

EDGARD VALDOMIRO CHARLES BELO

**CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM FLOCULANTE DE *Kluyveromyces  
marxianus* COM POTENCIAL PARA PRODUZIR ETANOL**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B452c  
2013

Belo, Edgard Valdomiro Charles, 1977-  
Construção de uma linhagem floculante de  
*Kluyveromyces marxianus* com potencial para produzir etanol/  
Edgard Valdomiro Charles Belo. – Viçosa, MG, 2013.  
ix, 47 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 43-47.

1. *Kluyveromyces marxianus*. 2. Leveduras. 3. Células -  
Transformação. 4. Fermentação. 5. Biocombustíveis.  
6. Biotecnologia. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.  
II. Título.

CDD 22. ed. 579.562

EDGARD VALDOMIRO CHARLES BELO

**CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM FLOCULANTE DE *Kluyveromyces marxianus* COM POTENCIAL PARA PRODUZIR ETANOL**

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

APROVADA: 9 de agosto de 2013

---

José Humberto de Queiroz

---

Wendel Batista da Silveira  
(Coorientador)

---

Luciano Gomes Fietto  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia por ter me proporcionado a oportunidade de um bom ensino e aprendizagem.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

À FAPEMIG pelo fomento a pesquisa.

Ao professor Luciano pela competência, confiança, interesse e dedicação na orientação deste trabalho. Pela amizade e pelo apoio tanto em quesitos técnicos como burocráticos.

Ao professor Wendel pela orientação, conselhos, críticas e sugestões.

Ao professor José Humberto por aceitar fazer parte da banca e pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Carlos Souza, Fernanda Albuini, Aline Abrantes e Murilo Alves pela troca de idéias e pelo imprescindível auxílio nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola.

À Livia Pinheiro pela amizade, cumplicidade, pelo apoio nos momentos difíceis e pelos bons momentos de descontração.

As Repúblicas Paiol de Pólvora e Piôka.

Ao grupo de percussão O Bloco.

A todos não citados porém não esquecidos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

## SUMÁRIO

|                                                                                                          |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....                                                                         | v    |
| RESUMO .....                                                                                             | vi   |
| ABSTRACT .....                                                                                           | viii |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                      | 1    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                           | 2    |
| 2.1 Panorama energético .....                                                                            | 2    |
| 2.2 Matérias primas alternativas .....                                                                   | 3    |
| 2.3 A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....                                                      | 6    |
| 2.4 Leveduras floculantes.....                                                                           | 8    |
| 3. OBJETIVOS .....                                                                                       | 11   |
| 3.1 Objetivo geral .....                                                                                 | 11   |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                                          | 11   |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                              | 12   |
| 4.1 Micro-organismos utilizados .....                                                                    | 12   |
| 4.2 Meios de cultura e condições de cultivo .....                                                        | 13   |
| 4.3 Oligonucleotídeos .....                                                                              | 14   |
| 4.4 Obtenção de mutantes <i>Kluyreromyces marxianus</i> ura3 utilizando UV.....                          | 15   |
| 4.5 Construção de mutantes <i>Kluyveromyces marxianus</i> ura3.....                                      | 16   |
| 4.6 Amplificação dos cassetes contendo diferentes genes de floculação.....                               | 19   |
| 4.7 Transformação da <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....                                                | 19   |
| 4.8 Testes de floculação (Análise fenotípica).....                                                       | 22   |
| 4.9 Avaliação do pontencial fermentativo das linhagens <i>Kluyreromyces marxianus</i> floculantes.....   | 22   |
| 4.10 Análise do consumo de açúcares, produção de etanol e determinação dos parâmetros fermentativos..... | 22   |
| 4.11 Avaliação da viabilidade celular quanto a concentração de etanol.....                               | 23   |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                          | 25   |
| 5.1 Obtenção de mutantes utilizando radiação UV .....                                                    | 25   |
| 5.2 Construção de mutantes de <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>URA3</i> Δ.....                          | 26   |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3 Amplificação dos cassetes contendo diferentes genes de floculação.....                                                                           | 29 |
| 5.4 Transformação da <i>Kluyreromyces marxianus</i> auxotrófica com os cassetes<br>contendo genes de floculação e seleção dos<br>transformantes..... | 30 |
| 5.5 Análise Fenotípica das linhagens transformantes.....                                                                                             | 32 |
| 5.6 Avaliação do pontencial fermentativo das linhagens <i>Kluyreromyces marxianus</i><br>floculantes.....                                            | 34 |
| 5.7 Avaliação da viabilidade celular em diferentes concentração de etanol.....                                                                       | 41 |
| 6. CONCLUSÃO.....                                                                                                                                    | 42 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                  | 43 |

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Estratégia utilizada na obtenção do gene <i>URA3Δ</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                     | 18 |
| <b>Figura 2:</b> Estratégia utilizada na obtenção da linhagem de <i>K. marxianus</i> floculante....                                                                                                                                                                                                                                              | 21 |
| <b>Figura 3:</b> Fracionamento do produto de digestão utilizando a enzima <i>EcoRI</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 26 |
| <b>Figura 4:</b> Fracionamento do produto das reações de PCR em gel de agarose 1,0%...30                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
| <b>Figura 5:</b> Teste de floculação das diferentes linhagens transformantes.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 33 |
| <b>Figura 6:</b> Perfil fermentativo das linhagens de <i>K. marxianus</i> floculantes e não floculantes utilizando glicose como fonte de carbono.....                                                                                                                                                                                            | 35 |
| <b>Figura 7:</b> Perfil fermentativo das linhagens de <i>K. marxianus</i> floculantes e não floculantes utilizando lactose como fonte de carbono.....                                                                                                                                                                                            | 37 |
| <b>Figura 8:</b> Perfil fermentativo das linhagens de <i>K. marxianus</i> floculantes e não floculantes utilizando simultaneamente glicose e lactose como fonte de substrato.....                                                                                                                                                                | 39 |
| <b>Tabela 1:</b> Micro-organismos utilizados neste trabalho.....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 12 |
| <b>Tabela 2:</b> Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 14 |
| <b>Tabela 3:</b> Linhagens transformantes e seus números de UFC/mL.....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 31 |
| <b>Tabela 4:</b> Produção final de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ), rendimento de produção de etanol em relação a glicose ( $Y_{p/s} = \text{g.L}^{-1}$ de etanol / $\text{g.L}^{-1}$ de glicose) e produtividade volumétrica ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) das linhagens de <i>K. marxianus</i> floculantes e a linhagem não floculante..... | 36 |
| <b>Tabela 5:</b> Produção final de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ), rendimento de produção de etanol em relação a lactose ( $Y_{p/s} = \text{g.L}^{-1}$ de etanol / $\text{g.L}^{-1}$ de lactose) e produtividade volumétrica ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) das linhagens de <i>K. marxianus</i> floculantes e a linhagem não floculante..... | 38 |
| <b>Tabela 6:</b> Velocidade específica de crescimento e UFC/mL das linhagens KMCBS $\Delta$ URA3, KMCBSFLO9 e KMCBSFLO10 quando cultivadas em diferentes concentrações de etanol.....                                                                                                                                                            | 41 |

## RESUMO

BELO, Edgard Valdomiro Charles, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Construção de uma linhagem floculante de *Kluyveromyces marxianus* com potencial para produzir etanol.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientador: Wendel Batista da Silveira.

Leveduras floculantes são de grande utilidade em processos fermentativos, pois são separadas facilmente do mosto de fermentação. Diminuindo os custos associados à etapa de separação das células. O fenótipo de floculação não é encontrado com frequência em leveduras nativas, incluindo a espécie *Kluyveromyces marxianus* a qual apresenta alto potencial biotecnológico devido a sua habilidade de assimilar um amplo espectro de substratos, apresentar uma alta taxa de crescimento e ser termotolerante. Este trabalho teve como objetivo a construção de linhagens floculantes de *K. marxianus* com potencial para fermentar resíduos agroindustriais. Os cassetes utilizados na construção das linhagens floculantes de *K. marxianus* foram amplificados de 4 linhagens floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* que possuem, cada uma, um cassete constituído pelo o gene *URA3* como marca de seleção e por um gene de floculação *FLO*, sob o controle do promotor constitutivo TDH3 (URA3-TDH3p-FLO). Sendo que cada uma dessas linhagens contém um gene de floculação diferente (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9* E *FLO10*). A fim de obter um mutante auxotrófico da linhagem de *K. marxianus* UFV-3 o gene *URA3* desta linhagem foi amplificado, clonado e um fragmento da sua região codificadora foi retirado obtendo-se um gene inativo *URA3Δ* que foi utilizado na transformação da *K. marxianus* UFV-3. Neste trabalho não foi possível obter uma linhagem de *K. marxianus* UFV-3 auxotrófica para uracila, por isso utilizamos a linhagem CBS 6556 já auxotrófica para uracila. Esta linhagem foi transformada por eletroporação utilizando os cassetes *FLO* obtendo-se 4 diferentes linhagens floculantes de *K. marxianus* CBS 6556 que foram selecionadas em meio sem uracila. A análise fenotípica dos transformantes mostrou que todas as linhagens eram floculantes, contudo, o grau de floculação variou entre as 4 linhagens. Avaliou-se o perfil fermentativo das linhagens floculantes de *K. marxianus* utilizando glicose, lactose e glicose mais lactose como fonte de carbono e energia. Foi verificado que a linhagem transformada com o cassete contendo o gene *FLO9* (KMCBSFLO9)



apresentou melhor capacidade fermentativa e manteve sua capacidade de floculação. Com a finalidade de verificar a influência do fenótipo de floculação na viabilidade celular em resposta ao etanol a linhagem de KMCBSFLO9, assim como da linhagem menos floculante (KMCBSFLO10), e a não floculante (KMCBS $\Delta$ URA3) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de etanol. Os resultados demonstraram que tanto a linhagem não floculante como as duas linhagens floculantes se mostraram resistentes ao etanol.

## ABSTRACT

BELO, Edgard Valdomiro Charles, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, August, 2013. **Construction of a flocculent strain of *Kluyveromyces marxianus* with potential to produce ethanol.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-Adviser: Wendel Batista da Silveira.

Flocculent yeasts are useful in fermentation processes because they can be easily separated from the fermentation mash reducing costs with cell separation equipment. The flocculation phenotype is not often found in native yeasts, including the species *Kluyveromyces marxianus* which has a high biotechnological potential due to its ability to assimilate a variety of substrates, ferment at higher temperatures and present a high growth rate. This work aimed at the construction of flocculent strains of *K. marxianus* with potential to ferment agro-industrial residues. The cassettes used in the construction of flocculent strains of *K. marxianus* were amplified from 4 different flocculent strains of *Saccharomyces cerevisiae*, each strain has a cassette consisting of the *URA3* gene as a selection mark and a flocculation gene *FLO* under control of the constitutive promoter *TDH3* (*URA3-TDH3p-FLO*) and each of these strains contains a different flocculation gene (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9* and *FLO10*). In order to obtain an auxotrophic mutant strain of *K. marxianus* UFV-3, the *URA3* gene of this strain was amplified and cloned. Then a fragment of its coding region was removed yielding an inactive gene (*URA3Δ*), which was used in the transformation of *K. marxianus* UFV-3. Due to the impossibility to obtain an auxotrophic strain of *K. marxianus* UFV-3, we used the CBS 6556 strain auxotrophic for uracil. This strain was transformed by electroporation using the cassettes from *S. cerevisiae*. We obtained 4 flocculent strains of *K. marxianus* CBS 6556 that were selected by growth in medium without uracil. By carrying out the phenotypic analysis of the transformants, it was found that all the strains were flocculants; however, the flocculation degree was different between the 4 strains. The fermentation characteristics of the flocculent strains of *K. marxianus* were evaluated by using glucose, lactose and glucose/lactose as carbon and energy source and it was found that the strain transformed with the cassette containing the gene *FLO9* (KMCBSFLO9) was the strain that showed the best fermentative performance preserving its ability to flocculation. In order to verify the influence of flocculation phenotype in the alcohol tolerance, the

KMCBSFLO9 strain, the less flocculant strain (KMCBSFLO10) and the no-flocculant strain (KMCBS $\Delta$ URA3) were cultured in the presence of different concentrations of ethanol. The results showed that the flocculent and no-flocculant strains present higher cell viability after 12 hours of culture in the presence of different concentrations of ethanol.

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por tecnologias eficientes de produção de etanol tem sido estimulada, especialmente a partir de matérias primas que não competem com a produção de alimentos, como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar e o soro de leite que são resíduos gerados pelas indústrias sucroalcooleira e de laticínios respectivamente.

O uso da *Saccharomyces cerevisiae*, tradicional levedura da fermentação alcoólica, na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica e de soro de leite tem sido limitado pela incapacidade dessa levedura de crescer em altas temperaturas, assimilar xilose, principal pentose encontrada na fração hemicelulósica da biomassa, e assimilar lactose, o açúcar do soro de leite (NONKLANG et al., 2008, SILVEIRA et al., 2005). Ao contrário da *S. cerevisiae*, a levedura *Kluyveromyces marxianus* é termotolerante e apresenta capacidade de assimilar uma ampla variedade de açúcares encontrados em resíduos agroindustriais. Com o uso de leveduras termotolerantes como a *K. marxianus*, os processos fermentativos poderiam ser conduzidos sob altas temperaturas diminuindo os custos de resfriamento dos biorreatores e também os riscos de contaminação, além de permitir o acoplamento das etapas de sacarificação e fermentação (NONKLANG et al, 2008).

Além do uso de leveduras termotolerantes, a utilização de leveduras floculantes é uma alternativa economicamente promissora, pois a formação de flocos devido à agregação celular leva a separação da biomassa do meio de fermentação, providenciando um sistema natural de separação. Assim, o objetivo deste trabalho foi construir uma linhagem floculante de *K. marxianus* com pontencial para produzir bioetanol a partir resíduos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar e soro de leite.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Panorama energético

Atualmente a exploração e utilização de recursos fósseis não renováveis corresponde a maior parcela da matéria-prima utilizada para obtenção de energia, sendo que o petróleo é o principal componente da matriz energética mundial. A escassez de combustíveis fósseis e a poluição ambiental proveniente de seu uso têm despertado o interesse na busca por fontes renováveis de energia (ZHAO *et al.*, 2009a). Nesse contexto, políticas governamentais têm incentivado o uso de combustíveis provenientes de fontes renováveis e consequentemente têm impulsionado a produção mundial de biocombustíveis. Estudos apontam que o consumo mundial de etanol, principal biocombustível no mundo, crescerá até 2020, alcançando aproximadamente 177,7 bilhões de litros/ano, um volume 148% superior ao consumido em 2010 (ERNST E YOUNG TERCO, 2011).

No ano de 1975 foi implantado no Brasil o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) a fim de estimular a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. Esse programa tornou-se o maior programa energético do mundo, com a utilização de combustível líquido alternativo, renovável e pouco poluente (AMORIM, 2005). Nessa época, grandes avanços tecnológicos foram alcançados no setor sucroalcooleiro nacional, destacando-se o controle microbiológico e operacional do processo, a utilização de leveduras selecionadas, o controle de enchimento das dornas de fermentação e de perdas na centrifugação dentre outros (VASCONCELOS, 2006). Em 2010 o Brasil foi o maior exportador e o segundo maior produtor de etanol do mundo.

Apesar de sua vocação natural para a produção de etanol, desde 2008 o mercado brasileiro vem apresentando um crescente descompasso entre a oferta efetiva e a demanda potencial por este produto. Pelo lado da demanda, as vendas de automóveis *flex*, segundo dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA), aumentaram cerca de 11% ao ano entre 2008 e 2010. Como resultado, a frota de veículos flex em circulação já ultrapassa 12 milhões de unidades, com participação estimada de 43% na frota total de veículos

leves (MME 2011). Já a oferta de etanol ficou praticamente estagnada no mesmo período. Enquanto em 2008 foram produzidos 27,1 bilhões de litros do produto, em 2010 foram produzidos 27,9 bilhões de litros, o que representa um crescimento de apenas 1,5% ao ano (EPE 2011).

A consequência mais visível desse descompasso entre oferta e demanda se dá sobre o preço do etanol, além de outros problemas que causam impacto direto na balança comercial brasileira. Recentemente, houve importação de mais de 400 milhões de litros de etanol para garantir o abastecimento do mercado doméstico na entressafra de 2010-2011. Cenário oposto ao verificado em 2008, no auge dos investimentos neste setor, quando o Brasil exportou cerca de cinco bilhões de litros de etanol, MDIC/Secex (2010).

Para superar os problemas associados à oferta de etanol, é necessário reverter o atual cenário aumentando investimentos em novas tecnologias de produção do mesmo.

## **2.2. Matérias-Primas Alternativas**

A busca por tecnologias eficientes de produção de etanol, alternativas às tradicionais, tem sido estimulada, especialmente a partir de matérias-primas que não competem com a produção de alimentos, como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar e o soro de leite (MUSSATO et al., 2010), que são resíduos gerados pelas indústrias sucroalcooleira e de laticínios, respectivamente.

No ano de 2007, foram produzidas 606 milhões de toneladas de biomassa lignocelulósica no Brasil (CASTRO, 2010), sendo o bagaço de cana-de-açúcar a biomassa mais abundantemente gerada, cerca de 147 milhões de toneladas. As biomassas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza, sendo compreendidas, em sua grande maioria, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras (SOUZA et al., 2012). Essa biomassa é constituída de 35 a 50% de celulose, até 35% de hemicelulose e de 5 a 30% de lignina. A celulose é um homopolissacarídeo linear, não ramificado, composto por resíduos de D-glicose, unidos por ligações  $\beta(1-4)$ .

Na natureza a celulose forma uma estrutura parcialmente cristalina na qual as cadeias individuais do polissacarídeo formam um rearranjo compacto estabilizado por ligações de hidrogênio. A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por xilana, manana, beta-glicano e xiloglicano. A lignina é um polímero complexo formado de unidades de fenilpropanóides, com estrutura variável dependendo da espécie de planta (MAKI-ARVELA *et al.*, 2010).

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica se mostra uma alternativa promissora para aproveitar as grandes quantidades de resíduos agroindustriais que são gerados. Tal produção é realizada em quatro etapas: (1) pré-tratamento químico e físico da biomassa; (2) hidrólise das fibras de celulose e da hemicelulose; (3) fermentação; (4) destilação do produto final (Hasunuma e Kondo, 2011). O pré-tratamento é necessário na deslignificação da biomassa, liberando a celulose e hemicelulose de seu complexo com a lignina, e na redução da cristalinidade da celulose a fim de tornar os polissacarídeos acessíveis para a degradação. Em seguida, as fibras de celulose e hemicelulose são hidrolisadas por um processo catalisado por enzimas ou ácidos gerando os carboidratos fermentescíveis (hexoses e pentoses). Estes açúcares provenientes das frações de celulose e hemicelulose podem ser fermentados posteriormente por micro-organismos, enquanto a lignina, principal sólido remanescente, pode ser queimada para gerar calor e eletricidade para o processo (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2006).

Outra fonte alternativa para a produção de etanol é o soro de leite. O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo e produziu, em 2010, cerca de 31,4 bilhões de litros de leite (FIL/IDF, 2011). A estimativa de produção de queijo no país foi de 928 mil toneladas, de acordo com a ABIQ (2013) e o estado de Minas Gerais se destaca como o maior produtor de leite e queijo do país.

O principal produto da indústria do queijo é o soro do leite, cuja composição é de aproximadamente 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de lipídios, 0,2% de ácido láctico, além de minerais e vitaminas (GHALY e BEMHASSAM, 1995). Para produzir um quilo de queijo, nove quilos de soro são gerados sendo que o processamento de cerca de 100 toneladas de leite produz

aproximadamente a mesma quantidade de compostos orgânicos nos efluentes que uma cidade de 55.000 habitantes (GONZÁLEZ-SISO *et al.*, 1996). A legislação ambiental proíbe o descarte do soro no ambiente, solo e águas sem um prévio tratamento. O descarte do soro de leite sem prévio tratamento pode provocar danos ambientais devido à alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), calculada entre 50.000 a 60.000 mg de O<sub>2</sub> por litro de soro. Simplesmente tratar o soro é economicamente inviável para a grande parte das indústrias de laticínios, que é constituída por pequenas e médias empresas (GHALY *et al.*, 2003). O acopamento do tratamento do soro com a geração de produtos de interesse econômico é uma alternativa para reduzir os custos do processo.

As proteínas presentes no soro de leite possuem aminoácidos essenciais que são facilmente digeríveis, o que as qualificam como sendo de elevado valor biológico do ponto de vista nutricional. Contudo, apenas a recuperação das proteínas do soro de leite, que seria a etapa inicial para o seu aproveitamento, não resolve o problema ambiental causado por este subproduto da indústria de queijo, uma vez que não há remoção da lactose do permeado gerado na ultrafiltração (VIENNE e STOCKAR, 1985). Assim, a conversão da lactose do soro de leite a etanol por fermentação se apresenta como uma alternativa promissora por não gerar impactos negativos ao ambiente e por produzir uma fonte de energia renovável. A produção de etanol a partir do soro já ocorre na Irlanda, Alemanha, Estados Unidos e principalmente Nova Zelândia, onde 50% do soro são utilizados para produzir etanol (MAWSON, 1994).

Apesar dos avanços alcançados no desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol a partir de matérias-primas como bagaço de cana-de-açúcar e soro de leite, o processo é ainda oneroso quando comparado ao processo tradicional de produção de álcool utilizando o caldo da cana-de-açúcar. Portanto, a tecnologia de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (bagaço de cana) e de soro de leite precisa ser aperfeiçoada para diminuir os custos do processo (MAWSON *et al.*, 1994 e MUSSATO *et al.*, 2010).



### 2.3 A levedura *Kluyveromyces marxianus*

Visto que a levedura *S. cerevisiae* converte eficientemente glicose a etanol e é resistente a compostos presentes nos hidrolisados de material lignocelulósico, esta é geralmente a primeira escolha para produção industrial de etanol de segunda geração. Além disso, tal levedura apresenta facilidade de manipulação genética, genoma sequenciado e disponível e status *Generally Recognized As Safe* (GRAS) de segurança. Contudo, como alternativa à *S. cerevisiae*, existem outras leveduras que apresentam potencial para serem utilizadas na produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais. Tais leveduras são chamadas de não convencionais, como por exemplo as leveduras do gênero *Kluyveromyces*. Essas leveduras assimilam diversos substratos, apresentam propriedades fisiológicas particulares e rotas metabólicas não convencionais, como por exemplo, a utilização e fermentação de lactose e galactose (JEFFRIES e CREGG, 2010).

O uso da *Saccharomyces cerevisiae*, tradicional levedura da fermentação alcoólica, na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica tem sido limitado pela incapacidade dessa levedura crescer em altas temperaturas e assimilar xilose, principal pentose encontrada na fração hemicelulósica da biomassa. Além disso, o potencial fermentativo da *S. cerevisiae* não pode ser explorado na produção de etanol a partir do soro do leite, pois essa levedura não apresenta mecanismo de assimilação da lactose, o principal açúcar deste co-produto industrial (RUSSEL, 1986).

A *Kluyveromyces marxianus* também possui status GRAS e é uma levedura filogeneticamente relacionada com as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, mas apresenta características particulares que são o seu diferencial para aplicação biotecnológica. Ao contrário da *S. cerevisiae*, a levedura *K. marxianus* é termotolerante, possui a capacidade de crescer em um amplo espectro de açúcares, incluindo os açúcares xilose e lactose, além de apresentar uma das maiores taxas de crescimento entre os organismos eucariotos, com tempo de geração de 70 minutos. Embora *K. marxianus* seja classificada como *Crabtree*-negativa, alguns autores a consideram como sendo respiro-fermentativa,

pois quando cultivada em altas concentrações de açúcar, os rendimentos de produção de etanol são próximos ao teórico (LANE e MORRISEY, 2010).

A levedura *K. marxianus* UFV-3, pertencente ao acervo de cultura do Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e foi isolada de ambientes de laticínios da Zona da Mata Mineira. *K. marxianus* UFV-3 fermenta eficientemente o açúcar lactose, encontrado no soro de queijo, apresentando rendimentos próximos ao teórico quando cultivada em baixa concentração de oxigênio, condição normalmente encontrada em fermentações industriais (SILVEIRA *et al.*, 2005). Comparada à *K. lactis*, organismo modelo em estudos do metabolismo de lactose em leveduras, *K. marxianus* apresenta maior capacidade para fermentar a lactose. A razão para esta maior capacidade fermentativa ainda não foi totalmente elucidada. Este maior potencial fermentativo seria devido ao maior fluxo no transporte e metabolismo da lactose quando comparado à *K. lactis*. Esta eficiência seria resultado tanto de maior expressão gênica quanto de maior atividade enzimática de proteínas essenciais à fermentação da lactose. DINIZ *et al.*, (2012) demonstraram que em ambientes com restrição de oxigênio os genes e as enzimas do metabolismo da lactose seriam diferentemente expressos ou ativos em *K. lactis* e *K. marxianus* proporcionando a maior produção de etanol desta última. DINIZ *et al.*, (2012) ainda sugeriram que *K. marxianus* UFV-3 apresenta a capacidade de fermentar eficientemente não apenas a lactose, mas outros carboidratos, pois a expressão do gene *RAG6*, que codifica a piruvato descarboxilase, enzima chave do fluxo fermentativo em leveduras, foi maior em *K. marxianus* UFV-3 do que em *K. lactis*.

## 2.4 Leveduras floculantes

O fenótipo de floculação em leveduras é definido como uma agregação celular, cálcio dependente, assexuada e reversível no qual as células se aderem umas as outras gerando flocos constituídos de um grande número de células (STRATFORD, 1989 a e b). Em condições adversas, a lise de células da camada mais interna no flocos, libera nutrientes para as células nas camadas mais externas (HERCKER et al., 2004).

As proteínas responsáveis pela adesão entre as células ou das células à uma superfície abiótica são chamadas “floculinas” ou “adesinas”. Elas são proteínas da parede celular com diferentes propriedades de ligação a açúcares, em sua grande maioria, e também a peptídeos (ZHAO e BAI, 2009b). O mecanismo de adesão destas proteínas foi revisado e categorizado, por VERSTREPEN e KLIS (2006) em dois principais grupos: adesão “lectin-like” e adesão insensível ao açúcar. A adesão “lectin-like” é causada pela interação de domínios de ligação a carboidratos “lectin-like” com resíduos de açúcares de superfície de células vizinhas, enquanto a adesão insensível ao açúcar depende da ligação das adesinas a peptídeos ou do aumento da interação hidrofóbica entre as células ou entre superfícies abióticas. As leveduras utilizadas neste trabalho serão as do grupo das adesinas sensíveis a açúcares ou “lectin-like”. As leveduras de floculação sensíveis ao açúcar são divididas e classificadas em duas categorias: *Flo1* e *NewFlo* (STRATFORD et al., 1989; STRATFORD e ASSINDER 1991; SIEIRO et al., 1995). As linhagens *Flo1* são constitutivamente floculantes sendo sua floculação inibida apenas por manose, enquanto as linhagens *NewFlo* começam a flocular na fase estacionária e sua floculação é inibida por manose e glicose.

Os genes responsáveis pela expressão das floculinas, descritos até o momento, são chamados genes *FLO*. A família de genes *FLO* é caracterizada por sequências de DNA altamente repetidas na região central dos genes. A recombinação dessas repetições em “tandem” nos genes *FLO* parece ser a grande responsável pela variabilidade genética deste fenótipo, gerando um grupo diverso de linhagens com diferentes fenótipos de floculação e adesão

(VERSTREPEN *et al.*, 2005; SMUKALLA *et al.*, 2008). Foi observado que as linhagens de *S. cerevisiae* com diferentes fenótipos de floculação, carregam diferentes tamanhos dos domínios repetitivos de *FLO1* e *FLO11*, o que pode explicar a diferença na intensidade de floculação (ZHAO e BAI 2009). Adicionalmente, a aquisição ou perda de sequências internas repetidas em *FLO1* em linhagens comerciais de leveduras usadas em cervejarias, foi indicada como responsável pela conversão de tipos de floculação Flo1 para tipos NewFlo (LIU *et al.*, 2007). No geral, quanto mais longo for a repetição deste domínio do DNA, mais forte poderá ser a floculação (VERSTREPEN *et al.*, 2005; SMUKALLA *et al.*, 2008). Dentre a família de genes *FLO*, o gene *FLO1* é o mais conhecido e codifica a proteína Flo1p. Os genes *FLO5*, *FLO9* e *FLO10* codificam proteínas com 96, 94 e 58% de homologia com a proteína Flo1p, respectivamente, enquanto a similaridade entre a proteína *Flo11p* e *Flo1p* é de apenas 37%. O gene *Lg-FLO1*, isolado de linhagens de leveduras encontradas no fundo de biorreatores, é homólogo ao gene *FLO1* e demonstrou ser responsável pelo fenótipo NewFlo (KOBAYASHI *et al.*, 1998).

A floculação é uma propriedade vantajosa para uma linhagem industrial de levedura, pois permite uma rápida, barata e inócuo forma de separação da biomassa do meio de cultura. Estima-se que a eliminação da etapa de centrifugação gere uma economia no custo do processamento de R\$ 0,02 a R\$ 0,03 por litro de etanol produzido. Essa economia é considerável, pois o custo total do processo de produção de álcool de cana de açúcar é de R\$ 0,20 por litro de etanol produzido (VASCONCELOS, 2007). O uso de uma levedura floculante apresenta outras vantagens como: (1) poder ser utilizada em reatores de alta densidade com alta produtividade e tempo de fermentação reduzido (TEIXEIRA *et al.*, 1990); (2) poder ser utilizada em diferentes fermentadores que utilizam massa suspensa, evitando o risco de perda (lavagem) de biomassa (DOMINGUES *et al.*, 2000b); (3) apresentar baixas taxas de contaminação, devido a alta atividade metabólica das culturas (DOMINGUES *et al.*, 2000a), quando cultivadas em condições de fermentação contínua; (4) a possibilidade de reaproveitamento da biomassa em outros processos fermentativos, pois o acúmulo da mesma no fundo

do biorreator permite a sua reciclagem (MA *et al.*, 2009). Além disso, o fenótipo de floculação é uma importante característica em linhagens de leveduras produtoras de etanol pois protege as mesmas da ação de substâncias tóxicas, incluindo os efeitos negativos da alta concentração de etanol (HU *et al.*, 2005). Além disso, a floculação permite que as leveduras sejam imobilizadas a um baixo custo em fermentações contínuas com uma maior produtividade volumétrica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Construir linhagens floclantes de *K. marxianus* com potencial para produzir etanol.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Construir linhagens de *K. marxianus* *ura3Δ* que apresentem rendimentos de etanol similares à linhagem selvagem;

Construir linhagens transformantes de *K. marxianus* com habilidade de floclação;

Avaliar o potencial fermentativo das linhagens floclantes de *K. marxianus* pela produção de etanol em meio constituído de glicose, lactose e glicose mais lactose como fonte de carbono;

Avaliar a tolerância ao etanol das linhagens de *K. marxianus* floclantes.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismos

Os Micro-organismos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1: Micro-organismos utilizados neste trabalho**

| <b>Linhagem</b>                          | <b>Genótipo</b>                                                              | <b>Fonte</b>                                                                                                                                  |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E.coli</i> DH5α                       | <i>supE44 DlacU169 (f80) lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-I relA1</i> | Acervo de cultura do Laboratório de Biotecnologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa                   |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS6556   | <i>URA3Δ</i>                                                                 | Profa. Maria Gonzalez Siso<br>Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de A Coruña-Espanha                                |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3     | Linhagem selvagem                                                            | Acervo de cultura do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa- Brasil |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RAK 3977 | <i>MATa ura3Δ0 URA3-TDH3p-FLO1</i>                                           | Acervo de cultura do National BioResource Project – Yeast-Japão                                                                               |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RAK 3979 | <i>MATa ura3Δ0 URA3-TDH3p-FLO5</i>                                           | Acervo de cultura do National BioResource Project – Yeast-Japão                                                                               |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RAK 3981 | <i>MATa ura3Δ0 URA3-TDH3p-FLO9</i>                                           | Acervo de cultura do National BioResource Project – Yeast-Japão                                                                               |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RAK 3983 | <i>MATa ura3Δ0 URA3-TDH3p-FLO10</i>                                          | Acervo de cultura do National BioResource Project – Yeast-Japão                                                                               |

## 4.2 Meios de cultura e condições de cultivo

A bactéria *E. coli* DH5a foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) ( peptona 2% p/v, extrato de levedura 1% p/v e cloreto de sódio 1% p/v). Para seleção e manutenção dos plasmídeos e manipulações de DNA, o cultivo foi feito em meio LB suplementado com 100 mg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. A temperatura de cultivo foi de 37 °C.

A ativação e a manutenção das leveduras *S. cerevisiae* e *K. marxianus* foram realizadas em meio YPD (extrato de levedura 1% p/v, peptona 2% p/v e glicose 2% p/v acrescido de ágar 1,5% p/v quando necessário) a 28°C sob agitação de 180 rpm.

A seleção de mutantes auxotróficos de *K. marxianus* para uracila foi feita em meio sólido YNBUG-FOA - *Yeast Nitrogen Base* (YNB) 0,67% p/v sem aminoácidos Difco®, glicose 2% p/v e Ácido-5-Fluoro orótico (5-FOA) 0,1% p/v, acrescido de uracila 50 mg.L<sup>-1</sup> a 28°C. O gene *URA3* codifica a enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase (OMP), presente na via biossintética das pirimidinas. Linhagens deficientes neste gene tornam-se resistentes ao composto ácido 5-fluorótico (5-FOA). A confirmação dos mutantes foi feita em placas replicas utilizando meio YNBG - *Yeast Nitrogen Base* (YNB) 0,67% p/v sem aminoácidos Difco®, e de glicose 2% p/v - e meio YNBGU, de composição idêntica ao YNBG acrescido de uracila 50 mg.L<sup>-1</sup> . A confirmação de transformantes apresentando gene *FLO* foi feita em placas contendo meio YNBG sem uracila

A avaliação do potencial fermentativo das linhagens *K. marxianus* foi realizada através de cultivo das mesmas em meio YPD (glicose 4% p/v), YPL (lactose 5% p/v), YPDL (glicose 4% p/v e lactose 5% p/v) líquido a 37°C sob agitação de 100 rpm.



### 4.3 Oligonucleotídeos

Os diferentes oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 2.

**Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.**

| <b>Fragmento a ser Amplificado</b>                                 | <b>Nome</b> | <b>Pares de <i>Primers</i><br/>(Sequencia 5' – 3')</b> |
|--------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------|
| URA3 de <i>Kluyveomyces marxianus</i> UFV-3                        | URAFOW      | GAGCATCTTGGTCTTCTGAG                                   |
|                                                                    | URAREV      | CGAGGTACCGTAACTTCTGATCCGAG<br>TAC                      |
| URA3-TDH3p-FLO1 de<br><i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>RAK 3977  | FLO1- 401   | TATTTTAAATTCTTGTCACCAGTAAA<br>CAGAACATCCAAAAGGCGCGCCCG |
|                                                                    | FLO1+5037c  | AAGTTGGCGATGGTTCATTATTGC                               |
| URA3-TDH3p-FLO5 de<br><i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>RAK 3979  | FLO5- 401   | CAAATGATTTTCTTTAAATTGATTAG<br>CACCATAAAAAAGGCGCGCCCG   |
|                                                                    | FLO5+3759c  | GTACTGCGTGTGGCATGTAAGCAGC                              |
| URA3-TDH3p-FLO9 de<br><i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>RAK 3981  | FLO9- 401   | GCAATTTAAAAAGAACAATTGTACAA<br>TAAAGCCCCAAAAGGCGCGCCCG  |
|                                                                    | FLO9+4454c  | ACTAGATCTTACGTTAGTACTGCTG                              |
| URA3-TDH3p-FLO10 de<br><i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>RAK 3983 | FLO10- 401  | ATAGGCCGGTCAAAATATATATCGA<br>GCAGCCACAGGCATTTTATGTGAT  |
|                                                                    | FLO10+3980c | CGCCGGGCAGTAGTAACTATTGTTA                              |

#### **4.4 Obtenção de mutantes de *Kluyveromyces marxianus* auxotróficos para uracila utilizando a luz ultravioleta (UV)**

Células de *K. marxianus* foram cultivadas em Erlenmeyer de 250 mL com 125mL de meio YPD à 30 °C sob agitação de 200 rpm. Células em crescimento exponencial foram coletadas e lavadas duas vezes com solução salina. Nesse procedimento as células foram centrifugadas a 4500xg durante 2 minutos. As células foram ressuspensas em 1 mL da solução salina. Uma concentração de  $1,8 \times 10^7$  células/mL foi submetida à mutagênese por irradiação ultravioleta (UV), a 14 cm de distância. Foram coletadas alíquotas de 100 µL da suspensão de leveduras irradiadas em diferentes intervalos de tempo. As alíquotas foram devidamente diluídas e 200µL foi plaqueado em meio YNBGU. As placas foram incubadas por 5 dias a 30 °C e protegidas contra luz para evitar a fotoreativação do sistema de reparo.

Posteriormente as colônias crescidas após 5 dias foram plaqueados em meio YNBGU-FOA contendo ácido 5-fluoro orótico (5-FOA)  $1\text{g.L}^{-1}$  e uracila  $50\text{mg.L}^{-1}$ , a fim de selecionar o mutante auxotrófico. As colônias que apresentaram crescimento em YNBG-FOA foram cultivadas em placas replicas utilizando meio YNBG - *Yeast Nitrogen Base (YNB)* 0,67% p/v sem aminoácidos Difco® e glicose 2% p/v) e meio YNBGU quando foi acrescido uracila á concentração de 50 mg/L a 28°C, afim de confirmar a presença de mutantes *ura3* e evitar a presença de falsos positivos.

#### 4.5 Obtenção de mutantes de *Kluyveromyces marxianus* *URA3* $\Delta$

Os cassetes utilizados na construção de linhagens floculantes de *K. marxianus* possuem o gene *URA3* como marca de seleção, ou seja, conferem às linhagens mutantes *ura3* a capacidade de sintetizar uracila. O gene *URA3* codifica a enzima orotidina-5'-monofosfato descarboxilase (OMP), que atua na reação de descarboxilação de oritidina 5'-monofosfato em uridina 5'-monofosfato. Na presença de ácido 5-fluoro orótico, que é um análogo da oritidina 5'-monofosfato, a enzima produz 5'-fluoracil monofosfato que é tóxico para a célula.

Após transformadas com o respectivo cassete, as células devem ser cultivadas em meio seletivo sem uracila a fim de selecionar somente as células transformadas. O método utilizado para gerar linhagens mutantes *ura3* foi realizado como descrito por PECOTA et al. 2007, e se baseia na substituição do gene *URA3* funcional por uma sequência de extremidades homólogas, 162 pares de bases menor, resultando em um gene não funcional.

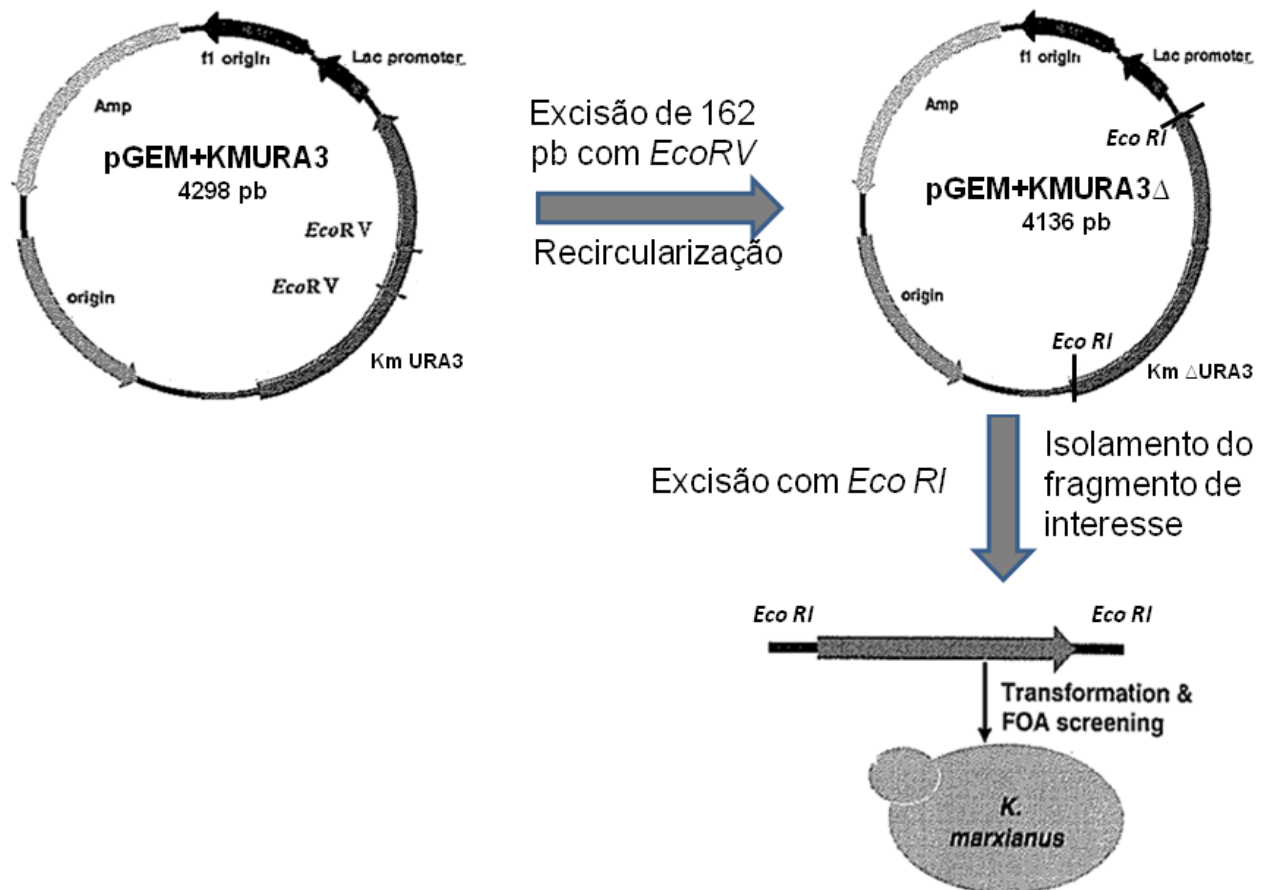
Assim, o gene *URA3* da linhagem *K. marxianus* UFV-3 foi amplificado a partir do seu DNA cromossomal utilizando o par de *primers* URAFOW e URAREV (Tabela 2), o qual foi desenhado para amplificar desde a região promotora até a região terminadora do gene *URA3*. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi conduzida com: 2  $\mu$ L de DNA genômico, 1 unidade da enzima *Platinum®TaqDNA polymerase*, 5  $\mu$ L de *PCR Buffer*, 2 mM de  $MgCl_2$  e 10 pmoles de *primer* (URAFOW e URAREV) em um volume final de 50  $\mu$ L, seguindo o programa: i) 94 °C por 2 minutos; ii) 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 70 °C (28 ciclos): 70 °C por 2 minutos (1 ciclo). A sequência codificadora do gene *URA3* da *K. marxianus* foi obtida através da análise no banco de dados GenBank do NCBI e os *primers* para amplificação do mesmo foram desenhados utilizando-se o programa *Primer3* (version 0.4.0).

O produto da reação de amplificação foi purificado e clonado no plasmídeo pGEM®-T (pGEM®T *Easy Vectors System*, Promega), formando o plasmídeo pGEM®T+KMURA3. Posteriormente foi realizada a transformação da *E. coli* DH5 $\alpha$

e a triagem dos transformantes foi conduzida através do cultivo em meio LB ágar contendo 50µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina.

O DNA plasmidial das células de *E. coli* DH5α transformantes foi extraído pelo método da lise alcalina (SAMBROOK E RUSSEL, 2001). Logo após o plasmídeo pGEM®T+KMURA3 foi submetido a digestão com a enzima de restrição *EcoRV*, que apresenta, neste caso, dois sítios de corte distantes 162 pb e relativamente no centro do gene *URA3*. O software NEBcutter V2.0 (New England BioLabs®) foi utilizado para verificação do mapa de restrição do gene *URA3*. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X. O plasmídeo digerido e linearizado foi purificado do gel utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e posteriormente religado utilizando a enzima T4 DNA ligase e tampão apropriado, formando o plasmídeo pGEM®T+KMΔURA3.

O plasmídeo contendo o gene *URA3Δ*, depois de clonado em células *E. coli* DH5α foi extraído da mesmas e submetido a digestão com a enzima *EcoRI* visto que o plasmídeo pGEM®T+KMΔURA3 apresenta dois sítios de restrição flanqueando o gene *URA3Δ*, liberando o gene inativado. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE 1X, analisado com o padrão de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) como referência e purificado como descrito anteriormente (Figura 1). O fragmento *URA3Δ* foi amplificado por PCR utilizando os mesmos *primers* anteriores (URAFOW, URAREV). O DNA foi purificado e utilizado para transformar a linhagem selvagem de *K. marxianus* UFV3 (Tabela 1) pelo método de acetato de lítio e ou eletroporação. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio YNBGU-FOA. Controles negativos (não transformados com o fragmento *URA3Δ*) também foram utilizados em cada transformação.



**Figura 1: Estratégia utilizada na obtenção do gene  $\Delta URA3$ .** O plasmídeo pGEM contendo o gene *URA3* foi submetido à digestão com a enzima de restrição *EcoRV* sendo retirado um fragmento de 162pb da região codificadora deste gene tornando o mesmo inativo. Após recircularização, o plasmídeo pGEM+KM $\Delta URA3$  foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* obtendo-se um fragmento correspondente ao gene inativo *URA3 $\Delta$* , o qual foi utilizado na transformação da levedura *K. marxianus* UFV3.

#### 4.6 Amplificação dos cassetes contendo diferentes genes de floculação

As células de *Saccharomyces cerevisiae* floculantes foram adquiridas no acervo de cultura do National BioResource Project – Yeast-Japão (Tabela 1).

Estas 4 linhagens de *S. cerevisiae* (RAK 3977, RAK 3979, RAK 3981 e RAK 3983) contêm um cassete constituído pelo gene *URA3* e por um gene de floculação *FLO*, sob o controle do promotor constitutivo TDH3 (*URA3*-TDH3p-*FLO*). Sendo que cada uma dessas linhagens contém um gene de floculação diferente (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9* E *FLO10*). O DNA genômico foi extraído de cada linhagem e o cassete de genes foi amplificado seguindo a recomendação do fabricante da enzima *KOD Hot Start DNA polymerase* (Toyobo, Osaka, Japan) em um volume final de 50 µL, utilizando os *primers* que estão na Tabela 2.

A reação da polimerase em cadeia foi conduzida seguindo o programa: i) 95 °C por 2 minutos (1 ciclo); ii) 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 70 °C por 3 minutos (40 ciclos); 70 °C 2 minutos ( 1 ciclo). Uma alíquota do produto da reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE 1X, e analisados com o padrão de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) como referência. As linhagens de *Kluyveromyces marxianus* mutantes *ura3* foram transformadas com os cassetes amplificados a partir da *S. cerevisiae* e os transformantes foram selecionados em meio YNBG sem uracila ( Figura 2).

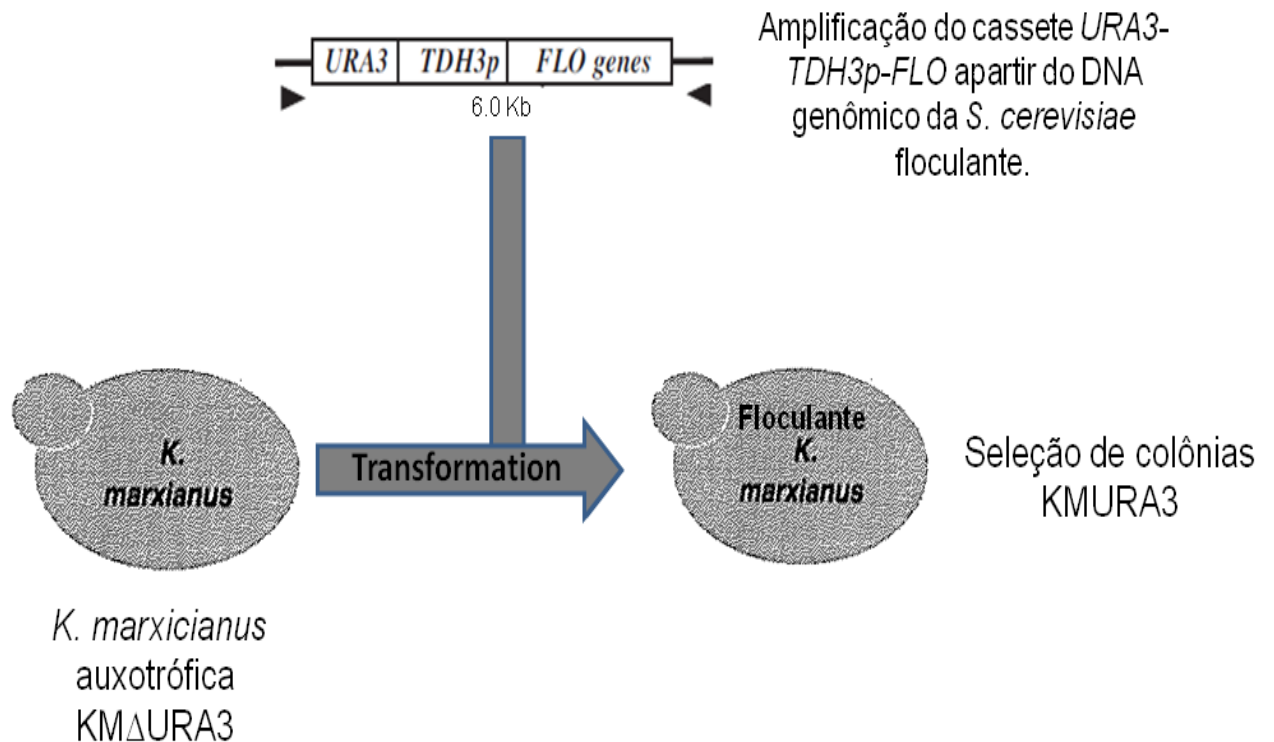
#### 4.7 Transformação da *Kluyveromyces marxianus*

As células foram transformadas pelo método de acetato de lítio (choque térmico) e eletroporação. Para o método de acetato de lítio (choque térmico), as células foram ativadas por crescimento em meio YPD ágar (glicose 2% p/v) por 48 horas. Após a ativação, as células foram inoculadas em Erlenmeyer de 25 ml contendo 10 mL de meio YPD (glicose 2% p/v) e incubadas à 28°C sob agitação de 200 rpm durante 16 horas. O pré-inóculo foi transferido para 50 mL de meio YPD (glicose 2% p/v) com valor inicial de DO<sub>600</sub> 0,1. As células foram incubadas a

28°C sob agitação de 200 rpm até atingir o valor final de DO<sub>600</sub> entre 1,0-1,5, não excedendo DO<sub>600</sub> final de 1,5. As células foram centrifugadas (4500xg por 2 min), suspensas em 1,5 mL de solução TM ( 40% PEG 3550, 0,2 M LiAc, 10 mM Tris-HCl pH 7.5), acrescido de DTT em uma concentração final de 10 mM e transferidas para um microtubo de 1,5 ml estéril sendo submetidas à nova centrifugação (4500xg por 2 min). O sedimento de células foi suspenso em 0,5 mL de solução TM e separado em alíquotas de 100 µL. Foi então adicionado > 2µg do fragmento purificado ou no caso de PCR 15µL da reação. A mistura células-DNA foi incubada a 47°C por 13 minutos com posterior adição de 900 µL de YPD. Aliquotas de 250 µL da suspensão de células foram plaqueadas em meio seletivo apropriado e incubadas a 28°C por 2 ou 3 dias.

Para o método de eletroporação as células foram ativadas por crescimento em meio YPD (glicose 2% p/v) sólido a 37 °C por 48 horas. Após ativação as células foram inoculadas em Erlenmeyer de 25ml contendo 10 mL de meio YPD (glicose 2% p/v) e incubadas à 28°C sob agitação de 200 rpm durante 16 horas. O pré-inóculo foi transferido para 50 mL de meio YPD com valor inicial de DO<sub>600</sub> igual a 0,1. As células foram incubadas a 28°C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO<sub>600</sub> final entre 1,0-1,5. Posteriormente as células foram lavadas 1x com H<sub>2</sub>O estéril e inoculadas em 25 mL de meio YED (extrato de levedura 1% p/v e glicose 2% p/v), acrescido de 20mM de DTT e 20mM de HEPES (O pH foi medido e ajustado para 8,0 com NaOH 5M estéril, quando necessário) por 45 minutos a 28 °C sob agitação de 180 rpm. As células foram então centrifugadas (4500xg por 2 min) e o sedimento celular foi ressuscitado em 0,5 mL de solução EB (10 mM de Tris-HCl, 270 mM de sacarose, 1 mM de LiAc) e separadas em alíquotas de 50 µL. Foram então pré-incubadas com > 2µg do fragmento purificado ou no caso de PCR 10 µL da reação, acrescido de 50 µg de ssDNA, por 15 minutos no gelo. As células juntamente com o inserto foram então submetidas a eletroporação em cubeta de 0,2 cm, as condições de eletroporação foram as seguintes: 1000 V; 25 µF e 400 Ω. Após o pulso foi adicionado, imediatamente, 900 µL de meio YED (extrato de levedura 1% p/v e glicose 2% p/v) gelado. As células foram então transferidas para um microtubo estéril e incubadas por 20 minutos no gelo sendo

posteriormente incubadas por 1 hora à 28 °C sob agitação de 180 rpm. Aliquotas de 250 µL da suspensão de células foram semeadas em meio seletivo apropriado e incubadas a 28°C por 2 ou 3 dias.



**Figura 2:** Estratégia utilizada na obtenção da linhagem de *K. marxianus* floculante. A linhagem *K. marxianus* mutante auxotrófica foi transformada com o cassete contendo o gene *URA3*, o promotor *TDH3* e o respectivo gene *FLO*.



#### **4.8 Testes de floculação (Análise fenotípica)**

As linhagens transformantes de *K. marxianus* foram cultivadas por 16 horas em tubos contendo meio YPD (glicose 2% p/v) a 37°C sobre agitação de 180 rpm. As culturas foram agitadas vigorosamente em vortex por 1 minuto e deixadas em repouso por determinado tempo para observar a formação de sedimento celular.

#### **4.9 Avaliação do pontencial fermentativo das linhagens *Kluyveromyces marxianus* floculantes**

A avaliação do potencial fermentativo das linhagens de *K. marxianus* transformadas com os genes *FLO* de *S. cerevisiae* foi realizada pelo cultivo das mesmas em meio YPD (glicose 4% p/v), YPL (lactose 5% p/v), YPDL (glicose 4% p/v e lactose 5% p/v) a 37°C sob agitação de 100 rpm. As células transformantes foram previamente crescidas em 50mL de meio YPD (glicose 2% p/v), YPL (lactose 5% p/v), YPDL (glicose 4% p/v e lactose 5% p/v) 16 horas à 37°C sob agitação de 180 rpm. O pré-inóculo foi centrifugado e a 4500xg por 5 minutos e uma massa de 63 miligramas de peso úmido, que corresponde a uma D.O<sub>(600)</sub> inicial 2,0 para 20 mL de meio, foi inoculada em 20 mL dos meios YPD (glicose 4% p/v), YPL (lactose 5% p/v), YPDL (glicose 4% p/v e lactose 5% p/v). Alíquotas foram coletadas para análise de consumo de açúcares e produção de etanol por cromatografia líquida de alta eficiência.

#### **4.10 Análise do consumo de açúcares, produção de etanol e determinação dos parâmetros fermentativos**

A quantificação de glicose, lactose e etanol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando coluna de troca iônica Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>(Phenomenex), mantida a 60 °C. Como eluente para separação foi utilizado ácido sulfúrico 5 mM, aplicado a uma taxa de eluição 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. A coluna foi acoplada ao detector de índice de refração HP 1047A.

Na montagem dos métodos foram preparados padrões de 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 mM para glicose, lactose e etanol.

O rendimento de produto no final do cultivo em batelada em relação ao substrato, sob condição aeróbica, foi calculado como:

$$Y_{P/S} = \frac{P1 - P0}{S1 - S0}$$

Onde P1 é a concentração final do produto em g.L<sup>-1</sup>; P0 é a concentração inicial do produto em g.L<sup>-1</sup>; S1 é a concentração final do substrato em g.L<sup>-1</sup>; S0 é a concentração inicial de substrato em g.L<sup>-1</sup>.

A produtividade volumétrica (P<sub>etanol</sub>) foi calculada como:

$$P_{ETANOL} = \frac{P1 - P0}{\Delta t}$$

Onde P1 é a concentração final do produto em g.L<sup>-1</sup>; P0 é a concentração inicial do produto em g.L<sup>-1</sup>; Δt o período de tempo em horas.

#### **4.11 Avaliação da viabilidade celular das linhagens floculantes em presença de etanol**

Para avaliar a viabilidade das células floculantes em presença de etanol, as mesmas foram cultivadas em meio YPD (glicose 4% p/v) contendo diferentes concentrações de etanol. As linhagens escolhidas para este teste foram: a linhagem que apresentou a maior produtividade de etanol sem perder a capacidade de flocular, a linhagem cujo fenótipo de floculação é mais fraco comparado às demais floculantes e a linhagem não floculante. Primeiramente as células foram inoculadas em Erlenmeyer de 25 ml contendo 10 mL de meio YPD

e incubadas à 37°C sob agitação de 200 rpm durante 16 horas. O pré-inóculo foi desfloculado, para isso as células foram coletadas por centrifugação (4500xg por 4min) e posteriormente lavadas com solução de EDTA 100 mM, EDTA 30 mM e água destilada e autoclavada. As células foram então ressuspensadas em água estéril e a DO<sub>600nm</sub> foi mensurada. Quantidades iguais de células foram inoculadas em 2 mL de meio YPD (glicose 4% p/v) com valor inicial de DO<sub>600nm</sub> 0,2 acrescido de etanol nas concentrações finais de 2%, 4%, 8% e 10% (v/v). As culturas, foram cultivadas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. A cada 2 horas tubos contendo 2 ml de YPD (glicose 4% p/v) com diferentes concentrações de etanol foram centrifugados e desfloculados como descrito acima, mesmo a linhagem não floculante foi submetida ao procedimento de desfloculação. As células foram então ressuspensas em água estéril e a DO<sub>600nm</sub> foi mensurada, em triplicata, na leitora Versamax (microplate reader, Molecular Devices) a fim de acompanhar o crescimento das 3 linhagens. A velocidade específica máxima de crescimento das culturas, em cada concentração de etanol, foi determinada pela regressão linear dos valores obtidos pelo logaritmo neperiano da DO<sub>600nm</sub> na fase exponencial de crescimento (no período de tempo de 6 horas), usando pelo menos cinco pontos de um gráfico  $\ln DO_{600nm}$  versus tempo. A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) corresponde ao coeficiente angular da reta tangente.

Depois de 12 horas de crescimento a DO<sub>600nm</sub> das linhagens de *K. marxianus* floculantes e não floculantes cultivadas em diferentes concentrações de etanol foi mensurada e quantidades iguais de células foram adicionadas a 1 mL de água destilada a fim de atingir DO<sub>600nm</sub> 0,2. Essa suspensão de células foi diluída  $10^4$  vezes e semeadas em meio YPD (glicose 2% p/v). As placas foram incubadas a 37 °C por 36 horas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção de mutantes utilizando irradiação Ultravioleta (UV)

Neste trabalho objetivou-se obter linhagens de *K. marxianus* capazes de expressar as proteínas de membrana responsáveis pelo fenótipo de floculação denominadas floculinas. Visto que o marcador de seleção dos cassetes de expressão dos genes de floculação (*FLO*) funcionam por complementação da auxotrofia para uracila, primeiramente foi necessário obter mutantes de *K. marxianus* com o gene *URA3* inativo.

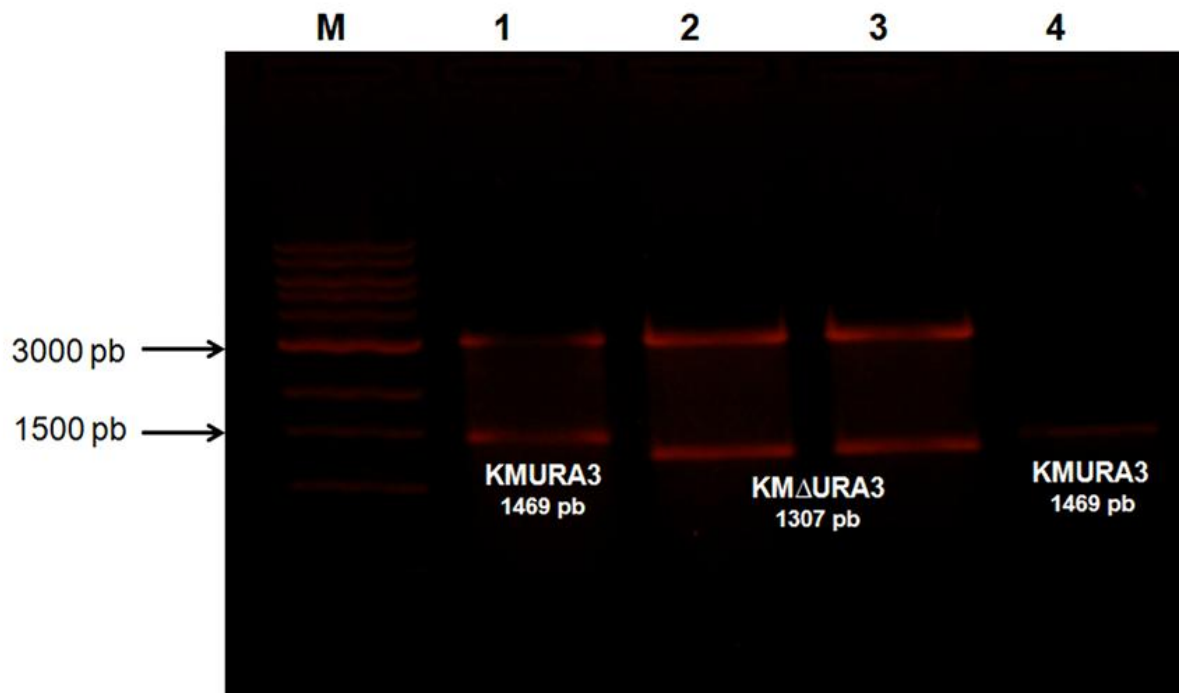
Assim, a linhagem *K. marxianus* UFV-3 foi exposta à luz ultravioleta com o objetivo de obter mutantes auxotróficos *ura3*. A radiação ultravioleta causa danos a células de diferentes formas. A luz ultravioleta aumenta a taxa de alterações no DNA, incluindo transições, transversões e também pequenas adições e deleções (HASHIMOTO et al., 2005; JAMES e KILBEY, 1997), gerando alterações pontuais em varias regiões importantes do DNA.

Das alíquotas coletadas em diferentes tempos de exposição à UV e semeadas em meio YNBGU, as placas com a *K. marxianus* exposta à UV por 4 e 6 minutos foram escolhidas para verificação de presença de mutantes auxotróficos para a uracila, visto que a taxa de sobrevivência das células foi de aproximadamente 22% quando submetidas a 4 minutos de radiação e 2% quando submetidas a 6 minutos de radiação.

As colônias formadas a partir das células expostas à radiação por 4 e 6 minutos foram repicadas em meio YNBG sólido acrescido de ácido 5 fluoro orótico (5-FOA)  $1\text{g.L}^{-1}$  e uracila  $50\text{ mg.L}^{-1}$  (YNBGU-FOA), a fim de selecionar o mutante auxotrófico. Não foram observadas colônias utilizando este meio, indicando a ausência de mutantes auxotrófico para a uracila. Uma vez que o uso da radiação ultravioleta como agente mutagênico não propiciou a obtenção de mutantes auxotrófico para a uracila, a estratégia descrita no item 5.2 foi adotada.

## 5.2 Construção de mutantes de *Kluyveromyces marxianus* *URA3* $\Delta$

O gene *URA3* da *K. marxianus* UFV-3 (1469 pb) foi amplificado e um fragmento de 162 pb da sequência codificadora foi retirado a fim de se obter uma sequência de 1307 pb com extremidades homólogas ao gene *URA3* (*URA3* $\Delta$ ). Tal sequência foi obtida conforme pode ser observado na Figura 3.



**Figura 3:** Fracionamento do produto de digestão utilizando a enzima *EcoRI*. M -padrão de tamanho molecular 1 Kb Ladder (Fermentas). 1 - Clivagem do plasmídeo pGEM+KMURA3 mostrando a liberação do fragmento 1469 pb, referente ao gene KMURA3. 2 e 3 -Clivagem do plasmídeo pGEM+KMURA3 $\Delta$  mostrando a liberação do fragmento 1307 pb, referente ao gene *URA3* $\Delta$ . 4 - Produto da reação de amplificação do gene *URA3* da *K. marxianus* UFV3 (1469 pb), a partir de seu DNA genômico.

A transformação da linhagem de *K. marxianus* UFV-3 com o fragmento *URA3Δ* purificado, foi realizada por choque térmico com acetato de lítio e também por eletroporação, como descrito no item 4.7. Como controle, células não transformadas foram sempre semeadas em outra placa contendo YNBGU-FOA para cada transformação. Nas duas primeiras tentativas de transformação foi verificado um baixo número de colônias (3 a 8 colônias) após 72 horas de crescimento à 30 °C. Em uma segunda tentativa, as células transformantes obtidas na primeira transformação foram utilizadas. Tanto as colônias transformantes, quanto as colônias das placas controle foram repicadas em replicas, uma contendo YNBG e outra contendo YNBGU a fim de verificar a presença de falsos positivos. As placas controle foram analisadas a fim de verificar a presença de possíveis mutantes espontâneos. Se houvesse mutantes auxotróficos para uracila, seria esperado crescimento celular somente no meio no qual a uracila foi acrescentada. Observou-se o crescimento das células nas duas placas, o que revelou a ausência de mutantes *URA3Δ*.

Outras duas tentativas de transformação por choque térmico foram realizadas utilizando-se células provenientes da segunda transformação e da terceira transformação. Observou-se um aumento gradativo de colônias no meio seletivo YNBGU-FOA, sendo que na última tentativa foi verificado a presença de 20 a 30 colônias no meio seletivo, indicando um aumento na resistência ao ácido 5-fluorótico (5-FOA). Contudo, quando as colônias transformantes foram repicadas em meio YNBG e YNBGU, apresentavam crescimento nos dois meios. Para verificar se este aumento de resistência foi devido à perda de atividade do ácido 5-fluorótico, células novas de *K. marxianus* UFV-3 foram repicadas em meio YNBGU-FOA e foi observado o aparecimento de um número pequeno de colônias (de 2 a 3 colônias), resultado similar ao da primeira transformação, indicando que o ácido 5-fluorótico não estava degradado.

Esses resultados sugerem uma baixa eficiência de recombinação homóloga em *K. marxianus*. PECOTA et al., (2007) realizaram procedimento parecido de recombinação utilizando cassete *URA3Δ* em *K. marxianus* KM1 pelo método de eletroporação e relataram que houve grande discrepância entre o número de

colônias formadas na placa de transformantes e na placa controle, sendo a interrupção do gene *URA3* confirmada em alguns candidatos. Estudos comparativos entre os métodos de transformação de acetato de lítio e eletroporação, utilizando a linhagem *K. marxianus* UFV-3, realizados por SANTOS (2012) demonstraram que o método de transformação com acetato de lítio foi bem mais eficiente que o de eletroporação, porém, esses valores foram inferiores aos esperados. Este foi o motivo pela escolha do método de transformação por acetato de lítio no início deste trabalho, porém, como não foi possível obter o mutante, foi decidido a utilização do método de eletroporação. Todavia, não se obteve sucesso nas duas tentativas realizadas. Contudo, foi observado um maior número de colônias no meio seletivo utilizando este método (20 a 35 colônias) comparado ao choque térmico. Porém, quando as colônias eram cultivadas em placas replicas contendo meio YNBG e YNBGU foi observado o crescimento das mesmas nas duas placas, o que indicava a ausência de mutantes *URA3Δ*.

Não se descarta a influência do método de transformação sobre a eficiência da obtenção de mutantes *URA3* utilizando os dois métodos de transformação citados acima, porém isso pode ter ocorrido principalmente pela baixa eficiência de recombinação homóloga em *K. marxianus*. Essa ineficiência em *K. marxianus* foi discutida por RIBEIRO et. al., (2007). Onde foi alcançada uma eficiência de interrupção de 34% do gene *LAC4* por recombinação homóloga utilizando um sistema *Cre-loxP* contendo 723 e 713 pares bases flaqueando o gene da marca de seleção. Essa eficiência é menor que a relatada em *K. lactis* (88%), utilizando 600 pares de bases homólogas (KOOISTRA et. al., 2004). Em nosso trabalho, utilizamos o fragmento *URA3Δ* que possui 735 e 570 pares de bases homólogas, inferior ao número de bases homólogas usadas por RIBEIRO et. al., (2007), o que pode reduzir a eficiência da recombinação. Além disso, não existe informação disponível sobre ploidia em *K. marxianus*. Estudos levantaram a possibilidade de que esta espécie seja diplóide (RIBEIRO et. al., 2007). Já outro estudo realizado por Lane et. al. (2011) mostrou que a *K. marxianus* pode existir como células estáveis na forma haplóide ou diplóide. De fato, isso dificulta a

deleção do gene *URA3*. Por outro lado, a deleção do gene *URA3* da *K. marxianus*, utilizando as mesmas técnicas utilizadas neste trabalho, foi realizada com sucesso por PECOTA et. al., (2007), porém, a linhagem utilizada naquele caso (KM1) é diferente da linhagem utilizada neste estudo, o que pode justificar a diferença na eficiência do método.

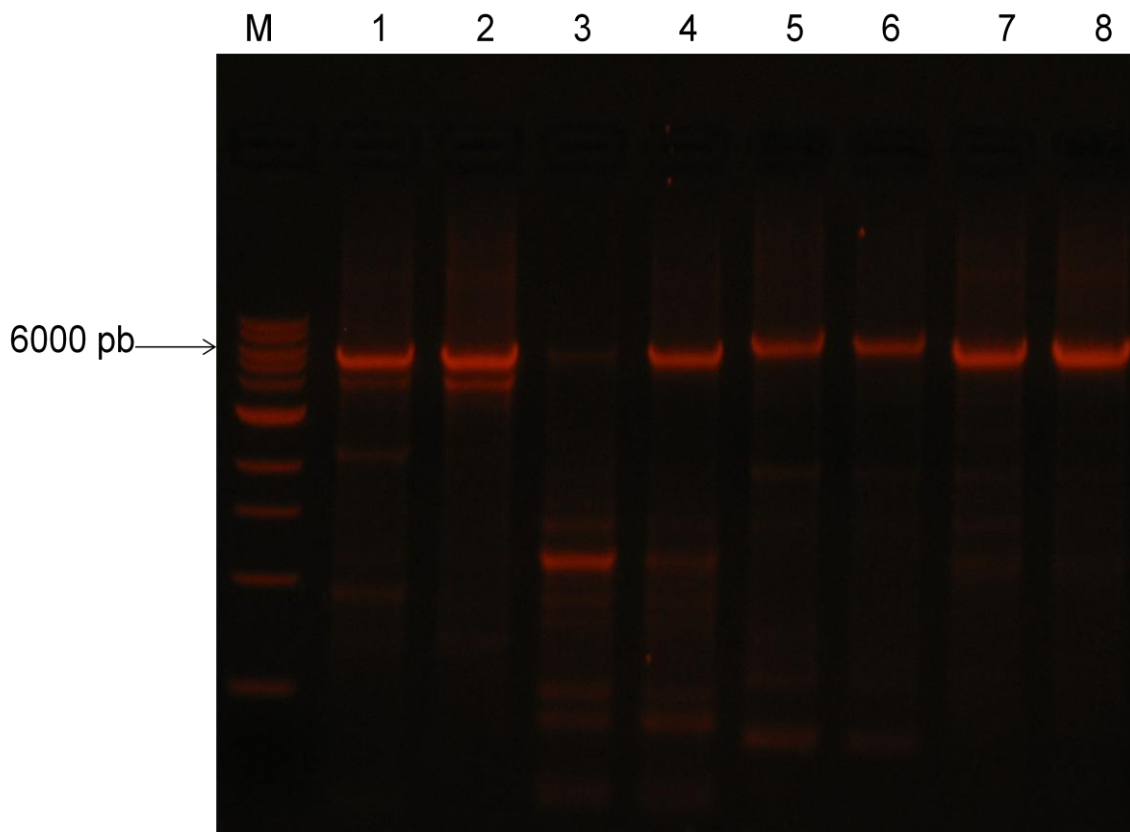
Assim, foi decidido utilizar uma outra linhagem de *K. marxianus*, mutante *URA3Δ*, nas transformações com os cassetes *FLO*. A linhagem utilizada a partir de então foi a CBS 6556 com marca auxotrófica para uracila.

### 5.3 Amplificação dos cassetes contendo diferentes genes de floculação

A amplificação do cassete *URA3-TDH3p-FLO* foi realizada a partir do DNA genômico extraído das diferentes linhagens floculantes da levedura *S. cerevisiae* (Tabela 1), contendo os diferentes genes de floculação. Os cassetes apresentavam tamanhos variados de acordo com o gene de floculação presente no mesmo, Seus tamanhos eram de aproximadamente: 6614 pb para o cassete *URA3-TDH3p-FLO1*; 5228 pb para o cassete *URA3-TDH3p-FLO5*; 5969 pb para o cassete *URA3-TDH3p-FLO9* e 5410 pb para o cassete *URA3-TDH3p-FLO10*. A enzima *Platinum®TaqDNA polymerase high fidelity* foi utilizada inicialmente para amplificar os cassetes *FLO*, porém o produto do PCR apresentou um padrão de bandas inespecíficas, de aproximadamente 1Kb, e ausência da banda correspondente ao fragmento de interesse. Foram feitas algumas modificações nos parâmetros da reação de cadeia da DNA polimerase a fim de otimizar a amplificação do fragmento de interesse, mas ainda assim não se obteve o fragmento de interesse, apesar da enzima *Platinum®TaqDNA polymerase high fidelity* ser recomendada para amplificação de fragmentos acima de 12 Kb.

Diante disso adquirimos a enzima *KOD plus DNA polymerase* (Toyobo, Osaka, Japan), utilizada por NONKLANG et. al., (2009) para amplificação destes cassetes. Com a utilização dessa enzima, todos os cassetes foram amplificados apresentando o tamanho esperado (Figura 4).





**Figura 4**—Fracionamento do produto das reações de PCR em gel de agarose 1,0% p/v. M - padrão de tamanho molecular 1Kb DNA *Ladder* (Fermentas). **1 e 2** – Produto da amplificação do cassete URA3-TDH3p-FLO1 (6614 pb). **3 e 4** – Produto da amplificação do cassete URA3-TDH3p-FLO5 (5228 pb). **5 e 6** – produto da amplificação do cassete URA3-TDH3p-FLO9 (5969 pb). **7 e 8** - produto da amplificação do cassete URA3-TDH3p-FLO10 (5410).

#### 5.4 Transformação da *K. marxianus* auxotrófica com os cassetes contendo genes de floculação e seleção dos transformantes.

Como discutido anteriormente não foi possível obter uma linhagem de *K. marxianus* UFV-3 auxotrófica para uracila. Por esse motivo decidimos utilizar a linhagem *K. marxianus* CBS 6556 auxotrófica para uracila, ou seja, incapaz de crescer em meio sem uracila. Esta linhagem foi transformada por eletroporação (como descrito no item 4.7). Cada um dos quatro cassetes amplificados do DNA genômico de *S. cerevisiae* floculantes, possuíam o gene *URA3* cujo produto confere a capacidade de síntese de uracila em leveduras com deficiência nessa

via de síntese. Esses cassetes foram utilizados separadamente como insertos na transformação.

As células transformantes foram semeadas em meio YNBG sem uracila e no controle as células da linhagem *K. marxianus* CBS 6556 *URA3Δ* que passaram pelo processo de transformação por eletroporação sem a presença de um inserto foram plaqueadas no mesmo meio. Foram observadas colônias em todas as 4 placas contendo YNBG (glicose 2% p/v) sem uracila, sendo observado apenas um crescimento residual na placa controle. Esse resultado indica que o cassete foi integrado ao DNA da *K. marxianus* CBS 6556 *ura3*. As linhagens transformantes foram denominadas como *K. marxianus* CBSFLO1, CBSFLO2, CBSFLO3 e CBSFLO10 de acordo com o gene de floculação presente no cassete utilizado para transformação das mesmas. O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de cada transformação está indicado na tabela 3.

**Tabela 3: Linhagens transformantes e seus números de unidade formadora de colônias/mL (UFC/mL)**

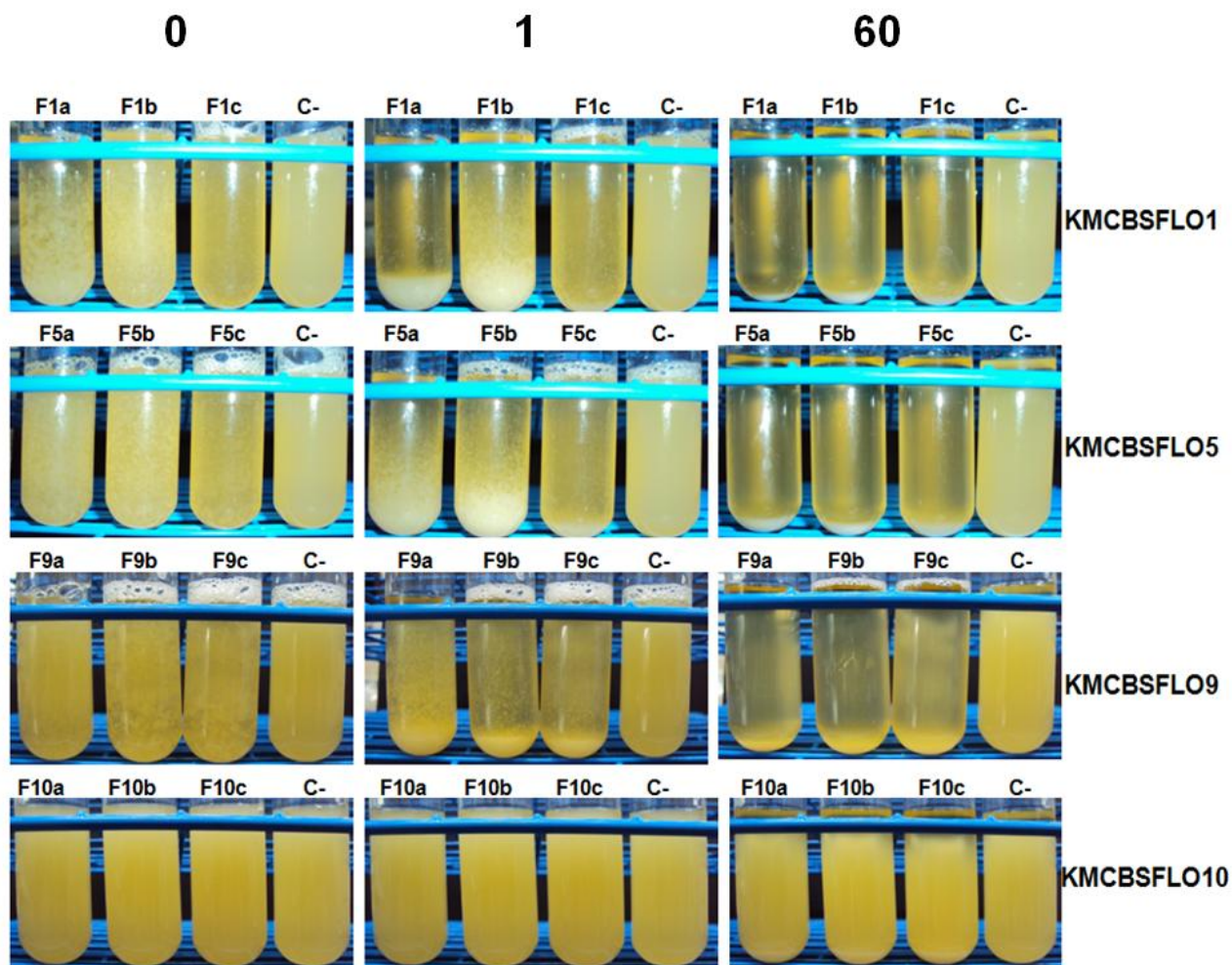
| Linhagem Transformantes | Cassete utilizada na Transformação | UFC/mL            |
|-------------------------|------------------------------------|-------------------|
| KMCBSFLO1               | URA3-TDH3p-FLO1                    | $1,3 \times 10^2$ |
| KMCBSFLO5               | URA3-TDH3p-FLO5                    | $1,2 \times 10^2$ |
| KMCBSFLO9               | URA3-TDH3p-FLO9                    | $1,0 \times 10^2$ |
| KMCBSFLO10              | URA3-TDH3p-FLO10                   | $1,7 \times 10^2$ |

Todas as colônias das linhagens transformantes foram repicadas para novas placas contendo YNBG (glicose 2% p/v) sem uracila. Posteriormente seis colônias e a linhagem *K. marxianus* CBS 6556 *URA3Δ* foram repicadas em placas contendo meio YNBL (lactose 2% p/v) sem uracila. Foi observado o crescimento das transformantes nesse meio, enquanto a *K. marxianus* CBS 6556 *URA3Δ* não apresentou crescimento, confirmando a reversão da mutação auxotrófica.

## 5.5 Análise Fenotípica das linhagens transformantes

Para análise fenotípica, dentre as seis colônias transformadas de cada linhagem cultivada em meio YNBL (lactose 2% p/v) foram escolhidas três para análise fenotípica. As colônias foram inoculadas em 10ml de meio YPD (glicose 2% p/v) e cultivadas à 37 °C por 16 horas sob agitação de 180 rpm. Todas as colônias transformadas apresentaram fenótipo de floculação durante o cultivo, indicando que os genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* e *FLO10* provenientes da *S. cerevisiae* e também o promotor *TDH3* se encontravam funcionais na *K. marxianus* CBS 6556. Após 16 horas de incubação os meios de cultivo contendo as diferentes linhagens transformadas, apresentavam sedimentação celular evidente no fundo do tubo, o que não foi observado no controle contendo a linhagem *K. marxianus* CBS 6556 não transformada. Os tubos contendo as 3 colônias de cada linhagem transformante e um tubo controle, contendo a linhagem *K. marxianus* CBS 6556, foram então agitados vigorosamente por 1 minuto em vortex e deixados em repouso a fim de permitir a sedimentação das células. A sedimentação celular foi observada (Figura 5).

As linhagens floculantes KMCBSFLO1, KMCBSFLO5 e KMCBSFLO9 apresentaram forte sedimentação logo após serem vigorosamente agitadas. Contudo, a linhagem KMCBSFLO10 apresentou sedimentação parcial apenas depois de uma hora em repouso, sendo que o meio de cultura continuou turvo, sugerindo que o gene *FLO10* confere uma fraca propriedade de floculação em *K. marxianus*.

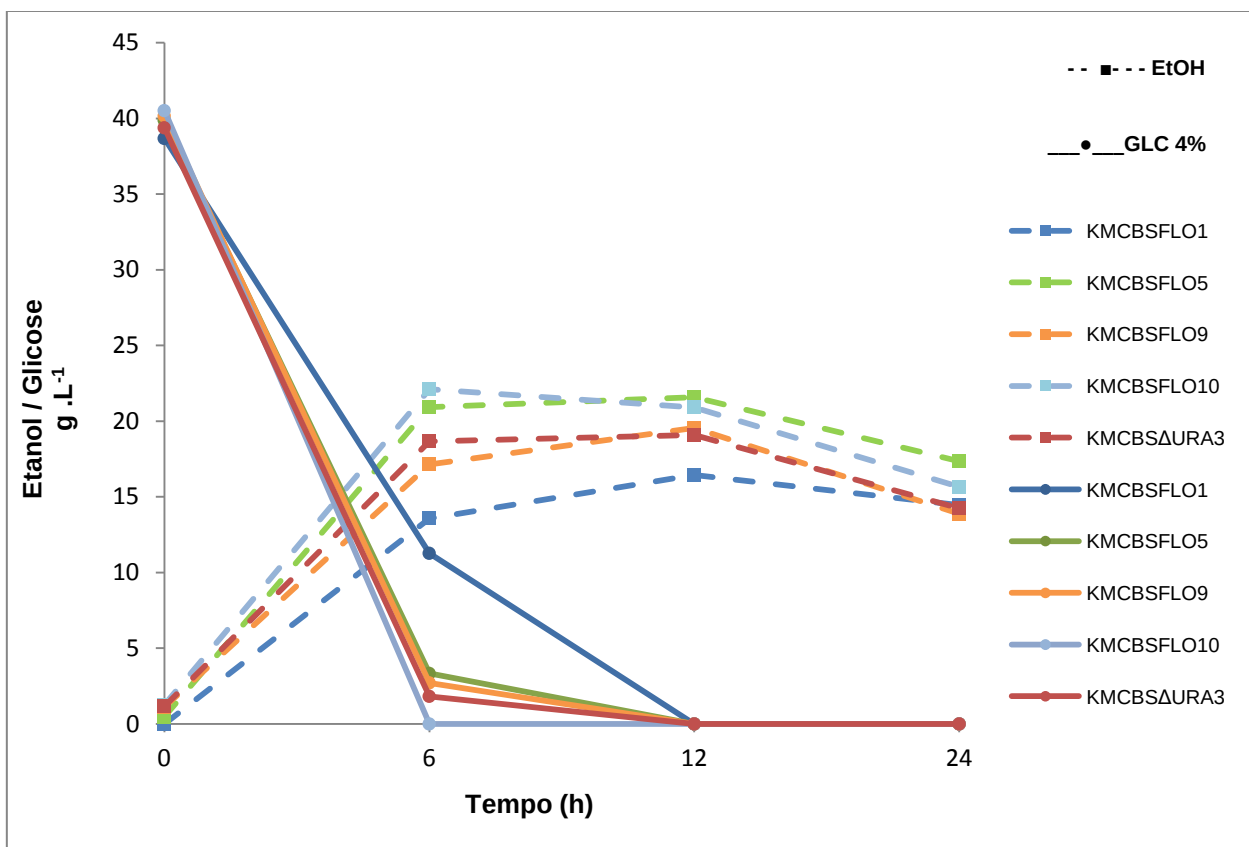


**Figura 5: Teste de floculação das diferentes linhagens transformantes.** As três colônias das linhagens transformantes KMCBSFLO1(F1a, F1b e F1c), KMCBSFLO5 (F5a F5b e F5c), KMCBSFLO9 (F9a F9b e F9c), KMCBSFLO10 (F10a, F10b e F10c) foram cultivadas juntamente com o controle KMCBSURA3Δ (C-), agitadas vigorosamente por 5 minutos e deixadas em repouso. A sedimentação celular foi então observada nos tempo 0, 1 e 60 minutos.

## 5.6 Avaliação do potencial fermentativo das linhagens de *K. marxianus* floculantes

Dentre as três colônias floculantes de *K. marxianus*, analisadas anteriormente, a que apresentou maior grau de floculação foi escolhida para análise do potencial fermentativo. Estas colônias foram cultivadas, em duplicata, nos meios de cultura YPD (glicose 4% p/v), YPL (lactose 5% p/v) e YPDL (glicose 4% p/v e lactose 5% p/v) a 37 °C sob agitação de 100 rpm. Vale ressaltar que durante a condução do experimento foi observado que a linhagem KMCBSFLO5 floculou menos do que observado em outros experimentos, indicando a instabilidade deste transformante ou sensibilidade térmica da floculina expressa pelo gene *FLO5*. As demais linhagens floculantes apresentaram fenótipo de floculação, com acentuada formação de flocos no final de 24 horas de cultivo nas condições descritas acima.

A figura 6A e a tabela 4 representam o perfil fermentativo das linhagens floculantes e não floculante, quando estas foram cultivadas em meio YPD (glicose 4% p/v) no período de 24 horas, sendo possível observar que depois de 12 horas a glicose foi totalmente consumida. As linhagens KMCBSFLO5, KMCBSFLO9 e KMCBSFLO10 apresentaram similaridade no consumo de glicose e produção de etanol, sendo que em um período de 12 horas a linhagem KMCBSFLO5 apresentou os maiores valores dos parâmetros fermentativos (Tabela 4), alcançando uma produção de etanol de 21,09 g.L<sup>-1</sup>, rendimento de produção de etanol por a glicose de 0,54 e produtividade volumétrica de etanol de 1,75 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Outra linhagem que se destacou foi a KMCBSFLO10 com produção de 19,61 g.L<sup>-1</sup> de etanol, o rendimento de produção de etanol foi de 0,50 e a produtividade volumétrica foi de 1,63 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Já a linhagem KMCBSFLO9 produziu 19,29 g.L<sup>-1</sup> de etanol, o rendimento de produção de etanol foi de 0,49 e a produtividade volumétrica foi de 1,60 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.



**Figura 6: Perfil fermentativo das linhagens de *K. marxianus* floculantes e não floculante.**  
**A-**Consumo de glicose e produção de etanol das linhagens floculantes KMCBSFLO1, KMCBSFLO5, KMCBSFLO9 e KMCBSFLO10 e da linhagem não floculante KMCBSΔURA3 cultivadas em meio contendo glicose como fonte de carbono e energia .

Já a linhagem KMCBSFLO1 apresentou um consumo mais lento de glicose e uma menor produção de etanol comparado às outras linhagens floculantes e com a linhagem não floculante (Figura 6). Além disso, a produção de etanol, o rendimento de etanol por glicose e a produtividade volumétrica também foram menores comparadas às outras linhagens (Tabela 4). Esses resultados parecem estar associados à forte sedimentação das células , a qual floculou mais do que as outras linhagens floculantes. Esta forte capacidade de floculação da KMCBSFLO1 poderia ter influência na sua captação de glicose e consequentemente na produção de etanol.

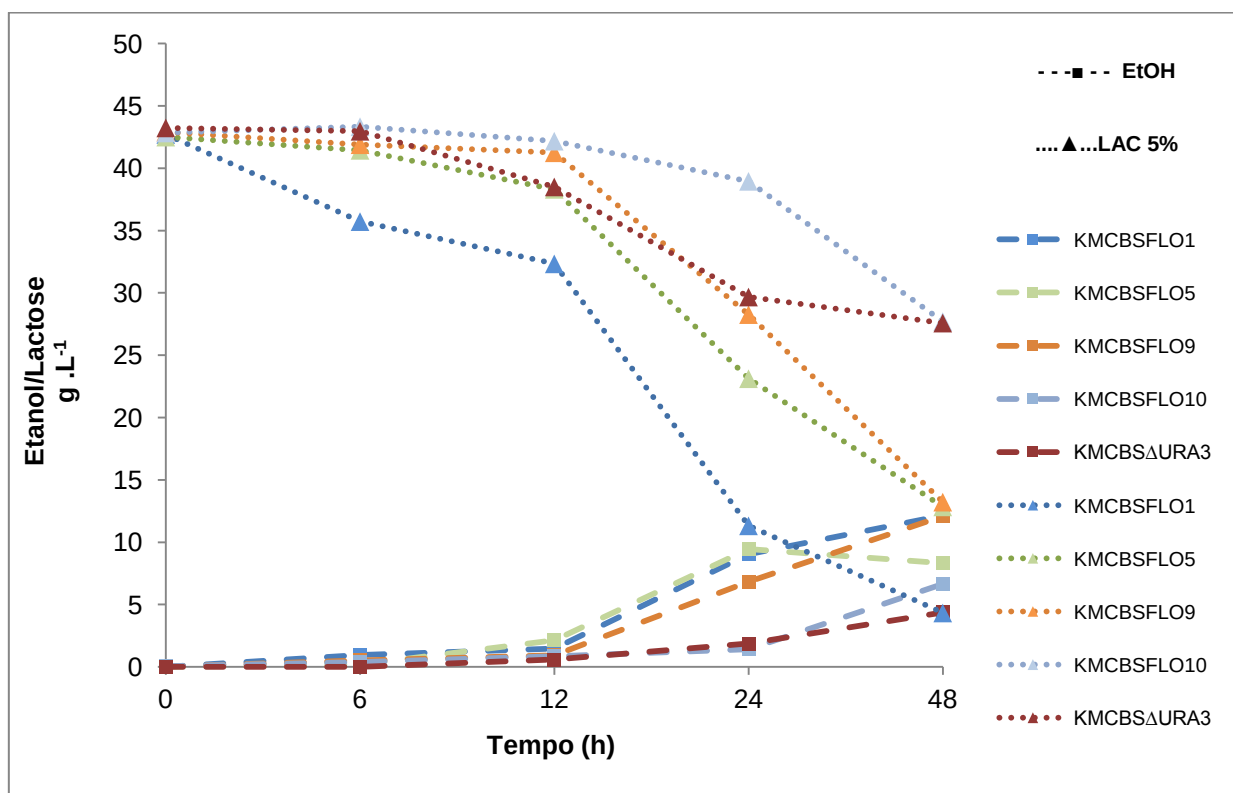
**Tabela 4:** Produção final de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ), rendimento de produção de etanol em relação a glicose ( $Y_{p/s} = \text{g.L}^{-1}$  de etanol /  $\text{g.L}^{-1}$  de glicose) e produtividade volumétrica ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) das linhagens de *K. marxianus* floculantes e a linhagem controle não floculante após 12 horas de fermentação.

| Linhagem de levedura | Glicose Inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Glicose final ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Etanol Inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Etanol final ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | $Y_{p/s}$         | $P_{\text{etanol}}$ ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) |
|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------|
| KMCBSFLO1            | 39,27                                 | 0                                   | 0                                    | 16,40 <sup>A</sup>                 | 0,42 <sup>A</sup> | 1,36 <sup>A</sup>                                       |
| KMCBSFLO5            | 39,27                                 | 0                                   | 0,46                                 | 21,55 <sup>B</sup>                 | 0,54 <sup>B</sup> | 1,75 <sup>B</sup>                                       |
| KMCBSFLO9            | 39,27                                 | 0                                   | 1,01                                 | 20,30 <sup>C</sup>                 | 0,49 <sup>C</sup> | 1,60 <sup>C</sup>                                       |
| KMCBSFLO10           | 39,27                                 | 0                                   | 1,24                                 | 20,85 <sup>D</sup>                 | 0,50 <sup>C</sup> | 1,63 <sup>D</sup>                                       |
| KMCBS $\Delta$ URA3  | 39,27                                 | 0                                   | 1,15                                 | 19,00 <sup>E</sup>                 | 0,45 <sup>D</sup> | 1,48 <sup>E</sup>                                       |

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ( $\alpha=0,05$ ) pelo teste de Tukey.

O consumo de lactose e a produção de etanol das linhagens floculantes e não floculante, quando cultivadas em meio YPL (lactose 5% p/v) no período de 48 horas, podem ser observados na Figura 7. Como o consumo de lactose no período de 12 horas foi baixo em todas as linhagens, a produção de etanol também foi baixa nesse período. Contudo, após 12 horas de crescimento, observou-se um aumento no consumo de lactose para as linhagens KMCBSFLO1, KMCBSFLO5 e KMCBSFLO9. Para as linhagens KMCBSFLO10 e KMCBS $\Delta$ URA3 não floculante o consumo de lactose aumentou somente depois de 24 horas de cultivo. Foi também observado um pequeno aumento na produção de etanol, em todas as linhagens, que não foi tão acentuado como o aumento de consumo de lactose, sugerindo que parte deste substrato esteja sendo utilizado no metabolismo respiratório da levedura a fim de obter energia para o seu crescimento.

Na Tabela 5 observa-se que as cepas KMCBSFLO1, KMCBSFLO5 e KMCBSFLO9 apresentaram maior consumo de lactose, assim como maiores valores de produção e produtividade volumétrica de etanol, enquanto que as linhagens KMCBSFLO10 e a não floculante KMCBS $\Delta$ URA3 apresentaram menor consumo de lactose e os menores valores de produção e produtividade volumétrica de etanol no período de 24 horas. A diferença entre as três cepas floculantes KMCBSFLO1, KMCBSFLO5 e KMCBSFLO9 e as duas cepas KMCBSFLO10 e KMCBS $\Delta$ URA3 não floculante na produção, rendimento e produtividade de etanol foram significativas, mostrando que, com exceção da linhagem KMCBSFLO10, as cepas floculantes tiveram um melhor desempenho na produção de etanol a partir de lactose.



**Figura 7: Perfil fermentativo das linhagens de *K. marxianus* floculantes e não floculante.**  
**A-** Consumo de lactose e produção de etanol das linhagens floculantes KMCBSFLO1, KMCBSFLO5, KMCBSFLO9 e KMCBSFLO10 e da linhagem não floculante KMCBS $\Delta$ URA3 cultivadas em meio contendo lactose como fonte de carbono.

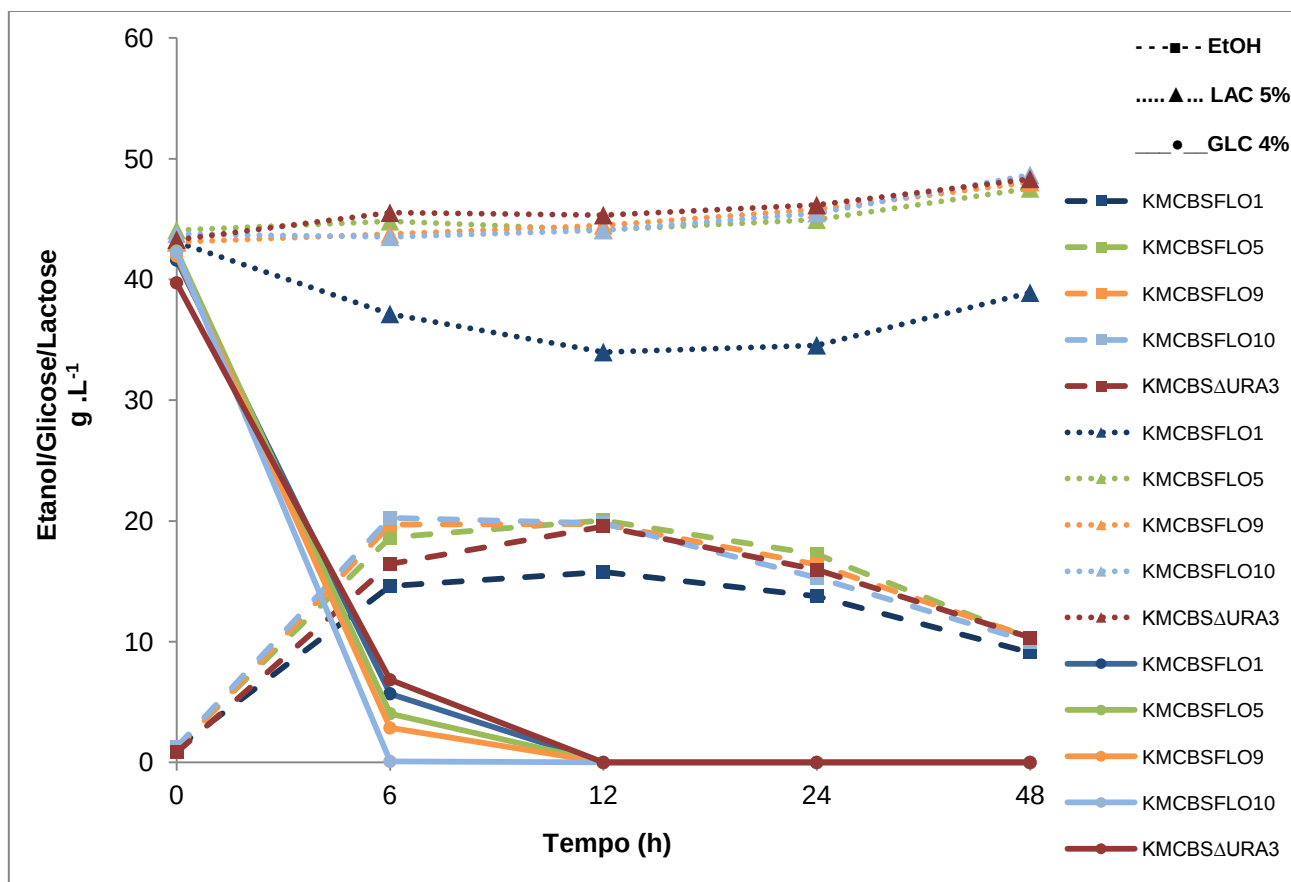


**Tabela 5:** Produção final de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ), rendimento de produção de etanol em relação a lactose ( $Y_{p/s} = \text{g.L}^{-1}$  de etanol /  $\text{g.L}^{-1}$  de lactose) e produtividade volumétrica ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) das linhagens de *K. marxianus* floculantes e a linhagem controle não floculante em um após 48 horas de fermentação.

| Linhagem de levedura | Lactose inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Lactose final ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Consumo de Lactose (%) | Etanol inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Etanol final ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | $Y_{p/s}$         | $P_{\text{etanol}}$ ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) (24 horas) |
|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------|
| KMCBSFLO1            | 42,00                                 | 11,28                               | 73,14                  | 0                                    | 9,01 <sup>A</sup>                  | 0,29 <sup>A</sup> | 0,37 <sup>A</sup>                                                  |
| KMCBSFLO5            | 42,00                                 | 22,91                               | 45,45                  | 0                                    | 9,40 <sup>B</sup>                  | 0,49 <sup>B</sup> | 0,39 <sup>A</sup>                                                  |
| KMCBSFLO9            | 42,00                                 | 28,04                               | 33,34                  | 0,14                                 | 6,80 <sup>C</sup>                  | 0,48 <sup>B</sup> | 0,28 <sup>B</sup>                                                  |
| KMCBSFLO10           | 42,00                                 | 38,64                               | 8                      | 0,49                                 | 1,40 <sup>D</sup>                  | 0,41 <sup>C</sup> | 0,06 <sup>C</sup>                                                  |
| KMCBS $\Delta$ URA3  | 42,00                                 | 29,41                               | 30                     | 0                                    | 1,80 <sup>E</sup>                  | 0,14 <sup>D</sup> | 0,07 <sup>C</sup>                                                  |

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ( $\alpha=0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Na Figura 8 observa-se que as linhagens floculantes e não floculante cultivadas em meio YPDL (glicose 4% e lactose 5%), consumiram a glicose após 12 horas. Além disso, verificou-se que a concentração de etanol máxima foi atingida no período de 12 horas, demonstrando que o perfil das linhagens para fermentação de glicose, seguiu padrão parecido ao observado quando as mesmas foram cultivadas somente em glicose como única fonte de carbono e energia. O mesmo não aconteceu em relação ao consumo de lactose, visto que as linhagens não consumiram este dissacarídeo, exceto a linhagem KMCBSFLO1 que foi a única linhagem a consumir aproximadamente 20% de lactose no período de 24 horas.



**Figura 8:** Perfil fermentativo das linhagens de *K. marxianus* floculantes e não floculante em meio contendo glicose e lactose como fonte de carbono e energia. Consumo de glicose/lactose e produção de etanol das linhagens floculantes KMCBSFLO1, KMCBSFLO5, KMCBSFLO9 e KMCBSFLO10 assim como da linhagem não floculante KMCBSΔURA3 cultivadas em meio contendo glicose/lactose como fonte substrato.

Os valores de produção de etanol das linhagens floculantes KMCBSFLO1, KMCBSFLO5, KMCBSFLO9, KMCBSFLO10 e KMCBSΔURA3 não floculante cultivadas em glicose e lactose, foram de 14,48 g.L<sup>-1</sup>, 18,76 g.L<sup>-1</sup>, 18,72 g.L<sup>-1</sup>, 18,53 g.L<sup>-1</sup> e 18,67 g.L<sup>-1</sup> respectivamente. Estes valores foram similares para todas as linhagens, incluindo a linhagem não floculante, com exceção da linhagem KMCBSFLO1 que, apesar de ser a única linhagem que consumiu lactose, apresentou a menor produção de etanol no período de 24 horas.

Levando-se em consideração a produção de etanol a partir de glicose das linhagens transformantes analisadas, a linhagem que apresentou a maior produção e rendimento de etanol foi a KMCBSFLO5, seguida das linhagens KMCBSFLO10 e KMCBSFLO9, respectivamente. Como discutido anteriormente a linhagem KMCBSFLO5 parece perder sua capacidade de flocular quando cultivadas à 37 °C, enquanto a linhagem KMCBSFLO10 apresenta uma fraca capacidade de floculação (Figura 5). Assim a linhagem que apresenta melhor desempenho, mantendo sua capacidade de floculação é a KMCBSFLO9. Quando a lactose é utilizada como fonte de carbono e energia as linhagens que apresentaram os melhores resultados de produção de etanol mantendo o fenótipo de floculação foram a KMCBSFLO1 e KMCBSFLO9 sendo que a linhagem KMCBSFLO1 apresenta maior produtividade volumétrica e a linhagem KMCBSFLO9 apresenta maior rendimento (Tabela 5). Como nosso objetivo foi a obtenção de uma linhagem de levedura floculante com potencial para de fermentar resíduos agroindustriais como soro de leite e bagaço de cana-de-açúcar, a candidata mais promissora seria a linhagem KMCBSFLO9.

## **5.7 Avaliação da viabilidade celular quanto a concentração de etanol**

O etanol acumulado no meio de cultura é um fator de estresse significativo durante a fermentação (Stanley et al., 2010), inibindo o crescimento de leveduras em concentrações relativamente baixas, enquanto que em altas concentrações reduz a viabilidade celular (Birch e Walker, 2000). Experimentos realizados por Hu et. al (2005) sugeriram que populações microbianas com diferentes morfologias de agregação podem apresentar respostas distintas ao etanol.

A fim de verificar se o fenótipo de floculação influenciaria positivamente na viabilidade celular, a linhagem KMCBSFLO9 que apresentou melhor produção de etanol sem perder sua capacidade de floculação, a linhagem KMCBSFLO10 que apresentou o fenótipo de floculação mais fraco e a linhagem não floculante foram cultivadas em diferentes concentrações de etanol. A tabela 6 mostra a velocidade específica de crescimento e o número de unidades formadoras de colônias destas

linhagens depois de 12 horas de crescimento. Foi observado que quando as leveduras foram cultivadas em meio com ausência de etanol a linhagem floculante KMCBSFLO10 apresentou velocidade específica de crescimento de 0,901, valor bem superior ao da linhagem KMCBSFLO9 e ao da não floculante KMCBS $\Delta$ URA3 que apresentaram valores similares. Vale salientar que as células cultivadas em meio YPD (glicose 4% p/v), sem o acréscimo de etanol, ao final de 6 horas de cultivo consomem totalmente a glicose presente no meio (Figura 6) e neste ponto apresentam concentrações consideráveis de etanol no meio causando estresse alcoólico nas células. Quando cultivadas em meio contendo etanol 2% a linhagem KMCBSFLO10 também apresentou uma velocidade específica de crescimento superior ao das outras duas linhagens, sendo que a KMCBSFLO9 apresentou a menor velocidade específica de crescimento. Os valores de velocidade específica de crescimento das células cultivadas na presença de etanol 4% (v/v) foram pequenos. Na presença de etanol 8% (v/v), as linhagens não cresceram.

Quanto a viabilidade celular, todas as células apresentaram uma boa resistência ao etanol, com elevado número de células viáveis quando crescidas em até 8 % de etanol. As duas linhagens floculantes apresentaram número de unidades formadoras de colônias similares e maiores do que a linhagem não floculante. Contudo não é possível dizer que as linhagens floculantes apresentam uma maior tolerância ao etanol, pois a diferença entre as unidades formadoras de colônias das linhagens não floculante e floculantes não é suficientemente grande.

**Tabela 6:** Velocidade específica de crescimento  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) e Unidades Formadoras de Colônia UFC/mL das linhagens KMCBS $\Delta$ URA3, KMCBSFLO9 e KMCBSFLO10 quando cultivadas em diferentes concentrações de etanol por 12 horas.

| EtOH % | KMCBS $\Delta$ URA3 |                   | KMCBSFLO9          |                   | KMCBSFLO10         |                   |
|--------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|        | $\mu$ ( $h^{-1}$ )  | UFC/mL            | $\mu$ ( $h^{-1}$ ) | UFC/mL            | $\mu$ ( $h^{-1}$ ) | UFC/mL            |
| 0 %    | 0,566               | $2,5 \times 10^6$ | 0,518              | $4,0 \times 10^6$ | 0,901              | $4,3 \times 10^6$ |
| 2 %    | 0,426               | $2,2 \times 10^6$ | 0,376              | $2,5 \times 10^6$ | 0,471              | $2,6 \times 10^6$ |
| 4 %    | 0,025               | $7,0 \times 10^5$ | 0,049              | $1,9 \times 10^6$ | 0,067              | $1,8 \times 10^6$ |
| 8 %    | NC*                 | $1,5 \times 10^5$ | NC*                | $3,0 \times 10^5$ | NC*                | $3,0 \times 10^5$ |

\*Não houve crescimento.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho utilizamos a linhagem de CBS 6556, auxotrófica para uracila, na construção de linhagens floculantes de *K. marxianus*, pois a tentativa de deleção do gene *URA3* da *K. marxianus* UFV-3 não foi possível.

Foram construídas quatro linhagens floculantes de *K. marxinaus*, através da transformação da linhagem auxotrófica CBS 6556 com genes de floculação (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9* E *FLO10*).

A linhagem mais promissora para testes de fermentação com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi a linhagem transformada com o gene *FLO9*, denominada KMCBSFLO9, pois apresentou o melhor desempenho fermentativo de glicose, mantendo sua capacidade de floculação.

Para testes de fermentação com soro de leite as linhagens floculantes mais recomendadas seriam a KMCBSFLO9 e a KMCBSFLO1, pois apresentaram o melhor desempenho fermentativo de lactose mantendo a sua capacidade de floculação.

As linhagens floculantes KMCBSFLO9, KMCBSFLO10 e a linhagem não floculante de KMCBS $\Delta$ URA3, apresentaram boa viabilidade quando submetidas à estresse alcoólico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. <[www.abiq.com.br](http://www.abiq.com.br)> Acesso em 14 de agosto de 2013.

AMORIM, H. V. 2005. Fermentação Alcoólica – **Fermentec Ciência e Tecnologia**. 448p., Piracicaba-SP.

ANFAVEA – Associação Nacional Dos Fabricantes de Veículos Automotores – <[www.anfavea.com.br](http://www.anfavea.com.br)> Acesso em 06 de junho de 2013.

CASTRO, A. M. 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**; 33: 181-188.

DINIZ, R.H.S.; SILVEIRA, W.B.; Fietto, L.F.G; PASSOS, F.J.V 2012. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, 101:541–550.

DOMINGUES L., LIMA N., TEIXEIRA J.A. 2000a. Contamination of a High-cell-density continuous Bioreactor. **Biotechnol Bioeng** 68:584–587

DOMINGUES L., VICENTE A.A., LIMA N., TEIXEIRA J.A. 2000b. Applications of yeast flocculation in biotechnological processes. **Biotechnol Bioprocess Eng** 5:288–305

FIL/IDF - Bulletin of the International Dairy Federation. The World Dairy Situation. <<http://www.fil-idf.org/Public/ColumnsPage.php?ID=23077>> Acesso em 14 de agosto de 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007. <<http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>> Acesso em 06 de junho de 2013.

ERNST & YOUNG TERCO. 2011 Brasil Sustentável - Perspectivas dos mercados e petróleo, etanol e gás – 85 p. <[www.ey.com.br](http://www.ey.com.br)> Data de acesso: 06/06/2013

GHALY, A. E.; BEN-HASSAN, R. M. 1995. Kinetics of batch production of single-cell protein from cheese whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.50, n.1, p 79-92.

GHALY, A. E.; KAMAL, M.; AVERY, A. 2003. Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese

whey under ambient conditions. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.741-749.

GONZALEZ-SISO, M. I. 1996a. The Biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, p.1-11.

GONZALEZ-SISO, M. I.; RAMIL, E.; CERDAN, M. E.; FREIRE-PICOS, M. A. 1996b. Respiro-fermentative metabolism in *Kluveromyceslactis*: Ethanol production an Crabtree effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.585-591.

HAHN-HARGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN.G.; ZACCHI, G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology**. 24.

HASHIMOTO S., OGURA M., ARITOMI K., HOSHIDA H., NISHIZAWA Y., AKADA R., 2005. Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis. **Society** 71(1), 312-319.

HERKER E., JUNGWRITH H., LEHMANN KA., MALDENER C., FROEHLICH K., WISSING S., BUETTNER S., FEHR M., SIGRIST S ., MADEO F. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. **J Cell Biol** 164:501–507

HU C.K., BAI F.W., AN L.J. 2005. Effect of the flocculating of a self-flocculating yeast on its ethanol tolerance and corresponding mechanisms. **Chin J Biotechnol**;21:123–8.

JAMES A. P., and KILBEY B. J., 1977. The timing of UV mutagenesis in yeast: a pedigree analysis of induced recessive mutation. **Genetics** 87, 237-248.

JEFFRIES, T. W.; CREGG, J. M. 2010. Protein Expression in Nonconventional Yeast. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 64.

KOBAYASHI O., HAYASHI N., KUROKI R., SONE H. 1998. Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. **J Bacteriol**;180:6503–10.

KOOISTA R., HOOYKAAS P. J., 2004. Efficient gene targeting in *Kluveromyceslactis*. **Yeast**, v.21, n.9, p.781-792.

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

LIU N., WANG D., WANG Z.Y., HE X.P., ZHANG B. 2007. Genetic basis of flocculation phenotype conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res** ;7:1362–70.

MA K., WAKISAKA M., SAKAI K., SHIRAI Y 2009. Flocculation characteristics of an isolated mutant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain and its application for fuel ethanol production from kitchen refuse. **Bioresource Technology**;100:2289–92

MAKI-ARVELA, P.; ANUGWOMA, I.; VIRTANEMA, P.; SJOHOLMA, R.; MIKKOLA, J. P. 2010. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituent liquids – **A review.Industrial Crops and Products**. 32: 175-201.

MAWSON, A.J. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement.**Bioresource Technology**, v.47 p. 195-203.

MDIC – MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR– 2010. <[www.mdic.gov.br](http://www.mdic.gov.br)>. Data de acesso: 06/06/2/13

LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R.; WOLFE, K.H.; O'BYRNE, C. P.; MORRISSEY, J. P. 2001. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, 100:507-519.

MME e EPE BRASIL. 2011. Ministério de Minas e Energia e Empresa de Pesquisa Energética. Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, nº 17, jan.

MUSSATO, S.I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M.R., SILVA, J. P.A., CARNEIRO, I. C., VICENTE, A., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J.A. 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production.**Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817-830.

NONKLANG, S., ANO A., ABDEL-BANAT, B. M. A., SAITO, Y., HOSHIDA, H., AKADA, R. 2009. Constrution of Flocculent *Kluyveromyces marxianus* Strains Suitable for High-Temperature Ethanol Fermentation.**Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 73 (5), 1090-1095.

NONKLANG, S., ABDEL-BANAT, B.M.A., CHA-AIM, K., MOONJAI, N., HOSHIDA, H., LIMTONG, S., YAMADA, M., AKADA, R. 2008.High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromycesmarxianus* DMKU3-1042, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74 p. 7514-7521.

PECOTA D. C., RAJGARHIA V., 2007. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromycesmarxianus*.**J. Biotechnol**, v. 127, n.3, Jan 10, p. 408-416.



RIBEIRO O., GOMENT A. K., 2007. Application of the Cre-loxP system for multiple gene disruption in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **J. Biotechnol**, v. 131, n.1, p. 20-26.

RUSSEL, I. 1986. Will a recombinant DNA yeast be able to solve whey disposal problems? **Trends Biotechnology**, v. 4, p. 107-108.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3. ed. Cold. spring harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, s.n.p, 2001.

SANTOS, A. F., 2012. Construção de cassetes de expressão lineares e transformação de *Kluyveromyces marxianus* para produção heteróloga de proteínas. **Dissertação de mestrado (Bioquímica Agrícola)** – Universidade Federal de Viçosa 68p.

SANTOS, V. C., 2011. Engenharia evolutiva da levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 para fermentação de xilose. **Tese de Doutorado (Microbiologia Agrícola)**- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 115p.

SIEIRO C., REBOREDO N.M., VILLA T.G. 1995. Flocculation of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Ind Microbiol**;14:461–6.

SILVEIRA, W.B.; PASSOS, F.J.V.; MANTOVANI, H.C.; PASSOS, F.M.L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.930-936, 2005.

SMUKALLA S., CALDARA M., POCHET N., BEAUVAIS A., GUADAGNINI S., YAN C., 2008. FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. **Cell** ;135:726–37.

SOUZA, C. J. A; COSTA, A. D.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; SANTOS A. F.; LOPES M. R.; ABRANTES, A. B. P.; COSTA, P. S.; SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. M. L.; FIETTO, L. G. 2012. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugar cane bagasse. **Bioresource and Biotechnology**; 109 63–69.

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

STRATFORD M, ASSINDER S. 1991a. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. **Yeast** 7:559–74.

STRATFORD M. 1989b. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 5:S441–S445.

TEIXEIRA J.A., MOTA M., GOMA G.1990. Continuous ethanol production by a flocculating strain of *Kluyveromyces marxianus*: bioreactor performance. **Bioprocess Eng** 5:123–127.

VASCONCELOS, J. N. 2006. **Flashes de Destilaria**. STBA, Vol. 25 n°2, p.34-38.

VERSTREPEN K.J., JANSEN A., LEWITTER F., FINK G.R. 2005. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nat Genet** ;37:986–90.

VERSTREPEN K.J., KLIS F.M. 2006. Flocculation, adhesin and biofilm formation in yeasts. **Mol Microbiol**;60:5-15.

VIENE, P. e STOCKAR, U. V. 1985. An investigation of ethanol inhibition and other limitations occurring during the fermentation of concentrated whey permeate by *Kluyveromyces fragilis* strains. **Biotechnology Letters**, v.7, n.7, p. 521-526.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. 2009a. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology Biotechnology**; 82:815-827.

ZHAO, X.Q., BAI, F.W. 2009b. Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 849-856.