucose concentration, fermentation conditions were adjusted and the process was carried out for one more 36-hour period. After the first cycle of 36 hours, ethanol concentration was 34.13 g L⁻¹ ($Y_{P/S}$ 0.38 g g⁻¹ and Q_P 0.94 g L⁻¹ h⁻¹), reaching 40.90 g.L⁻¹ ethanol ($Y_{P/S}$ 0.18 g g⁻¹ and Q_P 0.43 g L⁻¹ h⁻¹) at the end of the second cycle. A different behavior was observed for the control in which vacuum was not applied. In this case, ethanol production occurred only in the first cycle (36.37 g L⁻¹, $Y_{P/S}$ 0.4 g g⁻¹ and Q_P 1.01 g L⁻¹ h⁻¹), while in the second cycle, the substrate consumption was 8% and ethanol production was not observed. The phenomenological modeling has shown that the experimental data was better represented by the model that took into account the occurrence of a lag phase at the beginning of the second cycle, and indicated strongly the metabolism inhibition by the product accumulation. *K. marxianus* yeast recovered its fermentative metabolism and produced ethanol again, demonstrating the relevant role of product removal in process improvement.

KEYWORDS: Ethanol; product removal; vacuum; decreased inhibition; phenomenological modeling

1 INTRODUÇÃO

Entre as várias tensões a que as células de leveduras podem ser submetidas, o etanol é o principal fator de estresse durante a fermentação (RICCI et al., 2004). De acordo com You, Rosenfield e Kniple (2003), a tolerância ao etanol por algumas leveduras deve-se à incorporação do ácido oleico na membrana lipídica, causando uma redução compensatória da fluidez da membrana, o que neutraliza os efeitos do etanol. Contudo, acima da concentração de etanol em que a levedura é tolerante, sabe-se que o álcool danifica o DNA mitocondrial e desativa certas enzimas, tais como a hexoquinase e a lactato desidrogenase, essenciais para a sobrevivência das células.

Por estas razões, existe um interesse considerável na remoção e recuperação de etanol durante a fermentação para evitar a inibição pela presença do produto. Várias estratégias têm sido investigadas, tais como adsorção, pervaporação, remoção de gás, extração líquido-líquido, osmose reversa, destilação de membrana, extração híbrida e recuperação de vácuo (VANE, 2008).

Sistemas de recuperação a vácuo foram desenvolvidos para a produção contínua de etanol ou para processos com reciclagem de células, resultando num aumento na produtividade global (CYSEWSKI; WILKE, 1977). Além disto, esses sistemas possuem algumas outras vantagens, como fácil operação, baixo custo, eliminação do trocador de calor para refrigeração, menores condições inibitórias para as células de levedura, bem como redução da concentração de etanol no meio, além do menor risco de contaminação (SILVA; RODRIGUES; MAUGERI, 1999).

Pesquisas têm demonstrado que a fermentação sob pressão de vácuo é um método alternativo e eficaz para a remoção contínua de etanol. A teoria do processo de fermentação conduzido sob pressão de vácuo é baseada basicamente nas propriedades físicas da mistura etanol-água e nas propriedades bioquímicas da reação de fermentação por levedura. O processo de fermentação por levedura é conduzido a uma temperatura de 30 a 35 ° C e a mistura de etanol-água ferve a 78,3 a 100 °C. Quando o processo de fermentação é operado sob pressão de vácuo, a temperatura do ponto de ebulição desta mistura diminui. No entanto, esta abordagem de integração não resolve algumas limitações práticas, tais como o alto consumo de energia para manter a condição de vácuo e os altos volumes de trabalho de fermentadores para operar sob vácuo (NAGUYEN et al., 2009).

A *Kluyveromyces marxianus* tem sido considerada uma levedura promissora para a produção de etanol (incluindo etanol de segunda geração), por suas propriedades, como: a capacidade de assimilação de uma grande variedade de açúcares, o amplo espectro de

termotolerância, a alta taxa de crescimento (FONSECA *et al.*, 2008) e por expressar uma série de proteínas heterólogas (NONKLANG *et al.*, 2008). De acordo com Boyle, Barron e Machale (1997), a *K. marxianus* é capaz de crescer a temperaturas entre 45 - 52 °C e de produzir etanol a temperaturas entre 45 - 50 °C, ou seja, temperaturas mais elevadas em comparação a outras leveduras utilizadas para a produção do mesmo produto. As vantagens da produção de etanol em escala industrial em temperaturas mais elevadas incluem a redução do risco de contaminação e a eliminação da necessidade de arrefecimento para manter a temperatura entre 25 - 35 °C, particularmente em regiões mais quentes. A *K. marxianus* IMB3 foi utilizada na produção industrial de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar na Índia, com rendimentos semelhantes aos de *Saccharomyces cerevisiae* e menor tempo de fermentação (SINGH *et al.*, 1998). A *K. marxianus* foi também estudada como agente de fermentação durante a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) de diferentes fontes de biomassa a 37 - 45 °C, próximo à temperatura ótima para o desempenho das celulasas, resultando em rendimentos promissores (71 - 92%), dependendo da biomassa lenho-celulósica testada (BALLESTEROS *et al.*, 2004; PESSANI *et al.*, 2011; CAMARGO; GOMES; SENE, 2014). Da mesma forma, diferentes frações da biomassa lignocelulósica, celulósica e hemicelulósica podem ser promissoras para a produção de etanol por *K. marxianus*, como demonstrado no trabalho de Silva *et al.* (2015).

Além disso, a capacidade de termotolerância de uma levedura é interessante para ser explorada na produção de etanol em processos de fermentação a vácuo, pois a remoção do produto é facilitada em temperaturas elevadas. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da remoção do produto por vácuo na produção de etanol por *K. marxianus*, para aumentar o seu desempenho durante o processo fermentativo. Nesta abordagem, os resultados das fermentações realizadas sem e com a extração de etanol por vácuo, foram comparados os seus perfis cinéticos, pelo uso de modelagem fenomenológica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação de microrganismo e inóculo

Os ensaios foram realizados com a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, mantida em ágar inclinado de extrato de malte (extrato de malte 3 g L⁻¹, peptona 5 g L⁻¹ e ágar 15 g L⁻¹) a 4 °C.

O inóculo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio de *Yeast malt peptone medium* - YMP (10 g L⁻¹ de glicose, 3 g L⁻¹ de extrato de malte, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de peptona), pH 5,5 – 5,8, sem tamponamento, a 200 rpm, temperatura de 30 °C, durante 16 horas. As células foram centrifugadas a 2240 g durante 20 minutos, lavadas com água destilada estéril, centrifugadas novamente e ressuspensas em água destilada estéril para serem utilizadas como inóculo a uma concentração de células inicial de 1 g L⁻¹.

2.2 Efeito da remoção de etanol na atividade fermentativa de *K. marxianus*

As fermentações foram realizadas em triplicatas em um fermentador de bancada com capacidade total de 2 L (*Bioengineering* AG - KLF 2000) contendo 1,2 L de meio, equipado com eletrodo de pH, eletrodo polarográfico para determinação de oxigênio dissolvido, termopar, agitador com duas turbinas de 6 pás tipo *flat-blade*, chicanas, ar comprimido e sistema de vácuo acoplado diretamente ao fermentador. O meio tinha a mesma composição que aquele utilizado para o preparo do inóculo, exceto a concentração inicial de glicose que era de 90 g L⁻¹ e pH de 5,5 - 5,8. As condições no biorreator foram: temperatura de 40 °C, agitação de 200 rpm, 0,1 vvm e KLa 0,2 h⁻¹, sendo a concentração de O₂ baseada no trabalho de Delgenes, Moletta e Navarro (1986).

Nas fermentações com remoção do produto - fermentações a vácuo (FV), o processo foi realizado em duas fases: na primeira fase, ou seja, antes da remoção do etanol sob pressão de vácuo, após a exaustão do substrato (36 horas), o processo foi interrompido e a pressão foi reduzida para a remoção do etanol sob vácuo. Este procedimento evitou que a levedura permanecesse sem fornecimento de ar durante todo o período de fermentação, mas somente durante a aplicação de vácuo que, desse modo, estava limitada apenas a 30 min. O vácuo foi realizado no mesmo recipiente de fermentação com o auxílio de uma bomba que reduziu a pressão para um valor absoluto de 19,3 kPa, à temperatura de 40 °C.

Em seguida, iniciou-se a segunda fase, alimentando o reator com uma solução saturada de glicose e nutrientes, visando restaurar a concentração de açúcar para 90 g L⁻¹ e dos demais nutrientes para seus valores iniciais (o volume do meio adicionado foi equivalente ao volume das amostras tomadas durante a primeira fase da fermentação para não alterar o volume da solução) e as condições de aeração, agitação e temperatura foram novamente ajustadas. Como controle, foram realizadas fermentações nas mesmas condições, mas sem remoção de etanol na segunda batelada, denominadas fermentações controle (FC).

As amostras foram retiradas no início de cada lote e em intervalos periódicos até o final da fermentação para determinar os parâmetros cinéticos relacionados ao consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol (levando em consideração o etanol removido do meio por vácuo entre as duas fases do processo).

2.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por espectrofotometria utilizando uma curva padrão e correlacionando os valores de absorbância a 600 nm e o peso seco de células (g L^{-1}). A percentagem de células viáveis foi avaliada por contagem microscópica numa câmara de Neubauer de células coradas com azul de metileno.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em microscópio eletrônico de varredura, marca LEO 1450-VP (DEMAR-EEL/USP), com sistema de microanálise. As amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M e, em seguida, foram desidratadas em imersão sequencial em soluções de etanol:água, com concentração decrescente de água por 10 min. E, posteriormente, secas em estufa a 30 °C.

2.4 Análise cromatográfica

A quantificação de glicose, etanol, glicerol e ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu modelo 20A) com detector de índice de refração, utilizando uma coluna Phenomenex Rezex ROA-Ácido Orgânico M + (8%) 150 x 7,8 mm (CAMARGO; GOMES; SENE, 2014). As curvas padrão foram obtidas com padrões de elevada pureza (98-99%, Sigma).

2.5 Modelagem matemática

A modelagem matemática foi realizada a partir da análise dos resultados experimentais. Para o modelo cinético de produção de etanol foi considerado o modelo de Luedeking e Piret para a produção de etanol não associada ao crescimento em condições de concentração celular constante, incorporando ao modelo um termo linear para representar a inibição do produto, conforme mostrado nas equações a seguir:

$$\begin{aligned}\frac{dP}{dt} &= b \left(1 - \frac{P}{P_m}\right), \text{ to } 0 \leq P \leq P_m \\ \frac{dP}{dt} &= 0, \text{ to } P > P_m\end{aligned}\quad (1)$$

em que: t (h) é o tempo de fermentação; b ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) é a multiplicação entre o parâmetro Luedeking e Piret para a produção de etanol, não associada ao crescimento e à concentração celular, assumida aproximadamente constante no modelo; P_m (g L^{-1}) é o produto Inibição.

Para o consumo de substrato foram considerados o consumo de substrato para produção de etanol e manutenção de células, como mostrado na equação abaixo:

$$\frac{dS}{dt} = -c \frac{dP}{dt} - r_m, \text{ to } 0 \leq S \leq S_0 \quad (2)$$

em que: c é a constante de proporcionalidade entre as taxas de consumo do substrato e a formação do produto; r_m ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) é a taxa de consumo de substrato para manutenção de células para uma concentração de células constante; S_0 (g L^{-1}) é a concentração inicial de substrato.

As condições iniciais usadas para resolver as equações diferenciais são apresentadas pela seguinte equação:

$$\text{to } t = t_0, \quad S = S_0 \quad \text{and} \quad P = P_0 \quad (3)$$

Nesta última equação: t_0 é o tempo inicial de cada estágio de fermentação, sendo $t_0 = 0$ h para a primeira etapa de fermentação e $t_0 = 36$ h para a segunda etapa. P_0 é a concentração inicial de etanol, no início de cada etapa de fermentação, sendo $P_0 = 0 \text{ g L}^{-1}$ na primeira etapa de fermentação e a média, entre as réplicas experimentais, dos valores de concentração de produto medidos no início da segunda etapa de fermentação. S_0 é a concentração inicial média, entre repetições experimentais, do substrato no início de cada fase de fermentação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 visualiza-se o perfil cinético médio das fermentações realizadas em triplicatas, com seu desvio padrão, conduzido em sistema de batelada alimentada, com uma

única alimentação em 36 horas, sem remoção do produto, fermentação controle - FC, (A) e com remoção do produto, fermentação com vácuo - FV, (B).

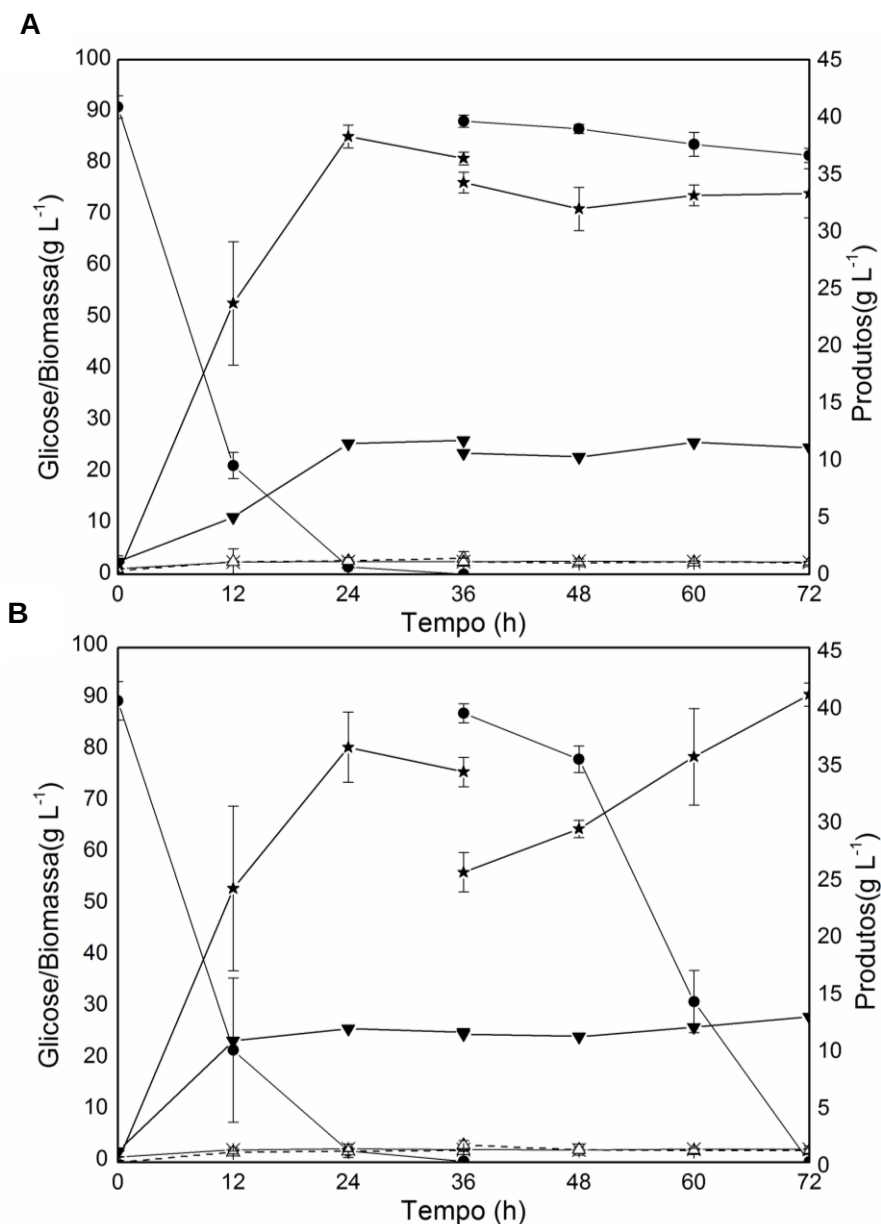


Figura 1 Gráficos do perfil cinético das fermentações empregando *K. marxianus*: (A) fermentação controle, (B) fermentação com remoção a vácuo: consumo de glicose (★), produção de etanol (△), biomassa (—*), ácido acético (●) e glicerol (▼).

Os resultados obtidos na primeira fase de cultivo apresentaram como esperado, ou seja, as 36 horas iniciais para FC e FV foram similares. Em ambas as fermentações houve um consumo de glicose rápido de, aproximadamente, 77% em 12 horas (Q_s de 5,65 e 5,73 g L⁻¹ h⁻¹ para fermentações FV e FC, respectivamente) e depleção de açúcar no meio em 24 horas.

O rápido consumo de glicose resultou em uma rápida produção de etanol nas primeiras 12 horas do primeiro ciclo de FC e FV (Q_p 1,97-1,99 g L⁻¹.h⁻¹), atingindo

concentrações máximas de 36-38 g L⁻¹ em 24 horas, correspondentes a rendimentos de etanol ($Y_{P/S}$) de 0,41 - 0,42 g g⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1 Concentrações de glicose e etanol e parâmetros fermentativos durante as fermentações controle - FC e fermentações por extração à vácuo - FV com *K. marxianus*. O vácuo foi aplicado na segunda fase de VF

	Time (h)	Glicose (g L ⁻¹)		Etanol (g L ⁻¹)		$Y_{P/S}$		Q_P		Q_S	
		FC	FV	FC	FV	FC	FV	FC	FV	FC	FV
Fase 1	0	90.83	89.7	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	21.16	21.8	23.68	23.96	0.34	0.35	1,97	1.99	5.73	5.65
	24	1.43	2.2	38.29	36.3	0.42	0.41	1,59	1.51	3.72	3.64
	36	0.01	0.25	36.37	34.13	0.4	0.38	1,01	0.94	2.51	2.48
Fase 2	0	88.06	87.27	34.27	27.77	0.02	0.1	-	-	-	-
	12	86.57	78.34	31.96	29.17	-	0.42	-	0.31	-	0.74
	24	83.6	31.23	33.14	35.56	-	0.1	-	0.59	-	2.33
	36	81.41	0.04	33.32	40.9	-	0.18	-	0.56	-	2.42
Global	72h	97,48	176.9	33.2	49.67	0,34	0.28		0.68		2.45

Na maioria das fermentações, houve uma ligeira diminuição na concentração de etanol no período de 24 a 36 horas (cerca de 5%), provavelmente devido à assimilação do composto como fonte de carbono pela levedura, uma vez que durante esse período a glicose não estava mais presente no meio (Figura 1). Foi observada uma redução na concentração de etanol após 24 horas em fermentações com esta mesma estirpe de levedura em meio semidefinido, com concentração de glicose em 69 g L⁻¹, em frascos agitados, diferindo no fato de o consumo de etanol ocorrer quando a glicose ainda estava presente (SILVA *et al.*, 2015). O consumo de etanol também foi relatado com *K. marxianus* cultivada em soro de leite, quando o açúcar tinha sido completamente consumido (PARRONDO; GARCÍA; DIAZ, 2009), bem como com *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 cultivada em biorreator e em *shaker* com hidrolisado de casca de semente de girassol (TELLI OKUR; EKEN SARAÇOGLU, 2006, 2008).

No presente estudo, o etanol foi o principal produto, uma vez que houve somente um ligeiro crescimento de biomassa, atingindo cerca de 2,5 g L⁻¹ células (peso seco) (Figura 1). Uma explicação possível para a cessação do crescimento após 12 horas, enquanto o açúcar ainda estava presente no meio, seria limitação de oxigênio. Na verdade, em apenas alguns minutos após a inoculação, o O₂ dissolvido no meio caiu para zero, permanecendo neste nível durante todo o processo. Delgenes, Moletta e Navarro (1986) descobriram em seu estudo que a taxa de aeração influencia fortemente a formação do produto durante fermentações com a levedura *S. stipitis* Y 7124, *K. marxianus* Y2415 e *Candida shehatae* Y2415. Diferentemente das outras leveduras, a *K. marxianus* não fermenta

anaerobicamente, no entanto, em condições de microaerofilia (mínimo 0,02 VVM) houve alta formação de biomassa e rendimentos de etanol.

O glicerol apareceu como o subproduto principal, atingindo uma concentração máxima em torno de $11,0 \text{ g L}^{-1}$ nas primeiras 24 horas de fermentação. Outro subproduto verificado foi ácido acético (máximo $1-1,5 \text{ g L}^{-1}$). Conforme ilustrado na Figura 1, as concentrações de glicerol e ácido acético permaneceram constantes após 24 horas.

Durante a fermentação ocorre a formação de outros subprodutos, incluindo glicerol e ácido acético. A maioria dos estudos tem ligado a produção de glicerol a uma forma de regular o metabolismo da levedura sob estresse osmótico. Por sua vez, quanto maior for a produção de ácidos orgânicos, incluindo ácido acético, que são intermediários da via glicolítica, menor é a produção de etanol (BAI; ANDERSON; YOUN, 2008). Neste trabalho, podemos observar que a produção de ácido acético foi baixa, o que pode ter favorecido a produção de etanol.

Uma observação interessante em *K. marxianus* é que a produção de etanol não parece estar associada ao crescimento (Figura 1). Na fermentação da lactose por *K. marxianus* houve interrupção do crescimento, mesmo durante a continuidade do consumo de açúcar e da produção de etanol. Isso significa que a lactose foi consumida para a produção de energia que foi utilizada pelas células para a sua sobrevivência (PARRONDO; GARCÍA; DIAZ, 2009).

No presente trabalho, o vácuo foi empregado nas fermentações em triplicadas ao fim de 36 horas, reduzindo a pressão dentro do recipiente para 19,3 kPa, durante 30 minutos a uma temperatura de 40 °C. Após a remoção do produto, a alimentação do fermentador e a viabilidade celular foi realizada antes da segunda fase da fermentação ter sido iniciada.

A microscopia eletrônica de varredura (Figura 2) mostra a morfologia das células antes e imediatamente após a aplicação do vácuo. Células robustas com gêmulas puderam ser vistas antes do vácuo. No entanto, a superfície das células submetidas ao vácuo mudou de lisa para um aspecto rugoso, o que pode ter afetado o transporte de nutrientes, a assimilação de glucose e a produção de etanol relativamente às células na primeira fase. A viabilidade das células foi também avaliada antes e após a aplicação do vácuo, na primeira fase 100% das células estavam viáveis. Apesar de imediatamente após o vácuo as células parecerem estar mortas, a viabilidade celular foi restaurada para acima de 90% (dados não apresentados).

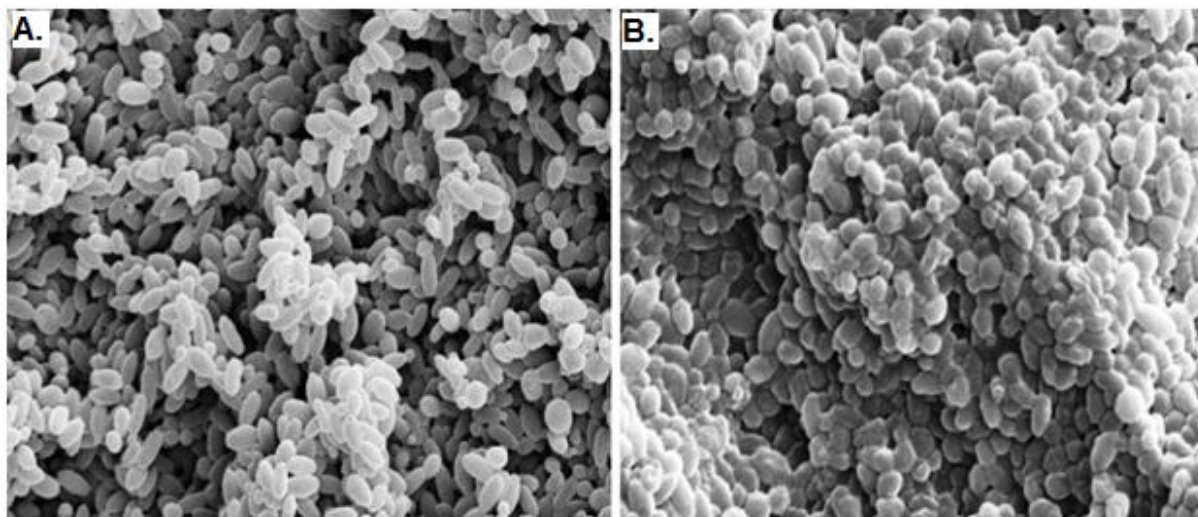


Figura 2 Foto da levedura *K. marxianus* em microscopia eletrônica de varredura (MEV), ampliadas 5000X. Células antes da utilização do vácuo (A) e células após a extração de etanol por vácuo (B).

No segundo ciclo das fermentações, o efeito inibitório do etanol sobre o metabolismo de *K. marxianus* foi claro nos experimentos controle - FC, uma vez que apenas 7,5% da glicose foi consumida até o final do processo (Figura 2A). Como nas fermentações FV houve uma remoção média do produto de 25%, após a primeira fase, a assimilação de glicose foi favorecida na segunda fase (Figura 2 B). No entanto, o consumo de glicose na segunda fase foi de apenas 10% nas primeiras 12 horas e a depleção do substrato no meio ocorreu apenas após 36 horas.

A levedura reiniciou a produção de etanol na segunda fase de FV, aumentando sua concentração em $15,54 \text{ g L}^{-1}$, correspondendo a 45,5% da produzida na primeira fase, representando uma produção total de $49,67 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 2B). A maior produtividade de etanol verificada na segunda fase (Q_p $0,59 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ às 24 horas) foi muito inferior à verificada no primeiro lote (Q_p $1,99 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ às 12 horas) (Tabela 1), representando uma diminuição na produtividade em 70% e sugerindo a necessidade de remoção de uma maior quantidade de produto para reduzir a inibição. Os valores máximos de rendimento foram semelhantes na primeira e na segunda fase de FV, $0,41$ e $0,42 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente, mas diminuíram drasticamente no decurso da segunda fase. Um comportamento completamente diferente foi observado na segunda fase de FC, no qual não houve crescimento celular nem produção de etanol, sugerindo a ocorrência de inibição pelo produto (Figura 2 e Tabela 1).

Em fermentações de etanol em regime de batelada, com várias pressões de vácuo (47-760 mmHg), empregando *S. cerevisiae* em meio semidefinido, o uso de vácuo permitiu manter a produtividade numa faixa de $1,7$ a $2,2 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ao aumentar o tempo de fermentação, a produtividade à baixa pressão (47 mmHg) foi aumentada e superior à pressão atmosférica (NGUYEN et al., 2009).

O efeito de diferentes pressões de vácuo foi também avaliado em fermentações por *S. cerevisiae*. O rendimento máximo em etanol e células, em operação em batelada sob vácuo, foi atingido a 141,2 mmHg de pressão e a produtividade máxima em etanol foi obtida a 166,6 mmHg. No entanto, o aumento da pressão para 700 mmHg reduziu drasticamente o rendimento de células e etanol, bem como a produtividade de etanol (ABDULLAH, 2012).

A formação de subprodutos na segunda fase não foi observada em ambos os casos, com ou sem o uso de vácuo. O uso de vácuo não foi capaz de remover o ácido acético produzido durante o primeiro ciclo das fermentações, o que talvez seja explicado pelo maior ponto de ebulição do ácido acético em relação ao etanol.

Esta primeira tentativa de avaliar a remoção de etanol do meio como forma de diminuir a inibição do produto com *K. marxianus* ATCC 36907 mostrou a importância desta estratégia para a melhoria de processos. No entanto, os resultados revelaram que é necessário promover uma maior remoção do produto sem afetar a integridade das células, de modo a tirar melhor partido dos sistemas alimentados em lote ou mesmo contínuos.

Com a finalidade de analisar os efeitos da adição de substrato e da extração do etanol a vácuo, foram considerados todos os dados experimentais para a estimativa dos parâmetros. Em uma primeira abordagem (Abordagem 1), desprezou-se o tempo necessário para a recuperação das células, fase *lag*, após as etapas de extração de etanol e adição de substrato. Na segunda abordagem (Abordagem 2), considerou-se a ocorrência de uma fase *lag* no início da segunda etapa de fermentação. Essa fase *lag* foi representada no modelo por um parâmetro de tempo λ (h), durante o qual a fermentação não ocorre.

Os parâmetros estimados e os resultados estatísticos obtidos por uma análise de variância para ambas as abordagens estão resumidos na Tabela 2:

Tabela 2 Comparação dos resultados obtidos no ajuste do modelo matemático dos dados experimentais

	Abordagem 1		Abordagem 2	
b (g L ⁻¹ h ⁻¹)	3.479572		3.269941	
P_m (g L ⁻¹)	35.36017		39.90735	
c	2.638307		1.427265	
r_m (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.834218		3.351191	
λ (h)	0		34.56503 (controle)	10.04907 (vácuo)
Análise de Variância	Etanol	Glicose	Etanol	Glicose
R ²	0.905972	0.853044	0.942697	0.991352
R ² _{max}	0.962557	0.991775	0.963963	0.992622
p _{regressão}	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
P _{falta de ajuste}	0.0030	0.0000	0.0843	0.8401

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que o modelo ajustado, usando a Abordagem 2, poderia representar os dados experimentais com uma regressão significativa (progressão $<0,025$) e insignificante falta de ajuste (falta de ajuste $t > 0,025$), ao nível de confiança de 95% por F-teste.

O modelo ajustado para a Abordagem 1 mostrou uma falta significativa de ajuste e valores baixos de R^2 , indicando um fraco ajuste aos dados experimentais.

Com a ajuda da modelagem foi possível avaliar e comparar melhor os resultados entre os experimentos de controle - FC e aqueles em que houve a remoção de etanol por vácuo - FV. A modelagem demonstrou o processo de inibição do metabolismo pela acumulação do produto. Além disso, a Abordagem 2 revelou que após o estresse causado pelo vácuo e / ou excesso de produto e de substrato, foi necessário um período de adaptação de aproximadamente 12 horas, uma nova fase *lag*, para que a levedura *K. marxianus* recuperasse seu metabolismo fermentativo e voltasse a produzir etanol.

Na Figura 3 é exibido o modelo ajustado aos gráficos de dados experimentais para as duas abordagens.

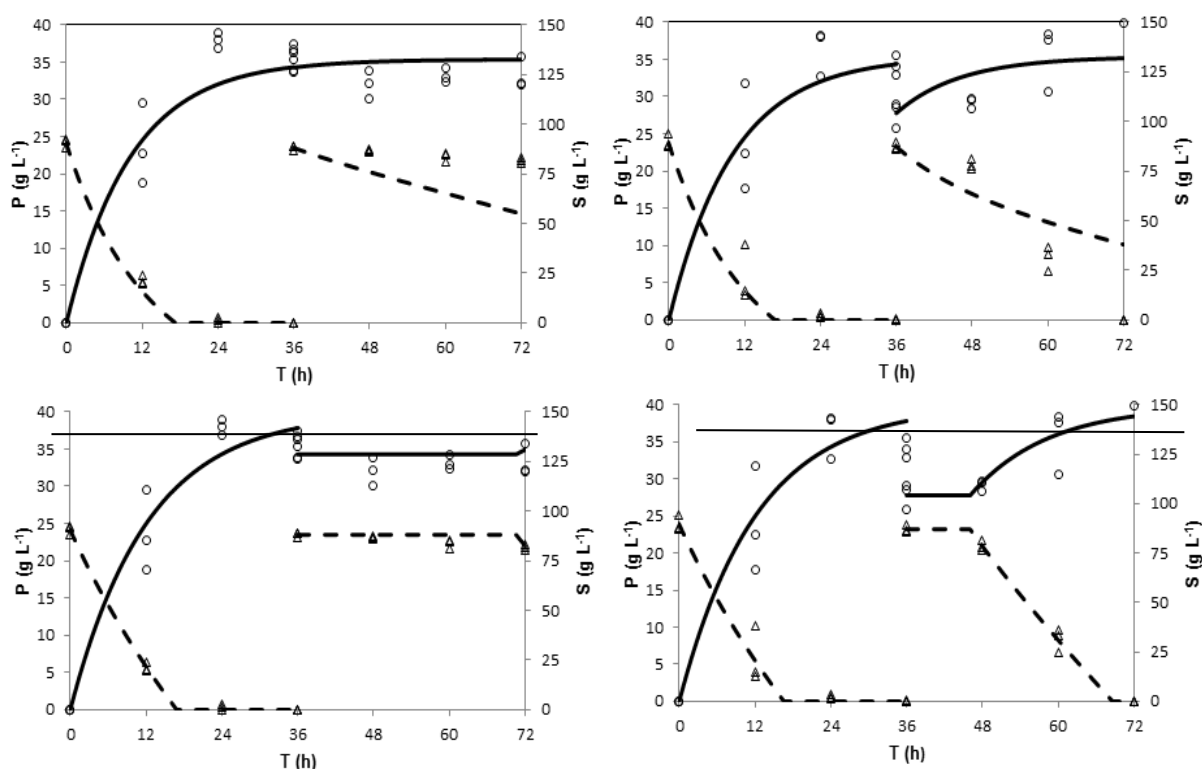


Figura 3 Comparação dos perfis cinéticos para P modelo (—), P experimental (○), S modelo (---) e S experimental (Δ) entre as abordagens: (A) Abordagem 1 Controle; (B) Abordagem 1 Vácuo; (C) Abordagem 2 Controle; (D) Abordagem 2 Vácuo.

Comparando-se os gráficos obtidos com o auxílio das duas abordagens, nota-se que a Abordagem 2 foi capaz de representar o comportamento dos dados experimentais, principalmente na segunda fase da fermentação com a adição de substrato tanto para a FC

quanto para FV. Assim, com a Abordagem 2, foi possível avaliar o comportamento de dois parâmetros relevantes para o processo de fermentação: o fator de conversão de substrato ao produto ($Y_{P/S}$) e a produtividade em etanol (Q_p). Os valores de $Y_{P/S}$ ao final da primeira etapa do processo ($Y_{P/S, 1}$) referentes a um processo em batelada simples e de $Y_{P/S}$ do processo com um todo são apresentados a seguir.

$$Y_{P/S,1} = \frac{P(t = 36 \text{ h}, \text{Fase 1})}{S(t = 0 \text{ h}) - S(t = 36 \text{ h}, \text{Fase 1})} = \frac{37,8}{89,7 - 0} = 0,42 \quad (4)$$

$$Y_P = \frac{P(t = 72 \text{ h}) + P(t = 36 \text{ h}, \text{Fase 1}) - P(t = 36 \text{ h}, \text{Fase 2})}{S(t = 0 \text{ h}) + S(t = 36 \text{ h}, \text{Fase 2}) - S(t = 72 \text{ h})} = \frac{38,5 + 37,8 - 27,8}{89,7 + 87,3 - 0} = 0,27$$

Observou-se uma redução da conversão global do substrato na FV, que pode ser explicada pela inibição pelo substrato. Os valores de produtividade em etanol (Q_p) para o processo com extração e a produtividade de um processo em batelada simples com relação ao tempo total ($Q_{p, b}$), considerando para a batelada simples o tempo total igual ao tempo da batelada somada ao tempo morto (tempo de esvaziamento + limpeza do reator + alimentação), são dados pela equação a seguir, válidas para $t > 36$ horas:

$$Q_p(t) = \frac{P(t) + 37,8 - 27,8}{t + 0,5} \quad , \quad \text{para } t \geq 36 \text{ h}; \quad (5)$$

$$Q_{p,b}(t) = \frac{37,8}{t} \quad , \quad \text{para } t \geq 36 \text{ h};$$

O gráfico abaixo mostra o rendimento de etanol em função do tempo, considerando apenas a segunda fase com extração por vácuo (Figura 4), considerou-se a soma do tempo de extração com o tempo da batelada.

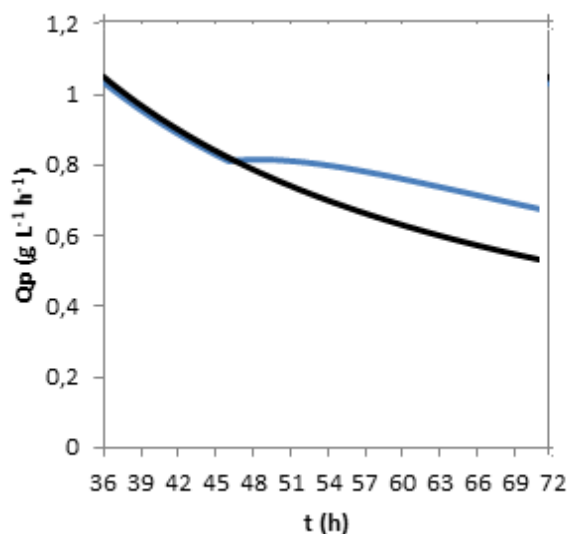


Figura 4 Gráfico da produtividade de etanol na segunda fase de fermentação por *K. marxianus* com extração a vácuo considerando o tempo morto da batelada, Q_p batelada simples (—) e Q_p extração (—).

O processo com alimentação e com extração por vácuo obteve maior produtividade do que o processo em batelada simples para tempos maiores que 46,5 horas (soma entre o tempo de fermentação, 36 h, o tempo de extração de vácuo, 30 minutos e o tempo da fase de lag, 10 h), significando que o processo de extração realizado em escala de laboratório só seria competitivo com um processo de batelada simples, se o tempo morto da batelada fosse maior que 10,5 h. Para uma melhor avaliação de competitividade do processo com extração a vácuo, outros parâmetros a serem considerados são os custos com energia, mão-de-obra e matéria-prima.

4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram observar a inibição pelo produto no metabolismo da levedura *K. marxianus* ATCC 36907 e que a extração de aproximadamente 25% de etanol na primeira fase resultou na formação de 15,54 g de etanol, aproximadamente 31,3% a mais quando comparado com a fermentação controle. No entanto, são necessários maiores estudos para a obtenção de uma maior extração de etanol do processo.

O ácido acético, sintetizado durante a fermentação, não foi extraído pelo vácuo e, dessa forma, permaneceu inalterado até o final do processo, podendo, assim, também ter prejudicado a produção de etanol na segunda fase de fermentação.

A modelagem matemática auxiliou na compreensão do processo fermentativo, principalmente na segunda etapa. No modelo para o segundo ciclo do processo alimentado, deve-se considerar o tempo para a recuperação celular do estresse causado pela extração de etanol. Isso explica a menor produtividade do etanol, uma vez que a célula utiliza o substrato para recuperar seu metabolismo.

A modelagem também permitiu observar que, nas condições estudadas, a continuação do processo somente será vantajosa se o tempo morto da batelada simples for maior que 10,5 horas, que corresponde ao tempo de vácuo e de recuperação celular.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A. D. Enhancing ethanol production by fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* under vacuum condition in batch operation. **International Journal of Renewable Energy Development**, Indonesia, v. 1, p. 6-9, 2012.
- BAI F. W.; ANDERSON, W. A.; YOUNG, M. M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.
- BALLESTEROS, M; OLIVA, J. M., NEGRO, M. J., MANZANARES, P., BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, n. 12, p. 1843-1848, 2004.
- BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 133, p. 51–58, 2013.
- BOYLE, M. BARRON, N.; MACHALE, A. P. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Biotechnology Letters**, Stuttgart, v. 19, n. 1, p. 49–51, 1997.
- CAMARGO, D.; GOMES, S. D.; SENE, L. Ethanol production from sunflower meal biomass by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, **Bioprocess and Biosystem Engineering**, Stuttgart, v. 37, n. 11, p. 2235–2242, 2014. DOI 10.1007/s00449-014-1201-x.
- CYSEWSKI, G. R.; WILKE, C. R. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 19, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.v19:8/issuetocp>. 1125–1143, 1977.
- DELGENES J. P.; MOLETTA R.; NAVARRO J. M. The effect of aeration on D-xylose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. **Biotechnology. Letters**, Stuttgart, v. 8, p. 897–900, 1986.
- FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **Federation of European Microbiological Societies**, Stuttgart, n. 7, p. 422-435, 2007.
- FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Stuttgart, v. 79, n. 3, p. 339-54, 2008.
- NGUYEN, V. D.; KOSUGE, H.; AURESENIA, J.; TAN, R.; BRONDIAL, Y. Effect of vacuum pressure on ethanol fermentation. **Journal Applied sciences**, Switzerland, v. 9, n. 17, p. 3020-3026, 2009.

NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B. M. A.; CHA-AIM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S.; YAMADA, M.; AKADAI, R. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 24, p. 1854 -1858, 2008.

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**, São Paulo, v. 26, n. 3, 2009.

PESSANI N. K.; ATIYEH H. K.; WILKINS M. R.; BELLMER D. D.; BANAT I. M. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: the effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 22, p. 10618-10624, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.09.011. Epub 2011 Sep 10.

RICCI, M.; MARTINI, S.; BONECHI, C.; TRABALZINI, A.; SANTUCCI, A.; ROSSI, C. Inhibition effects of ethanol on the kinetics of glucose metabolism by *S. cerevisiae*: NMR and modelling study. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 387, p. 377–382, 2004.

SINGH, D.; BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. **Biotechnology Letters**, Stuttgart, v. 20, n. 8, p. 753-755, 1998.

SILVA, D. D .V.; ARRUDA, P. V.; VICENTE, F. M. C. F.; SENE, L.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Annals of Microbiology**, Stuttgart, v. 65, n. 2, p. 687-694, 2015.

SILVA, F. L. H.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Dynamic modelling, simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, New Jersey, v. 74, p. 176-182, 1999.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU. Ethanol production form sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis* under uncontrolled pH conditions in a bioreactor. **Journal or Engineering and Environmental Science**, Turquia, v. 30, p. 317-322, 2006.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N., Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**., Amsterdam, v. 99, p. 2162-2169, 2008.

YOU, K. M.; ROSENFELD, C. L.; KNIPPLE, D. C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n.3, p. 1499-1503, 2003.

VANE L. M. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths, **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, New Jersey, v. 2, p. 553-589, 2008.