



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

LUÍSA HELENA FARIAS ALVES VEIGA

**Avaliação de parâmetros de crescimento das leveduras  
*Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces  
cerevisiae***

RECIFE  
2022

LUÍSA HELENA FARIAS ALVES VEIGA

**Avaliação de parâmetros de crescimento das leveduras  
*Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces  
cerevisiae***

Monografia apresentada ao Curso de  
Bacharelado em Ciências Biológicas/UFRPE  
como requisito para obtenção do grau de  
Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Éder Galinari Ferreira

RECIFE  
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

V426aa Veiga, Luísa Helena Farias Alves  
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* E *Saccharomyces cerevisiae* / Luísa Helena Farias Alves Veiga. - 2022.  
37 f. : il.

Orientador: Eder Galinari Ferreira.  
Inclui referências e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

1. leveduras. 2. velocidade máxima de crescimento. 3. constante de saturação. 4. biomassa microbiana. I. Ferreira, Eder Galinari, orient. II. Título

CDD 574

---

LUÍSA HELENA FARIAS ALVES VEIGA

**Avaliação de parâmetros de crescimento das leveduras  
*Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae***

Comissão Avaliadora:

---

Prof. Dr. Éder Galinari Ferreira – UFRPE

Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yone Vila Nova Cavalcanti – UFRPE

Titular

---

Prof. Dr. Robson de Assis Souza – UNIFENAS e EPAMIG

Titular

RECIFE

2022

## RESUMO

Os microrganismos mais utilizados nas indústrias são as leveduras. A *Kluyveromyces lactis* é utilizada na produção de proteínas e da enzima  $\beta$ -galactosidase pela indústria farmacêutica, além da produção de proteínas heterólogas de importância biotecnológica. A *Kluyveromyces marxianus* possui diversidade metabólica, termotolerância, assimila lactose como fonte de energia e carbono e tem a maior velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) conhecida dentre os microrganismos eucarióticos. A *S. cerevisiae* é muito utilizada em produtos fermentados, como pães e bebidas alcoólicas, e ainda, pode ser usada na biorremediação de metais pesados, como o zinco, mercúrio, chumbo, cádmio, níquel, arsênico, ouro, cromo, urânio e platina. Para a produção de biomassa de leveduras em escala industrial, é importante conhecer alguns parâmetros como a velocidade máxima de crescimento e a constante de saturação, bem como determinar a produção da biomassa de forma rápida. Neste caso, é possível correlacionar a biomassa com a densidade óptica celular. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi comparar os crescimentos das leveduras *K. marxianus*, *K. lactis* e *S. cerevisiae* em meio YP com diferentes concentrações de glicose [2,5 g/L, 5,0 g/L, 10,0 g/L, e 20,0 g/L (p/v)], determinado suas velocidades máximas de crescimento, a constante de saturação e correlacionando a produção de biomassa com as densidades ópticas celulares. *K. marxianus* foi incubada a 37 °C e *K. lactis* e *S. cerevisiae* a 30 °C em *shaker* a 200 rpm. Determinou-se a densidade óptica celular (DO) em espectrofotômetro (600 nm). Mediu-se a DO após 2, 3, 4, 5 e 6 h de incubação. As velocidades máximas de crescimento e as constantes de saturação obtidas para *K. marxianus*, *K. lactis* e *S. cerevisiae* foram, respectivamente, 0,69 h<sup>-1</sup> e 0,17 g/L, 0,45 h<sup>-1</sup> e 0,385 g/L, 0,47 h<sup>-1</sup> e 0,54 g/L. Para o cálculo da correlação das biomassas com as densidades ópticas celulares foram preparadas diluições a partir de uma suspensão microbiana mãe de cada espécie de levedura, obtendo as diluições 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Considerando respectivamente essas diluições, as DO e biomassas obtidas para *K. marxianus* foram 53,15 e 23,0 g/L, 27,68 e 12,0 g/L, 12,76 e 6,7 g/L, 7,33 e 4,4 g/L, 4,04 e 2,9 g/L, 2,1 e 1,7 g/L. Da mesma forma, para *K. lactis* as DO e biomassas determinadas foram 59,35 e 21 g/L, 28,80 e 11 g/L, 13,95 e 6,3 g/L, 8,16 e 3,4 g/L, 4,53 e 1,9 g/L, 2,25 e 1,2 g/L. E ainda, para *S. cerevisiae* as DO e biomassas calculadas foram 39,3 e 16 g/L, 19,13 e 8,5 g/L, 9,04 e 4,7 g/L, 4,82 e 3,4 g/L, 2,55 e 1,4 g/L, 1,39 e 1,2 g/L. Conclui-se que, nas condições avaliadas, a levedura *K. marxianus* exibiu maiores velocidade máxima de crescimento e biomassa, com uma menor constante de saturação dos transportadores de glicose quando comparada a *K. lactis* e *S. cerevisiae*.

**Palavras-chave:** leveduras; velocidade máxima de crescimento; constante de saturação; biomassa microbiana

## ABSTRACT

The microorganisms most used in industries are yeasts. *Kluyveromyces lactis* is used in the production of proteins and the enzyme  $\beta$ -galactosidase by the pharmaceutical industry, in addition to the production of heterologous proteins of biotechnological importance. *Kluyveromyces marxianus* has metabolic diversity, thermotolerance, assimilates lactose as a source of energy and carbon and has the highest maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) known among eukaryotic microorganisms. *S. cerevisiae* is widely used in fermented products, such as breads and alcoholic beverages, and can also be used in the bioremediation of heavy metals, such as zinc, mercury, lead, cadmium, nickel, arsenic, gold, chromium, uranium, and platinum. To produce yeast biomass on an industrial scale, it is important to know some parameters such as the maximum growth rate and the saturation constant, as well as to determine the biomass production quickly. In this case, it is possible to correlate the biomass with the cell optical density. Thus, the objective of this work was to compare the growth of *K. marxianus*, *K. lactis* and *S. cerevisiae* yeasts in YP medium with different glucose concentrations [2.5 g/L, 5.0 g/L, 10.0 g/L, and 20.0 g/L (w/v)], determining their maximum growth rates, the saturation constant and correlating biomass production with cellular optical densities. *K. marxianus* was incubated at 37 °C and *K. lactis* and *S. cerevisiae* at 30 °C in a shaker at 200 rpm. The cell optical density (OD) was determined in a spectrophotometer (600 nm). The optical density was measured after 2, 3, 4, 5 and 6 h of incubation. The maximum growth rates and saturation constants obtained for *K. marxianus*, *K. lactis* and *S. cerevisiae* were, respectively, 0.69 h<sup>-1</sup> and 0.17 g/L, 0.45 h<sup>-1</sup> and 0.385 g/L, 0.47 h<sup>-1</sup> and 0.54 g/L. To calculate the correlation of biomass with cell optical densities, dilutions were prepared from a mother microbial suspension of each yeast species, obtaining dilutions 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16. Considering these dilutions, respectively, the OD and biomass obtained for *K. marxianus* were 53.15 and 23.0 g/L, 27.68 and 12.0 g/L, 12.76 and 6.7 g/L, 7.33 and 4.4 g/L, 4.04 and 2.9 g/L, 2.1 and 1.7 g/L. Likewise, for *K. lactis* the OD and biomass determined were 59.35 and 21 g/L, 28.80 and 11 g/L, 13.95 and 6.3 g/L, 8.16 and 3.4 g/L, 4.53 and 1.9 g/L, 2.25 and 1.2 g/L. And yet, for *S. cerevisiae* the OD and biomass calculated were 39.3 and 16 g/L, 19.13 and 8.5 g/L, 9.04 and 4.7 g/L, 4.82 and 3.4 g/L, 2.55 and 1.4 g/L, 1.39 and 1.2 g/L. It is concluded that, under the conditions evaluated, the yeast *K. marxianus* exhibited higher maximum growth velocity and biomass, with a lower saturation constant of glucose transporters when compared to *K. lactis* and *S. cerevisiae*.

**Keywords:** yeasts; maximum growth speed; saturation constant; microbial biomass

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Crescimento em fase logarítmica de <i>K. marxianus</i> CCT7735 em meio YP com diferentes concentrações de Glicose .....	18
<b>Figura 2.</b> Velocidades de crescimento específicas de <i>K. marxianus</i> limitada por glicose. Médias de duas repetições .....	19
<b>Figura 3.</b> Determinação da velocidade máxima de crescimento e da constante de saturação dos transportadores de glicose da levedura <i>K. marxianus</i> .....	19
<b>Figura 4.</b> Crescimento em fase logarítmica de <i>K. lactis</i> CBS2359 em meio YP com diferentes concentrações de glicose .....	21
<b>Figura 5.</b> Velocidades de crescimento específicas de <i>K. lactis</i> limitada por glicose .....	22
<b>Figura 6.</b> Determinação da velocidade máxima de crescimento e da constante de saturação dos transportadores de glicose da levedura <i>K. lactis</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> Crescimento em fase logarítmica de <i>S. cerevisiae</i> em meio YP com diferentes concentrações de glicose .....	23
<b>Figura 8.</b> Velocidades de crescimento específicas de <i>S. cerevisiae</i> limitada por glicose .....	24
<b>Figura 9.</b> Determinação da velocidade máxima de crescimento e da constante de saturação dos transportadores de glicose da levedura <i>S. cerevisiae</i> .....	24
<b>Figura 10.</b> Correlação das densidades ópticas celulares e as biomassas de <i>K. marxianus</i> .....	25
<b>Figura 11.</b> Correlação das densidades ópticas celulares e as biomassas de <i>K. lactis</i> .....	26
<b>Figura 12.</b> Correlação das densidades ópticas celulares e as biomassas de <i>S. cerevisiae</i> .....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Densidades ópticas da <i>Kluyveromyces lactis</i> em diferentes concentrações de glicose.....	35
<b>Tabela 2.</b> Densidades ópticas da <i>Kluyveromyces marxianus</i> em diferentes concentrações de glicose.....	36
<b>Tabela 3.</b> Densidades ópticas da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes concentrações de glicose.....	37



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Aplicações biotecnológicas das leveduras.....	10
1.2 Espécies de <i>Kluyveromyces</i> e suas utilizações na indústria.....	11
1.3 Aplicações da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na indústria.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Meio de cultura.....	14
3.2 Determinação das velocidades de crescimento específicas ( $\mu$ ) e máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e as constantes de saturação ( $K_s$ ).....	15
3.3 Correlação das biomassas com as densidades ópticas.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 Velocidades específicas e máximas de crescimento e constante de saturação.....	16
4.2 Correlação das biomassas com as densidades ópticas celulares.....	25
5. CONCLUSÕES.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
ANEXOS.....	35

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aplicações biotecnológicas das leveduras

A biotecnologia envolve um conjunto de técnicas desenvolvidas a partir de pesquisas que são aplicadas para elaboração ou melhoria de produtos mais baratos e seguros nos setores industriais; eles vão desde produtos farmacêuticos para humanos e animais, até aditivos alimentares, fertilizantes, enzimas industriais e microrganismos que degradam substâncias poluentes (OTA, 1991). No século XIV, Louis Pasteur descobriu a fermentação natural por meio de leveduras, usou microrganismos para desenvolver as vacinas para cólera e antraz e fez os primeiros testes da vacina contra raiva; no século XX, Weizmann produziu butanol e acetona por meio de microrganismos; e ao final do século XX, Chakrabarty conseguiu a patente de um microrganismo usado para biorremediação de petróleo (MALAJOVICH, 2016).

Os microrganismos mais utilizados nas indústrias são as leveduras, elas pertencem ao Reino Fungi, suas células são eucarióticas, unicelulares e na maioria das vezes se reproduzem de forma assexuada; a partir delas é possível obter suas células, os componentes que nela contém e os produtos gerados durante a fermentação alcoólica (WHITTAKER, 1969; ABREU *et al.*, 2015; LEITE, 2015). Esses microrganismos são importantes em diversos setores da biotecnologia, pesquisadores fazem o uso da levedura para a produção de bioetanol (MOREIRA *et al.*, 2015), cerveja (FIGUEIRÊDO, 2017), vinho (e.g. QUINCOZES, 2018), panificação (SILVA, 2020), produção de lipases e outras enzimas (e.g. GUEDES *et al.*, 2020; ARAÚJO, 2015; SOLER, 2015), como bioindicador (CARNEIRO *et al.*, 2015) e na produção de biofármacos (GUERREIRO, 2016).

Muitas espécies de levedura não possuem características patogênicas; são fungos abundantes na natureza e usam uma vasta variedade de nutrientes em diferentes condições ambientais, além de serem fonte de proteínas e outros compostos importantes (RODRIGUES & SANTANNA, 2001; TORNAL-LEHOCZKI *et al.*, 2003). Possuem características de cultivo que são mais úteis na biotecnologia do que os fungos filamentosos, entre tais características, se destacam o fato de serem unicelulares e de se desenvolverem de forma favorável em suspensão, permitindo maior controle sobre a cultura microbiológica (BERGMAN, 2001; GALINARI *et al.*, 2018).

Algumas espécies de levedura são utilizadas na biotecnologia devido ao reconhecimento pelo FDA (*Food and Drug Administration*) com o *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*), sendo assim, uma levedura segura, que não possui genes de patogenicidade. A espécie *Kluyveromyces lactis* recebeu esse *status*, além de possuir metabolismo oxidativo com pouca retenção catabólica, ocasionando em maior aumento de rendimento de proteínas heterólogas e biomassa e baixos níveis de processamento de proteínas e de glicosilação na via secretora, estimulando assim a secreção de proteínas expressas (BARTEVICIUTE & SASKAUNAS, 2004; USA, 2004; PISCITELLI *et al.*, 2005; USA, 2012; FDA, 2019).

A espécie *Kluyveromyces marxianus* é considerada um microrganismo útil para a indústria biotecnológica, possuindo também o *status* GRAS, além disso, ela possui diversidade metabólica, termotolerância, assimila lactose como fonte de energia e carbono e tem a maior velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) conhecida dentre os microrganismos (FONSECA *et al.*, 2008; TAVARES, 2017; GALINARI *et al.*, 2018).

## 1.2 Espécies de *Kluyveromyces* e suas utilizações na indústria

As indústrias têxteis descartam enormes quantidades de corantes variados no meio ambiente, e isso é prejudicial e alarmante uma vez que tais corantes influenciam no ecossistema aquático e causam riscos para a saúde pública, pois a acumulação desses compostos pode acarretar a contaminação do solo e corpos d'água (GRUPTA *et al.*, 2007, GRASSI *et al.*, 2011, SRIRAM *et al.*, 2013). Diante disso, WAKIL *et al.* (2019), utilizou a enzima lacase proveniente de duas linhagens das espécies de levedura *Pichia manshurica* e *Kluyveromyces dobzhanskii*, para tratar dois corantes, o verde malaquita e o vermelho de metila. Foi constatado a queda no número dos espectros pela Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), indicando que ocorreu a descoloração parcial e a remoção ou a degradação de alguns grupos funcionais dos corantes. O grupo azoquímico foi removido, provando assim sua eficácia na biorremediação desses resíduos da indústria têxtil.

Algumas leveduras do gênero *Dekkera* sp. e *Brettanomyces* sp. causam um enorme problema na indústria do vinho, sendo consideradas contaminantes indesejáveis, causando alterações no aroma do vinho; como o armazenamento do vinho ocorre em barris de madeira, a presença de matéria orgânica dos microrganismos fermentativos em contato com a madeira

permite a penetração de outros microrganismos, como as leveduras *Brettanomyces* e *Dekkera*, (MALFEITO-FERREIRA, 2019; SCHUMAKER *et al.*, 2017; GUZZON *et al.*, 2017).

COMITINI *et al.* (2004) testou 29 leveduras para os efeitos deterioradores de 15 linhagens mais comuns de *Brettanomyces* sp. e *Dekkera* sp. em vinho; apenas oito leveduras demonstraram atividade contra os dois gêneros, mas apenas as espécies *Pichia anomala* e *Kluyveromyces wickerhamii* conseguiram controlar todas as linhagens.

Por possuir *status* GRAS, *K. marxianus* pode ser utilizada na indústria, produzindo compostos aromáticos como cetonas, alcoois monoterpênicos, ácidos carboxílicos, ésteres de frutas e acetato de isoamila durante a fermentação líquida (ROLLER *et al.*, 2018). A *K. marxianus* possui a habilidade de excretar enzimas, como a pectinase, tal enzima é utilizada na clarificação e maceração de sucos de frutas, redução de viscosidade, turbidez e consistência dos sucos, desmucilagem de grãos do café, auxilia na extração do azeite de oliva e é usada na indústria têxtil para remoção de impurezas não-celulósicas (CHALFOUN *et al.*, 2017; ROLLER *et al.*, 2018; SALIM *et al.*, 2018; DAL MAGRO, 2020; MARROQUES, 2020). As enzimas pectolíticas também podem se agregar a uma mistura de carboidrases, e a partir disso, ser utilizada para fabricação de ração animal (SILVA *et al.*, 2016).

A *K. lactis* é utilizada em diversos setores da indústria biotecnológica, sendo empregada na produção de proteínas e da enzima  $\beta$ -galactosidase pela indústria farmacêutica (e.g. FLEER *et al.*, 1991a; CHEN *et al.*, 1992; ROCHA *et al.*, 1996; IWATA *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2019), além da indústria farmacêutica, a *K. lactis* é eficiente na expressão de proteínas heterólogas com importância biotecnológica, alguns autores corroboraram sua eficiência na produção de *Lactobacillus plantarum* SP-50, 2'-fucosil-lactose e peptidase aspártica de *Arctium minus* (DATO, 2018; BRAVO, 2019; BARRERA *et al.*, 2020; CAMPOS, 2020). Também foi usada como biocatalisador para produção de ácido hialurônico e produção de bioetanol a partir da fermentação de permeado de soro de queijo (GOMES *et al.*, 2019; SAMPAIO *et al.*, 2019).

Aminas opticamente ativas, ácidos carboxílicos e álcoois são compostos importantes para síntese de produtos agrícolas e farmacêuticos, os álcoois secundários opticamente ativos são usados para introdução de grupos quirais em produtos (BREUER *et al.*, 2004; GOLDBERG *et al.*, 2007). O álcool opticamente ativo, etil(S)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato [(S)-CHBE], é um iniciador de intermediários enantiopuros para fabricação de drogas quirais, inclusive a diminuição do colesterol que inibe a hidroximetilglutaril-CoA redutase, presente no produto

farmacêutico Lipitor da Pfizer (ASAKO *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2010). Foi descoberto por YAMAMOTO *et al.* (2004), uma carbonil redutase dependente de NADH, que catalisava o 4-cloroacetato de etila para formar a (S)-CHBE; como resultado, foi encontrada a redutase KaCR da *Kluyveromyces aestuarii*.

### 1.3 Aplicações da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na indústria

A *S. cerevisiae* é uma espécie de levedura muito utilizada nas indústrias brasileiras, estando associada, principalmente, a fabricação de insumos alcoólicos e na panificação, além da produção de bioetanol (SANTOS *et al.*, 2012). Ela é um microrganismo anaeróbio facultativo, podendo crescer em condições de aerobiose e anaerobiose. Na condição de aerobiose o açúcar é convertido em biomassa, H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>, enquanto na anaerobiose, grande parte é transformada em etanol e CO<sub>2</sub>, ou seja, fermentação alcoólica (SANTOS *et al.*, 2010).

A *S. cerevisiae* é utilizada em produtos fermentados, como: cerveja, vinho, cidra, vodca, rum, whisky e conhaque (PARAPOULI *et al.*, 2019). Os ésteres contribuem para os aromas florais e frutados na indústria vinícola, a *S. cerevisiae* sintetiza os ésteres acetato de álcoois superiores e os ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média. Esses ésteres incluem o acetato de isoamila (pera, banana), acetato de feniletila (mel, frutado, rosa), acetato de etila (frutado, esmalte, verniz), isobutil acetato (banana), octanoato de etila (pera, abacaxi), hexanoato de etila (violetas, banana, maçã) e decanoato de etila (floral) (LAMBRECHTS & PRETORIUS, 2000).

Outra aplicação da *S. cerevisiae* inclui a biorremediação, para a remoção de metais pesados do ambiente (VOLESKY, 1990; MASSOUD *et al.*, 2018). Pesquisas mostraram o potencial da levedura ao remover metais pesados, limpar os radioativos e recuperar metais preciosos, como a remoção do zinco, mercúrio, chumbo, cádmio, níquel, arsênico, ouro, cromo, urânio e platina (BAKKALOGLU *et al.*, 1998; KEDARI *et al.*, 2001; ÖZER & ÖZER 2003; VASUDEVAN *et al.*, 2003; XIE *et al.*, 2003; FERRAZ *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2004; ROY *et al.*, 2005; GOKSUNGUr *et al.*, 2005).

Uma pesquisa realizada por MELO (2021) visou observar a absorção do corante cristal violeta, que é usado em diversos processos de tingimento na indústria, e quando não tratados corretamente antes de serem depositados nos efluentes, coloca em risco todo o ecossistema

aquático (ROYER, 2008; BAZZO, 2015). Em seus resultados, a *S. cerevisiae* em concentração de 0,75 % após 60 minutos de contato com o corante, conseguiu removê-lo 86%.

Considerando que a obtenção de determinadas biomoléculas importantes do ponto de vista biotecnológico dependa da produção de biomassa microbiana, é fundamental compreender o crescimento do microrganismo em questão, determinando-se sua velocidade máxima de crescimento e a constante de saturação. Além disso, correlacionar o aumento da biomassa microbiana com a densidade óptica celular, permitirá determinar, por exemplo, quando se alcança certa quantidade de microrganismos, apenas realizando um ensaio rápido como a espectrofotometria. Dessa forma, será possível estabelecer uma produção otimizada em larga escala para aquele microrganismo (MYERS *et al.*, 2013).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar os crescimentos das leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPD.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Determinar as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) e as velocidades máximas de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) das leveduras *K. marxianus*, *K. lactis* e *S. cerevisiae* em meio YPD.
- ✓ Correlacionar a produção de biomassas com as densidades ópticas das leveduras *K. marxianus*, *K. lactis* e *S. cerevisiae* cultivadas em meio YPD.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Meio de cultura**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental, na UFRPE-SEDE. As leveduras *K. lactis* e *K. marxianus* foram adquiridas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa-MG, e a *S. cerevisiae* foi adquirida do Laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

A manutenção da levedura foi feita em meio extrato de levedura (10 g/L) peptona (20 g/L) e dextrose (20 g/L) (YPD). Para os experimentos, utilizou-se o meio YPD variando as concentrações de glicose em 2,5 g/L, 5,0 g/L, 10,0 g/L, e 20,0 g/L (v/v).

### 3.2 Determinação das velocidades de crescimento específicas ( $\mu$ ) e máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e as constantes de saturação ( $K_s$ )

O inóculo foi crescido *overnight* em caldo YPD a 37 °C (para *K. marxianus*) e 30 °C (para *K. lactis* e *S. cerevisiae*), sob agitação orbital (200 rpm). As células foram recuperadas por centrifugação (5.000 rpm, 5 min, 25 °C). O pellet foi lavado duas vezes com solução salina de NaCl 0,9% (p/v) e novamente centrifugado. As células foram ressuspensas em 10 mL de caldo YP e homogeneizadas. Determinou-se a densidade óptica celular (D.O.) em espectrofotômetro (600 nm). Os frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo o meio de cultura YPD (25 mL de volume final = meio + inóculo) foram inoculados com a levedura em uma densidade óptica inicial de 0,1. Os frascos foram tapados com rolhas de gaze e algodão. Os ensaios foram realizados em duas repetições. O meio YP foi suplementado com 2,5 g/L, 5,0 g/L, 10,0 g/L, e 20,0 g/L (v/v) de glicose. As culturas foram incubadas a 37 °C (para *K. marxianus*) e 30 °C (para *K. lactis* e *S. cerevisiae*) em agitador orbital (200 rpm). Mediu-se a D.O. após 2, 3, 4, 5 e 6 h (todas as medições na fase logarítmica de crescimento). Plotou-se os gráficos (tempo x LnDO) e obteve-se as equações da reta. Para cada concentração avaliada obteve-se a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ). Com esses valores plotou-se um gráfico (1/D vs 1/concentração do substrato) para calcular a velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e a constante de saturação ( $K_s$ ).

### 3.3 Correlação das biomassas com as densidades ópticas

A correlação da produção de biomassa das leveduras em função da densidade óptica as leveduras foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YP suplementado com 2 % de glicose e incubadas em agitador orbital a 200 rpm nas respectivas temperaturas de crescimento de cada espécie. Após 24 h de incubação as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min à 25 °C, descartando-se o sobrenadante. Os *pellets* de células foram ressuspensos em 10 mL de salina de NaCl a 0,9 % (p/v). Posteriormente, procedeu-se com as diluições seriadas, transferindo-se 5 mL da suspensão mãe (diluição 1:0) para outro tubo contendo 5 mL de água destilada estéril (diluição 1:1). Desta, após homogeneização, 5 mL foram transferidos para outro tubo contendo 5 mL de água destilada estéril (diluição 1:2). Este procedimento foi-se repetindo até o sexto tubo, obtendo-se, respectivamente, as diluições 1:4, 1:8 e 1:16. De cada tubo, transferiu-se, em duplicata 1 mL,

para cadinhos feitos de papel alumínio, previamente pesados. Os cadinhos foram secos em estufa à 105 °C por 3 horas. Após, os cadinhos foram resfriados em dessecador contendo sílicagel à temperatura ambiente e pesados novamente. De cada tubo contendo as suspensões microbianas diluídas, mediu-se a densidade óptica (DO) à 600 nm em espectrofotômetro, procedendo-se com as diluições, quando obtinha-se leitura da DO superior a 0,800. A quantidade de salina em cada tubo foi descontada do valor final da biomassa seca.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Velocidades específicas e máximas de crescimento e constante de saturação

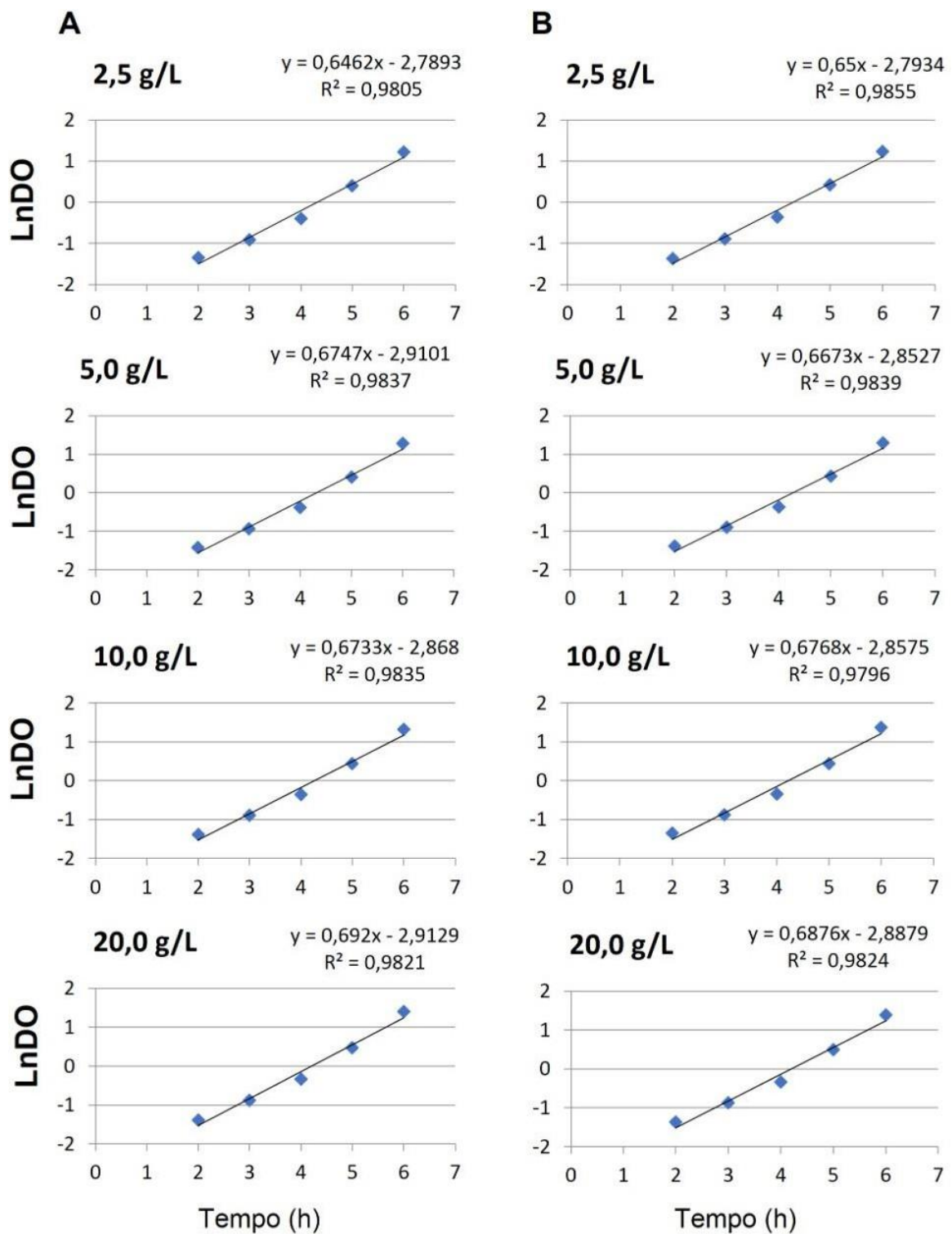
Diante do que foi mencionado anteriormente, no ensaio para determinar o  $\mu_{\text{máx}}$  e a  $K_s$  da levedura *K. marxianus*, observou-se nas duas repetições (Figuras 1) que a partir do primeiro ponto de amostragem (após 2 horas de cultivo) o crescimento estava na fase log, mostrando uma DO de 0,206, na primeira repetição e 0,2550 na segunda repetição. A partir do tempo 5 horas foram feitas diluições para ambas as repetições, sendo 500  $\mu\text{L}$  de inóculo e 500  $\mu\text{L}$  de salina 0,9 %, obtendo-se DO 0,748; como havia feito a diluição, esse valor foi multiplicado por 2, resultando em DO 1,496 na concentração de 2,5 g/L. No último tempo amostrado (6 horas) foi feita uma diluição de 10 vezes, obtendo-se uma DO final de 3,410 e 3,420, nas repetições 1 e 2, respectivamente, na concentração 2,5 g/L. As DO nas duas repetições foram diferentes das demais leveduras, a segunda repetição obteve índices maiores de DO, contudo, a diferença de densidade entre as duas não foi tão discrepante, a não ser pela concentração de 10 g/L, em que na hora 6 da primeira repetição foi 3,700 e na segunda repetição na mesma hora foi 3,9400, ocasionando uma margem de 0,22 de diferença, sendo esta, a maior diferença entre todas as repetições e concentrações para *K. marxianus*. As maiores densidade ópticas foram observadas no tempo 6 horas, sendo 3,600 e 3,6300 (concentração 5 g/L), 3,7200 e 3,9400 (concentração 10 g/L) e 4,050 e 4,000 (concentração 20 g/L), nas repetições 1 e 2, respectivamente.

As velocidades de crescimento específicas médias observadas para *K. marxianus* foram 0,6481, 0,671, 0,67505 e 0,6898  $\text{h}^{-1}$  nas concentrações 2,5, 5,0, 10,0 e 20 g/L de glicose, respectivamente (Figura 2). A velocidade máxima de crescimento e a constante de saturação determinadas para *K. marxianus* foram 0,69  $\text{h}^{-1}$  e 0,17 g/L, respectivamente (Figura 3). A velocidade máxima de crescimento determinada neste trabalho foi menor do que as obtidas

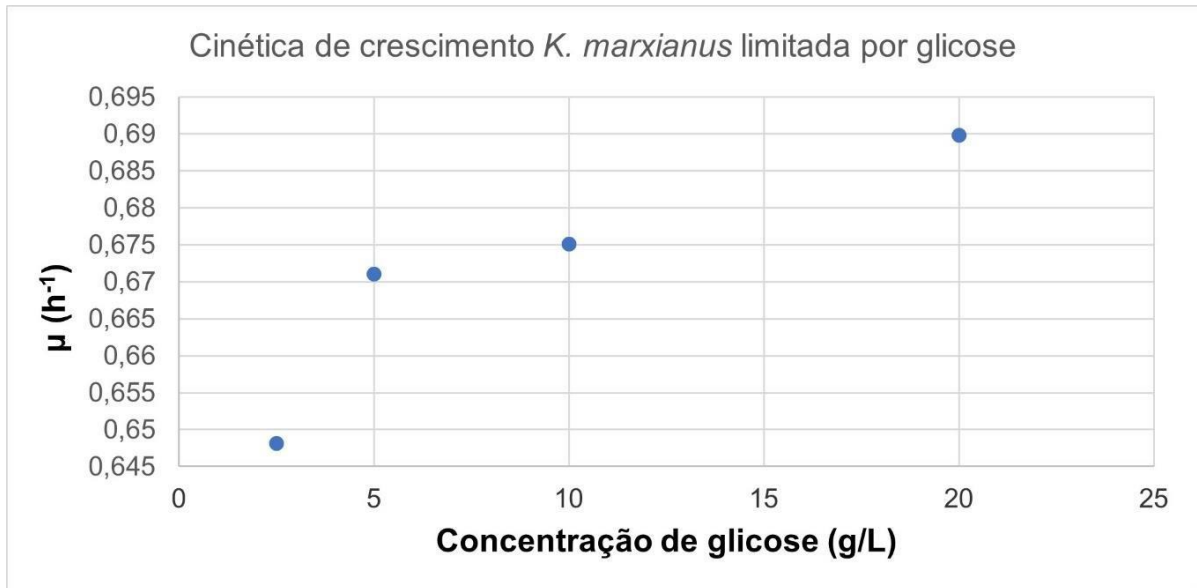


por Ferreira (2014) que testou o crescimento da *K. marxianus* com 30 g/L de glicose em diferentes temperaturas, e em seus resultados, o  $\mu_{\text{máx}}$  a 40 °C foi de 0,94 h<sup>-1</sup> e a 35 °C foi 0,74 h<sup>-1</sup>, e a maior produtividade celular ocorreu a 35 °C com 0,38 g/L/h. Enquanto na pesquisa de MURARI *et al.* (2018) no cultivo de *K. marxianus* em permeado de soro, a levedura apresentou uma taxa de crescimento de 0,25 h<sup>-1</sup> em aerobiose, 0,21 h<sup>-1</sup> em microaerobiose e 0,16 h<sup>-1</sup> em anaerobiose; além disso, as concentrações de biomassa de sua pesquisa foram, respectivamente, 11,48 g/L, 9,17 g/L e 7,48 g/L. Por outro lado, para o permeado de soro de queijo as taxas de crescimento foram 0,30 h<sup>-1</sup> (aerobiose), 0,36 h<sup>-1</sup> (microaerobiose) e 0,27 h<sup>-1</sup> (anaerobiose), e as concentrações de biomassa foram 8,8 g/L, 7,84 g/L e 7,20 g/L, respectivamente. Os menores valores das velocidades máximas de crescimento e de produção de biomassa obtidos por MURARI e colaboradores pode estar relacionada ao tipo de fonte de carbono, lactose, que possivelmente tem uma taxa de metabolização mais lenta do que a glicose.

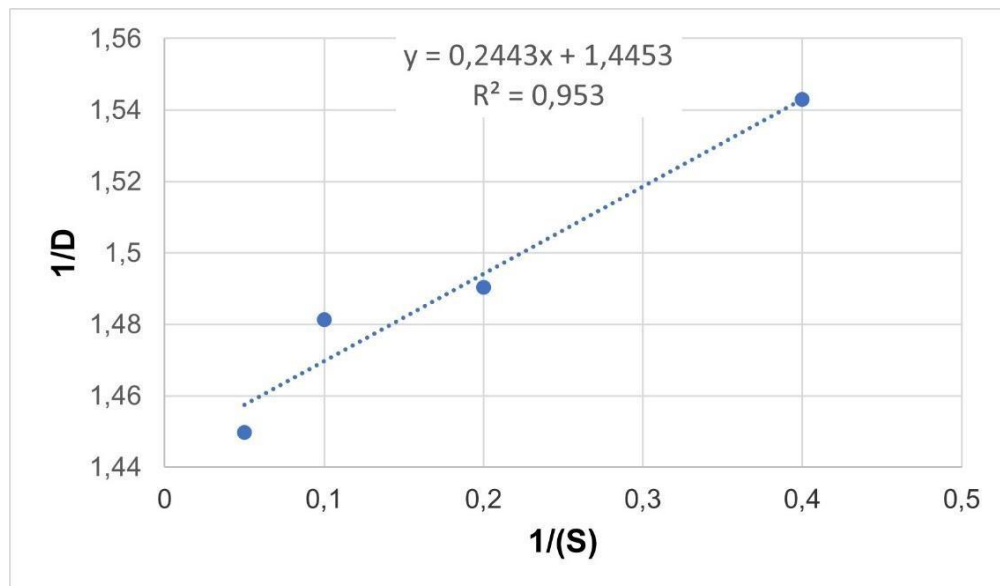
Nas avaliações da levedura *K. lactis* a primeira repetição apresentou densidades ópticas maiores em todas as concentrações quando comparado com a segunda repetição. Nos tempos de amostragem 5 e 6 horas a levedura teve um crescimento ascendente e superou a segunda repetição sob as mesmas condições de glicose. Na primeira repetição a concentração de 5,0 g/L foi a que obteve mais diferença entre todas as outras concentrações, em comparação com a segunda repetição, entre as horas 5 e 6, houve uma diferença de 0,16, em que na hora 5 a *K. lactis* da primeira repetição obteve DO 0,8510 e na hora 6 ela obteve DO 1,4860, enquanto a *K. lactis* da segunda repetição na hora 5, obteve DO 0,6210 e na hora 6 alcançou DO 1,0960. Sendo essa a concentração ideal para o crescimento da *K. lactis*. A levedura foi diluída em ambas as repetições na hora 6, utilizando na cubeta 500 µL de salina 0,9 % NaCl (p/v) e 500 µL da cultura, o resultado obtido no espectrofotômetro foi multiplicado por 2 (Figura 4).



**Figura 1.** Crescimento em fase logarítmica de *K. marxianus* CCT7735 em meio YP com diferentes concentrações de Glicose; as curvas de crescimento representam a primeira (A) e a segunda (B) repetição.



**Figura 2.** Velocidades de crescimento específicas de *K. marxianus* limitada por glicose. Médias de duas repetições.



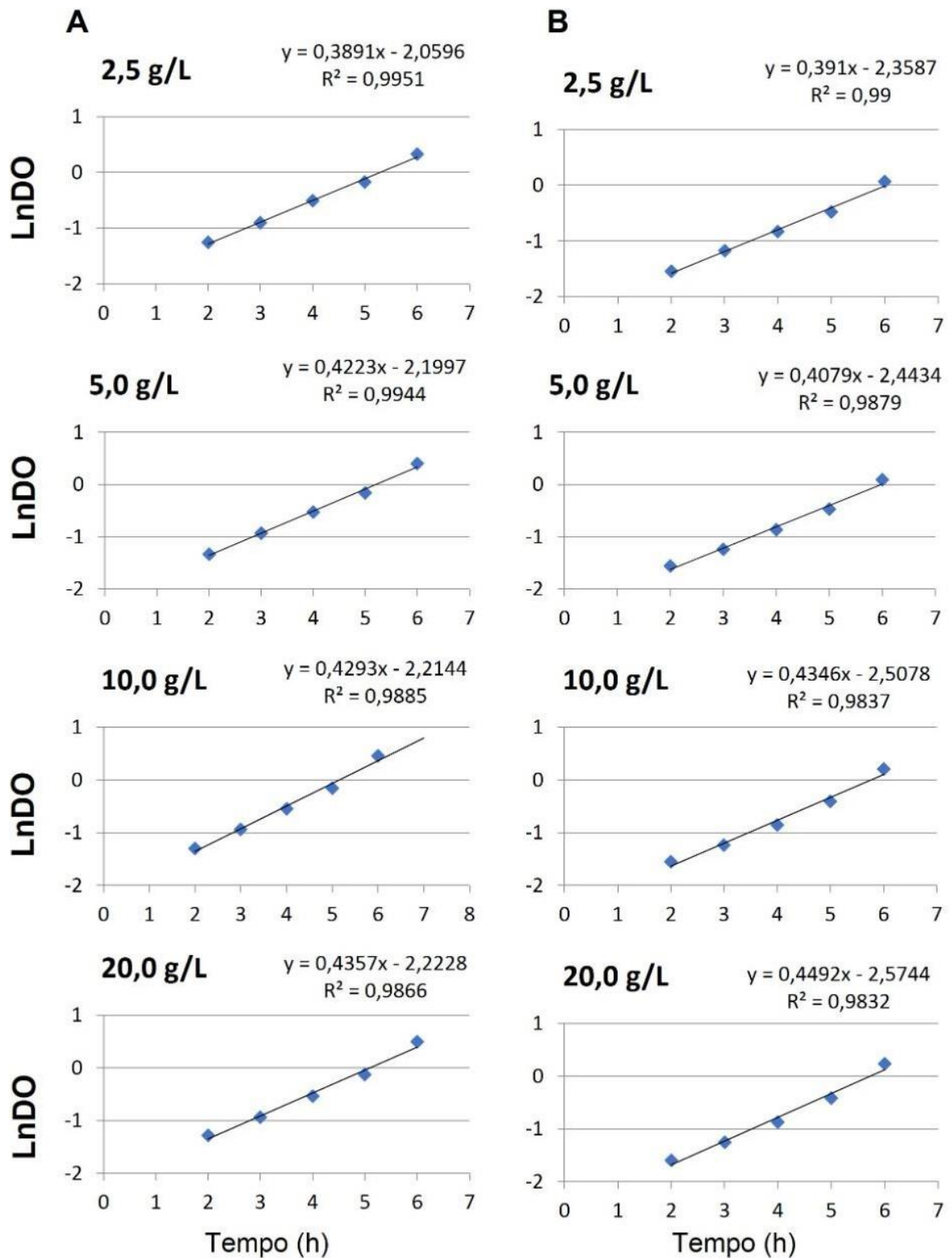
**Figura 3.** Determinação da velocidade máxima de crescimento e da constante de saturação dos transportadores de glicose da levedura *K. marxianus*.

As velocidades de crescimento específicas médias da *K. lactis* nas concentrações 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 g/L foram respectivamente, 0,39  $h^{-1}$ , 0,41  $h^{-1}$ , 0,43  $h^{-1}$  e 0,44  $h^{-1}$  (Figura 5). CAMPOS (2020) usou o meio YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e glicose 20 g/L) e avaliou o crescimento da *K. lactis* a cada 2 horas. Em seus resultados, a levedura obteve

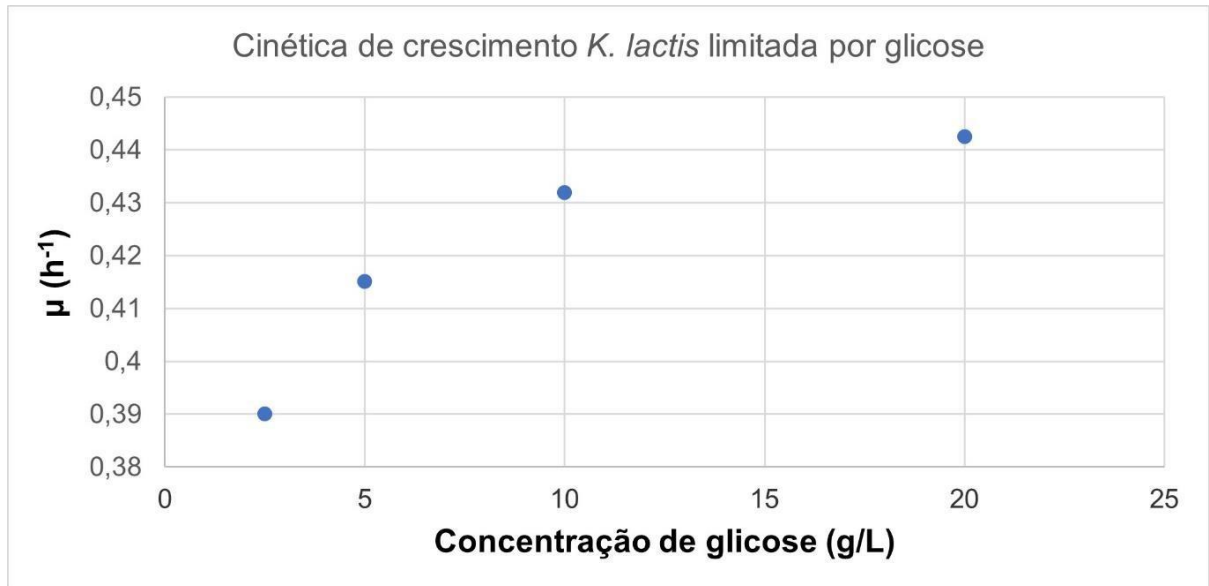
uma velocidade máxima de crescimento  $0,29 \text{ h}^{-1}$ , e no meio UAB com glicose ela demonstrou uma velocidade máxima de crescimento de  $0,348 \text{ h}^{-1}$ . Diante disso, observa-se que a linhagem utilizada no presente trabalho possui uma maior velocidade específica de crescimento ( $0,39 \text{ h}^{-1}$  e  $0,39 \text{ h}^{-1}$ , nas repetições 1 e 2, respectivamente) mesmo utilizando uma concentração de glicose oito vezes menor do que a adotada por Campos (2020). Em outro estudo, a *K. lactis* foi cultivada em soro de queijo ultrafiltrado (50 mL de SUF, incubada por 18 a 24 horas a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 200 rpm) em um regime de batelada por 22 h, obtendo-se velocidades específicas de crescimento  $0,18 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,22 \text{ h}^{-1}$  e  $0,21 \text{ h}^{-1}$  (ORNELAS, 2001). Novamente, os valores obtidos foram inferiores aos observados no presente estudo, apesar de Ornelas ter utilizado uma fonte de carbono diferente (lactose presente no soro de queijo) da glicose. Aqui, calculou-se a velocidade máxima de crescimento e a constante de saturação de glicose da *K. lactis* em  $0,45 \text{ h}^{-1}$  e  $0,385 \text{ g/L}$ , respectivamente (Figura 6).

A levedura *S. cerevisiae* obteve maiores taxas de crescimento na primeira repetição. Na concentração  $5,0 \text{ g/L}$  ela alcançou nos tempos de amostragem 5 e 6 horas a DO de 0,7510 e 1,3500, respectivamente, enquanto na segunda repetição nos mesmos tempos, obteve DO 0,6470 e 1,1940, respectivamente (Figura 7). As maiores DO foram observadas no tempo 6 horas em todas as concentrações avaliadas, sendo 1,200 e 1,0640, 1,4300 e 1,3480, 1,5180 e 1,4420, respectivamente, nas repetições 1 e nas concentrações de glicose de  $2,5 \text{ g/L}$ ,  $10 \text{ g/L}$  e  $20 \text{ g/L}$ . A *S. cerevisiae* demonstrou densidades ópticas finais semelhantes às aquelas exibidas pela *K. lactis*.

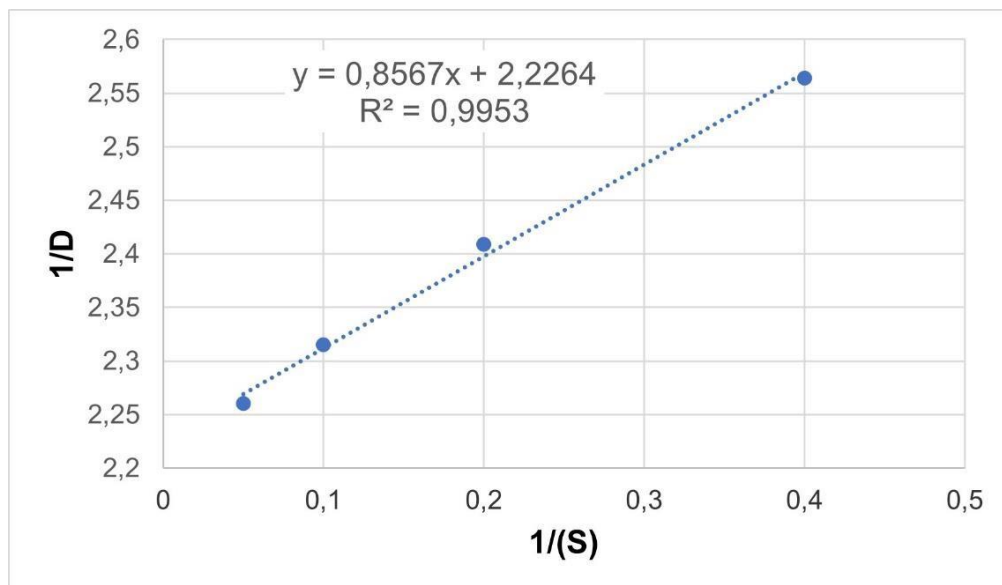
As velocidades específicas médias nas concentrações  $2,5$ ,  $5$ ,  $10$  e  $20 \text{ g/L}$  de glicose foram,  $0,3885 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,4286 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,4519 \text{ h}^{-1}$  e  $0,4592 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente (Figura 8). A velocidade máxima de crescimento da levedura *S. cerevisiae* e a constante de saturação foram  $0,47 \text{ h}^{-1}$  e  $0,54 \text{ g/L}$ , respectivamente (Figura 9). DANESI *et al.* (2006) testou o efeito da relação carbono:nitrogênio e substrato usando  $20 \text{ g/L}$  de glicose com três concentrações de extrato de levedura para o crescimento de *S. cerevisiae* a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a 100 rpm, e a concentração que obteve a taxa de crescimento máxima específica foi na relação C:N de 1:7 com  $0,39 \text{ h}^{-1}$ ; logo, o teste feito com a levedura na presente pesquisa, mostraram um crescimento eficiente em condições similares.



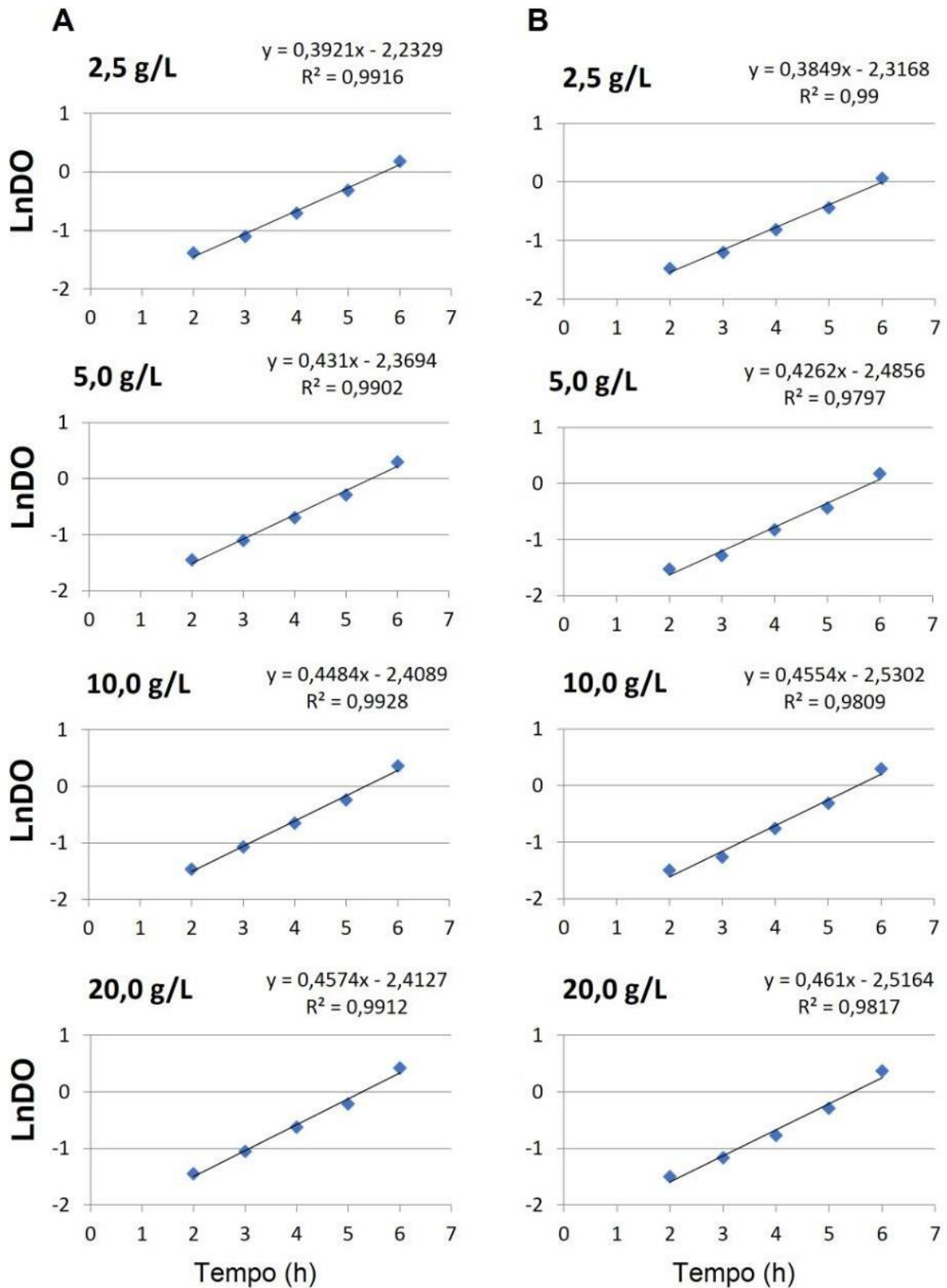
**Figura 4.** Crescimento em fase logarítmica de *K. lactis* CBS2359 em meio YP com diferentes concentrações de glicose; as curvas de crescimento representam a primeira (A) e a segunda (B) repetição.



**Figura 5.** Velocidades de crescimento específicas de *K. lactis* limitada por glicose.

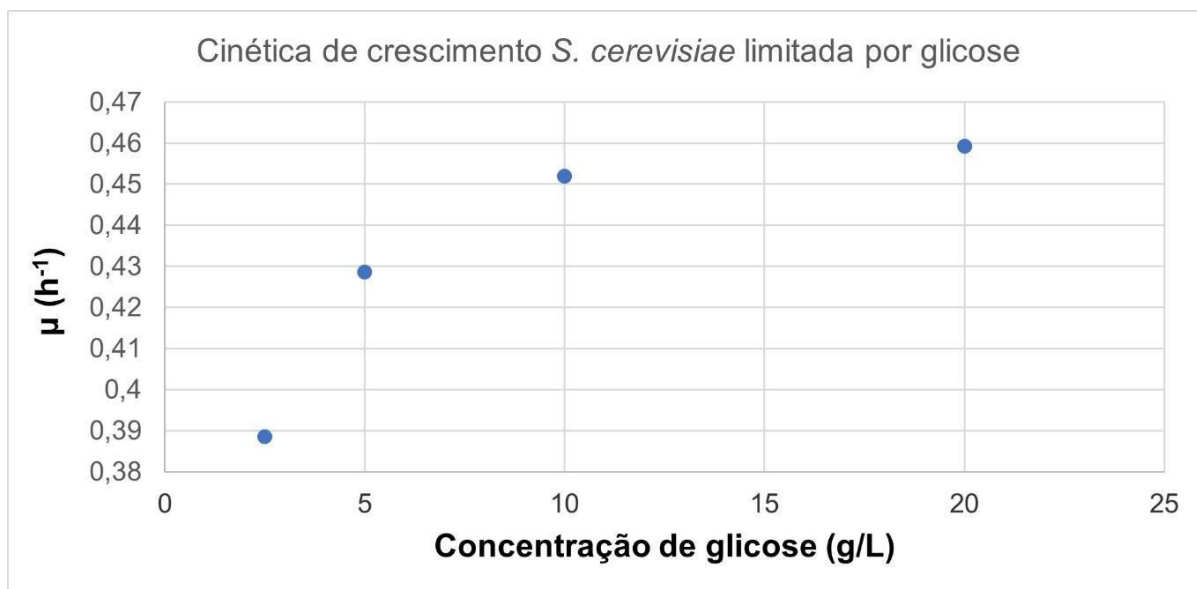


**Figura 6.** Determinação da velocidade máxima de crescimento e da constante de saturação dos transportadores de glicose da levedura *K. lactis*.

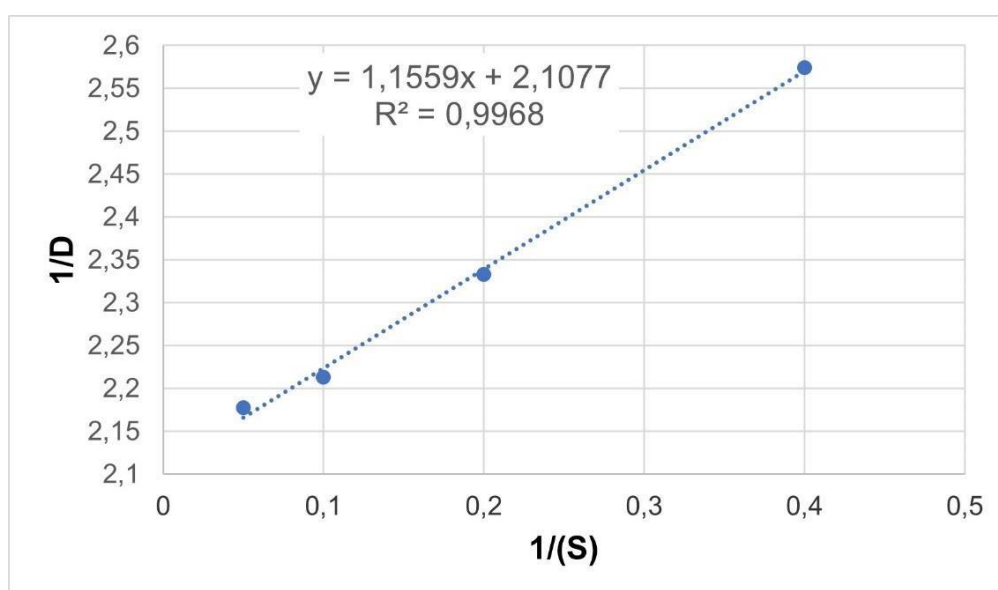


**Figura 7.** Crescimento em fase logarítmica de *S. cerevisiae* em meio YP com diferentes concentrações de glicose; as curvas de crescimento representam a primeira (A) e a segunda (B) repetição.

Cruz (2021) usou a *S. cerevisiae* em um ensaio que continha extrato de levedura e sacarose, elas permaneceram durante 14,5 h a 30 °C. A levedura utilizou 155 g/L de sacarose e 10 g/L de YE, obtendo uma velocidade de crescimento de 0,40 h<sup>-1</sup> e DO de 1,258. Diante da velocidade máxima de crescimento obtida no presente estudo, sugere-se que a linhagem avaliada aqui, é mais eficiente no crescimento, pois apresentou maior  $\mu_{\max}$  com uma menor concentração da fonte de carbono.



**Figura 8.** Velocidades de crescimento específicas de *S. cerevisiae* limitada por glicose.

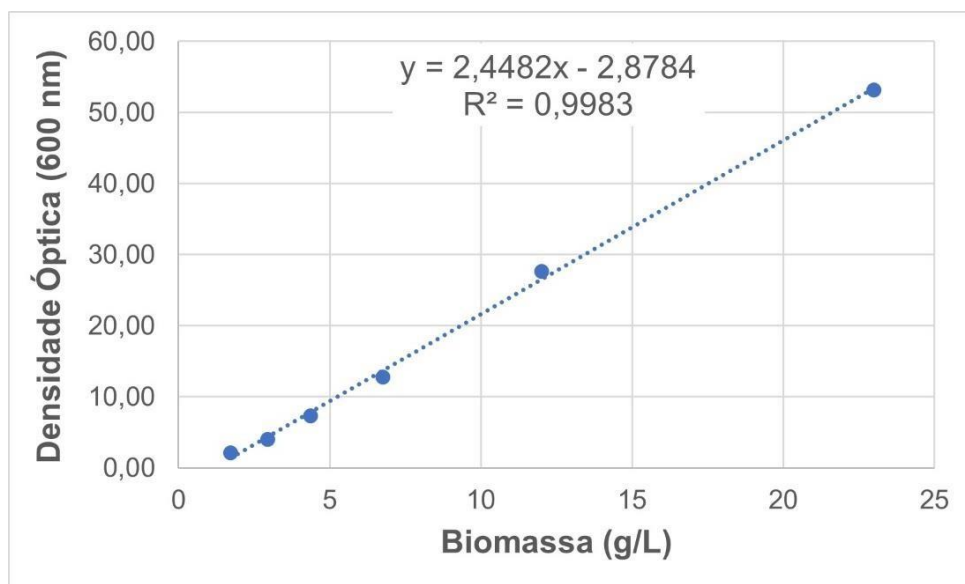


**Figura 9.** Determinação da velocidade máxima de crescimento e da constante de saturação dos transportadores de glicose da levedura *S. cerevisiae*.



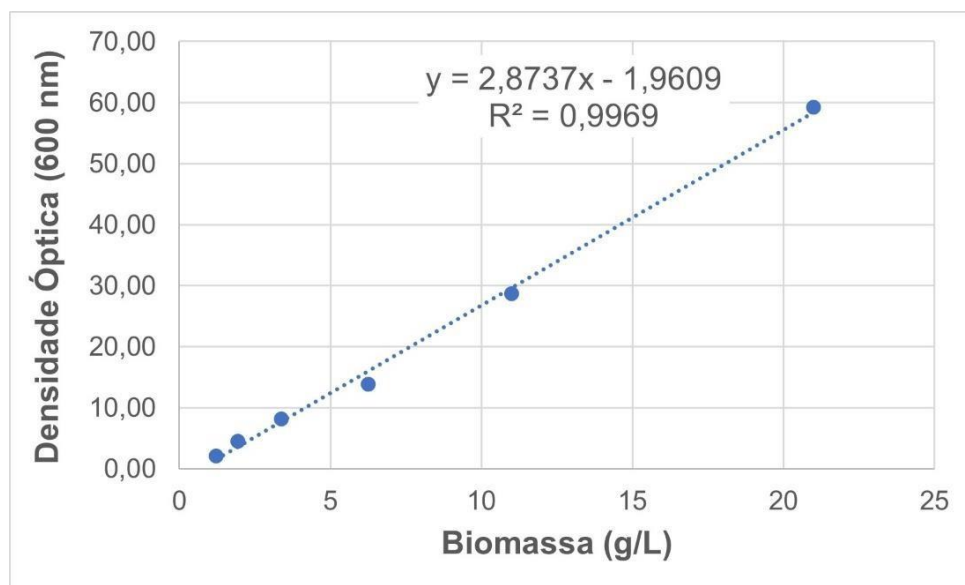
## 4.2 Correlação das biomassas com as densidades ópticas celulares

As suspensões das três espécies de leveduras (*K. marxianus*, *K. lactis* e *S. cerevisiae*) foram diluídas nas duas repetições, os fatores de diluição foram 100, 50, 20, 20 e 10, respectivamente, nas diluições 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Seguindo essa mesma sequência de diluições, as médias das DO, corrigidas pelos fatores de diluição, da *K. marxianus* foram 53,15, 27,68, 12,76, 7,33, 4,04, e 2,1, com biomassas correspondentes de 23,0 g/L, 12,0 g/L, 6,7 g/L, 4,4 g/L, 2,9 g/L e 1,7 g/L (Figura 10). HACKENHAAR *et al.* (2011) obteve valores semelhantes para a levedura *K. marxianus* usando lactose a 70 g/L como fonte de carbono por 30 h, com pH 5,5 a uma temperatura de 30 °C a 400 rpm. Esses autores obtiveram biomassa de 22,19 g/L, demonstrando que a glicose é mais eficiente em produzir biomassa do que a lactose, uma vez que obtivemos, neste estudo, uma biomassa aproximada (23 g/L) utilizando mais de três vezes menos fonte de carbono.



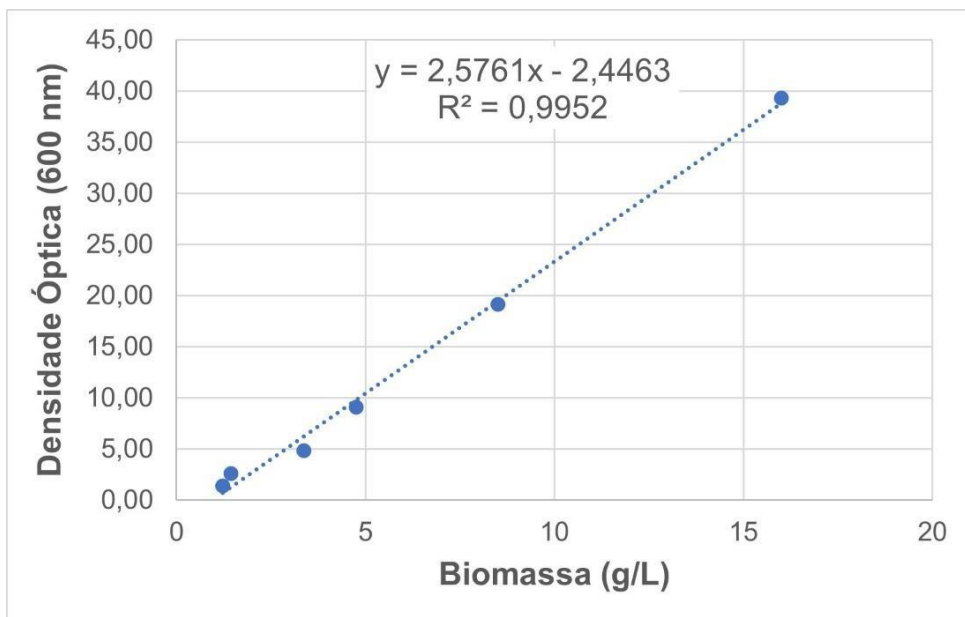
**Figura 10.** Correlação das densidades ópticas celulares e das biomassas de *K. marxianus*.

Ainda considerando as diluições 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16, as médias da DO, após as correções pelos fatores de diluição, para *K. lactis* foram 59,35, 28,80, 13,95, 8,16, 4,53 e 2,25, e as respectivas médias das biomassas secas foram 21 g/L, 11 g/L, 6,3 g/L, 3,4 g/L, 1,9 g/L e 1,2 g/L (Figura 11). As biomassas foram ligeiramente menores do que aquelas obtidas pela *K. marxianus*.



**Figura 11.** Correlação das densidades ópticas celulares e das biomassas de *K. lactis*.

As médias das DO da *S. cerevisiae* considerando as diluições 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 foram 39,3, 19,13, 9,04, 4,82, 2,55 e 1,39, respectivamente, com suas respectivas médias das biomassas 16 g/L, 8,5 g/L, 4,7 g/L, 3,4 g/L, 1,4 g/L e 1,2 g/L (Figura 12), sendo estas, as DO e biomassas mais baixas quando comparadas às outras leveduras testadas. OLIVEIRA *et al.* (2004) obtiveram valores para os fatores de conversão de substrato em biomassa; os ensaios para a determinação dos parâmetros para a fermentação ocorreram em triplicata em frascos de 250 mL com 100 mL usando como meio de cultura glicose 150 g/L; fosfato monopotássico 5,0 g/L; cloreto de amônia 1,5 g/L; sulfato de magnésio heptahidratado 1,0 g/L; cloreto de potássio 1,0 g/L e extrato de levedura 6,0 g/L (pH 6,0). Foram avaliadas 24 linhagens de *S. cerevisiae* e foram obtidas biomassas entre 0,039 e 0,072 g/g, e velocidades máximas de crescimento entre 0,45 h<sup>-1</sup> e 0,64 h<sup>-1</sup>.



**Figura 12.** Correlação das densidades ópticas celulares e das biomassas de *S. cerevisiae*.

## 5. CONCLUSÕES

Neste estudo determinaram-se as velocidades específicas e máximas de crescimento, bem como a correlação das biomassas e as densidades ópticas celulares das leveduras *K. marxianus*, *K. lactis* e *S. cerevisiae* cultivadas no meio YPD. Conclui-se que *K. marxianus* exibiu a maior velocidade máxima de crescimento e menor constante de saturação do que as demais leveduras. Essa levedura possui células menores, mais estreitas e alongadas se comparadas à *K. lactis* e *S. cerevisiae*, que apresentam células maiores e forma ovoide. Isso pode explicar por que *K. marxianus* produz maior biomassa e densidade óptica que as outras leveduras avaliadas. Uma menor constante de saturação indica que a *K. marxianus* consegue transportar a glicose para o citoplasma mais eficientemente quando esse açúcar está em concentrações menores, crescendo mais rapidamente e produzindo mais biomassa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. A. S., ROVIDA, A. F. S., PAMPHILE, J. Á. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Uningá Review**, 2015. 21, 55
- ARAÚJO, M. A. M. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.
- ASAKO, H., SHIMIZU, M., ITOH, M. Biocatalytic production of (S)-4-bromo-3-hydroxybutyrate and structurally related chemicals and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009. 84, 397–405.
- BAKKALOGLU, I., *et al.* Screening of various types biomass for removal and recovery of heavy metals (Zn, Cu, Ni) by biosorption, sedimentation and desorption. **Water Science and Technology**, 1998. 38(6):269 –77.
- BARRERA, M. F. C., BACCA, Y. A. M., BARRIOS, L. H. R. **Estructuración de una metodología para la expresión de péptidos y proteínas por medio de la levadura *Kluyveromyces lactis***. Universidad de Los Andes, Colombia, 2020.
- BARTEVICIUTE, D., SASKAUNAS, K. Disruption of the MNN10 gene enhances protein secretion in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, 2004. 4: 833–840.
- BAZZO, A.; **Aplicação e caracterização do caroço de abacate (*Persea americana mill*) como adsorvente na remoção do corante violeta cristal**. 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- BRAVO, A. G. **Clonación de los genes de la bacteriocina NC8 de *Lactobacillus plantarum* SP-50 en *Kluyveromyces lactis* GG799**. 2019. 78 f. Dissertação (Maestria En Ciencias En Ingeniería Bioquímica). Tecnológico Nacional De México, Veracruz, 2019.
- BREUER, M. *et al.* Industrial methods for the production of optically active intermediates. **Angewandte Chemie**, Int. Ed. 43, 2004, 788–824.
- CAMPOS, A. S. **Produção de 2'-fucosil-lactose em *Kluyveromyces lactis* utilizando manose como fonte de carbono**. 2020, 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2020.
- CAO, H. *et al.* Purification and characterization of a novel NADH-dependent carbonyl

reductase from *Pichia stipitis* involved in biosynthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. **Bioresource Technology**, 2010.

CARNEIRO, M. T. *et al.* Bioindicadores complementares à colimetria na análise da qualidade da água: O potencial das Leveduras no lago Juturnaíba/RJ. **Sistemas & Gestão**, 2015, 10(3), 542-552.

CHALFOUN, S. M. *et al.* **Eficiência de extrato metabólico fúngico na aceleração da desmucilagem do café**, 2017.

CHEN, X. *et al.* Expression and secretion of human interferon alpha A in yeast *Kluyveromyces lactis*. **Yi Chuan Xue Bao**, 1992, 19: 284–288.

COMITINI, F. *et al.* *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, 2004, 238, 235–240.

CRUZ, H. R. D. **Avaliação da relação C/N no desempenho da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1**. 2021, 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

DAL MAGRO, L. **Desenvolvimento de biocatalisadores compostos por pectinases e celulases imobilizadas para a clarificação de sucos de frutas**. 2020, 310 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

DANESI, E. D. G. *et al.* Effect of carbon: nitrogen ratio (C: N) and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Engineering**, 2006, 75(1), 96-103.

DAS, S., HOLLENBERG, C. P. A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Current Genetics**, 1982, 6: 123–128

DATO, A. B. A. **Clonación de una peptidasa aspártica de flores de *Arctium minus* con potencial aplicación biotecnológica en un vector de expresión del sistema GRAS *Kluyveromyces lactis***. 2018, 85 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular) Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2018.

FERRAZ, A. I., TAVARES, T., TEIXEIRA, J. A. Cr (III) **removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae***. **Chemical Engineering Journal**, 2004; 105:11–20.

- FERREIRA, I. S. **Estudo da produção de etanol a partir de glicose empregando a levedura termotolerante *kluveromyces marxianus* NRRL Y-6860**. 2014, 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- FIGUEIRÊDO, A. F. R. **Seleção de leveduras e produção de cerveja artesanal suplementada com selênio**. 2017, 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2017.
- FLEER, R. *et al.* **High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 beta in *Kluyveromyces lactis***. *Gene*, 1991a, 107: 125–295.
- FOGARTY, W. M., KELLY, C. T. **Pectic Enzymes**. *Microbial Enzymes and Biotechnology* (Fogarty, W.M., Ed.). 1983, pp. 131-182, Applied Science Publishers, London.
- FONSECA, G. G. *et al.* **The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79 339–354.
- GALINARI, E. *et al.* **Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory effects of cell wall -d-mannan fractions from *Kluyveromyces marxianus***. *International Journal of Biological Macromolecule*, 2018, 109, 837-846.
- GOKSUNGUR, Y., UREN, S., GUVENC, U. **Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass**. *Bioresource Technology*, 2005; 96:103 –9.
- GOLDBERG, K. *et al.* **Biocatalytic ketone reduction – a powerful tool for the production of chiral alcohols – part I: processes with isolated enzymes**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76, 237–248.
- GOMES, A. M. V. *et al.* **Heterologous hyaluronic acid production in *Kluyveromyces lactis***. *Microorganisms*, 2019.
- GRASSI, E. *et al.* **Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolourization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators**. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2011, 65:635-643.
- GUEDES, E. H. S. *et al.* **Produção de lipase por leveduras isoladas de frutos de palmeiras**. *Research, Society and Development*, 2020, 9(8), e394985487.
- GUERREIRO, D. J. L. M. **Produção de biofármacos pela levedura *Pichia pastoris***. 2016, 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacéuticas). Instituto Superior De Ciências Da Saúde Egas Moniz, Portugal, 2016.

GUZZON, R. *et al.* The impact of different barrel sanitation approaches on the spoilage microflora and phenols composition of wine. **Journal of Food Science and Technology**, 2017, 54 (3), 810–821.

HACKENHAAR, C. R., MARTINBIANCO, F., AYUB, M. A. Z. Estudo da cinética de crescimento das cepas de *Dekkera bruxelensis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Lactobacillus plantarum* para a obtenção de inóculo para a produção de pão “Levain”. **XXVII Salão de Iniciação Científica**, 2011.

IWATA, T. *et al.* Efficient secretion of human lysozyme from the yeast, *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, 2004, 26: 1803–1808.

KEDARI, C. S., DAS, S. K., GHOSH, S. Biosorption of long lived radionuclides using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2001;17:789–93.

LAMBRECHTS, M. G., PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma – A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, 2000, 21: 97–129.

LEITE, M. C. A. **Citral e geraniol: atividade antifúngica sobre leveduras do gênero Candida de importância hospitalar**. 2015, 84f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LIN, Z. Y. *et al.* Spectroscopic characterization of Au<sup>3+</sup> biosorption by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2005; 61:761–765.

BERGMAN, L. W. Growth and maintenance of yeast. **Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols**, 2001, pp. 9–14.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia** 2ª edição. Rio de Janeiro: Axcel Books, 2016.

MALFEITO-FERREIRA, M., SILVA, A. C. (2019). Spoilage yeasts in wine production. **Yeasts in the Production of Wine**, 2019, pp. 375-394.

MARROQUES, J. C. **Aplicação de enzimas na indústria têxtil**. 2020, 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia química) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 202.

MASSOUD, R. *et al.* Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of *Saccharomyces cerevisiae*, **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 37, p. 56-60, 2019.

- MOREIRA, C. S. *et al.* Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Ciência e Natura**, 2015, 37(3), 55-63.
- MURARI, C. S. *et al.* Bioethanol production from dairy industrial coproducts. **BioEnergy Research**, v. 11, 2018.
- MYERS, J. A., CURTIS, B. S., CURTIS, W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. **BMC Biophysics**, 2013.
- OLIVEIRA, E. *et al.* Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, p. 19-24, 2004.
- ORNELAS, A. P. R. D. C. **Atividade de  $\beta$ -galactosidase em *Kluyveromyces marxianus var. lactis* na fase de desaceleração do crescimento em soro de queijo ultrafiltrado.** 2001, 64f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- ÖZER, A., ÖZER, D. Comparative study of the biosorption of Pb (II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. **Journal of Hazardous Materials** 2003;100: 219 –29.
- PINTO, L. P. S. *et al.* O uso de probióticos para o tratamento do quadro de intolerância à lactose. **Revista Ciência & Inovação - FAM - V.2, N.1, 2015.**
- PISCITELLI, A. *et al.* Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005, 69:428–439
- QUINCOZES, L. S. (2018). **Influência de diferentes leveduras na elaboração de vinhos da cv. Riesling Itálico.** 2018, 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Enologia) Universidade Federal do Pampa, Dom Pedrito, 2018.
- ROCHA, T. L. *et al.* Expression and secretion of recombinant ovine beta-lactoglobulin in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. **Journal Biochemical**, 1996, J 313: 927–932.
- RODRIGUES, A. N., SANT’ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 2001, v.21, n.1, p. 63-66.
- ROLLER, S. *et al.* Altered fermentation performances, growth, and metabolic footprints



reveal competition for nutrients between yeast species inoculated in synthetic grape juice-like medium. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 196, 2018.

ROY, D. *et al.* Bioremediation of arsenic (III) from water using baker yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation** 2013;1(1): 14–9.

ROYER, B. **Remoção de corantes têxteis utilizando casca de semente de *Araucaria angustifolia* como biossorvente**. 2008, 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SALIM, C. *et al.* Aplicação de pectinase como coadjuvante de processo na extração de azeite de oliva. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2018, 10(2).

SAMPAIO, F. C. *et al.* (2019) Cheese Whey Permeate Fermentation by *Kluyveromyces lactis*: a Combined Approach to Wastewater Treatment and Bioethanol Production, **Environmental Technology**, v. 41, n. 24, p. 3210-3218, 2020.

SANTOS, Y. L. **Use of *Kluyveromyces lactis* in the expression of leishmania major's gdpase**. 2009, 79f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal De Viçosa, Viçosa, 2009.

SANTOS, J. R. A., GUSMÃO, N. B., GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, pp.75-80, 2010.

SANTOS, F., BORÉM, A., CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, açúcar e etanol**. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012.

SCHUMAKER, M. R. *et al.* Influence of *Brettanomyces* ethylphenols on red wine aroma evaluated by consumers in the United States and Portugal. **Food Research International**, 2017, 100, 161–167.

SILVA, K. V. D. **Potencial de aplicação de leveduras selvagens em processos de panificação**. 2020, 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2020.

SILVA, D. M. *et al.* Carboidrases em rações de frangos de corte. **PUBVET**, 2016, 10, 795-872.

SOLER, M. F. C. R. **Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras**. 2015, 119f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

SRIRAM, N., REETHA, D., SARANRAJ, P. Biological degradation of reactive dyes by using bacteria isolated from dye effluent contaminated soil. **Middle East Journal of Science Research**, 2013, 17:1695-1700.

TAVARES, B. **Estudo do desempenho fermentivo da levedura *kluveromyces marxianus* atcc 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica**. 2017, 97f . Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.

TORNAI-LEHOCZKI, J., PÉTER, G., DLAUCHY, D. CHROMagar *Candida medium* as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. **International Journal of Food Microbiology**, 2003, v.86, p.189-200.

VASUDEVAN, P., PADMAVATHY, V., DHINGRA, S. C. Kinetics of biosorption of cadmium on baker's yeast. **Bioresource Technology**, 2003;89:–7.

VOLESKY, B. 1990. Removal and recovery of heavy metals by biosorption. **Biosorption of Heavy Metals**, 1990, pp. 173–198.

WAKIL, S. M. *et al.* Decolourization of synthetic dyes by laccase enzyme produced by *Kluveromyces dobzhanskii* DW1 and *Pichia manshurica* DW2. **African Journal of Biotechnology**, 2019, 18(1), 1–11.

WHITTAKER, R. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, 1969, 163:150-160.

XIE, D. *et al.* Studies of Properties on the immobilized *Saccharomyces cerevisiae* waste biomass adsorbing Pt<sup>4+</sup>. **Journal of Xiamen University**, 2003; 42:800–804.

YAMAMOTO, H. *et al.* A novel NADH-dependent carbonyl reductase from *Kluveromyces aestuarii* and comparison of NADH-regeneration system for the synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2004, 68, 638–649.

ZHU, Y. M., ZHOU, D. Q., WEI, D. Z. Biosorption of Hg<sup>2+</sup> by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Northeastern University**, 2004; 25:89 –91.

## ANEXOS

**Tabela 1.** Densidade óptica da *Kluyveromyces lactis* em diferentes concentrações de glicose.

2,5 g/L			2,5 g/L		
Tempo	DO600	LnDO	Tempo	DO600	LnDO
2	0,2850	-1,255	2	0,2140	-1,5418
3	0,4050	-0,904	3	0,3080	-1,1777
4	0,6020	-0,507	4	0,4330	-0,837
5	0,8380	-0,177	5	0,6170	-0,4829
6	1,3860	0,326	6	1,0680	0,0658

5,0 g/L			5,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO	Tempo	DO600	LnDO
2	0,2640	-1,332	2	0,2090	-1,5654
3	0,3950	-0,929	3	0,2890	-1,2413
4	0,5910	-0,526	4	0,4200	-0,8675
5	0,8510	-0,161	5	0,6210	-0,4764
6	1,4860	0,396	6	1,0960	0,0917

10,0 g/L			10,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO	Tempo	DO600	LnDO
2	0,2720	-1,302	2	0,2110	-1,5559
3	0,3920	-0,936	3	0,2910	-1,2344
4	0,5790	-0,546	4	0,4270	-0,851
5	0,8570	-0,154	5	0,6630	-0,411
6	1,5740	0,454	6	1,2280	0,2054

20,0 g/L			20,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO	Tempo	DO600	LnDO
2	0,2770	-1,284	2	0,2030	-1,5945
3	0,3910	-0,939	3	0,2870	-1,2483
4	0,5850	-0,536	4	0,4200	-0,8675
5	0,8770	-0,131	5	0,6630	-0,411
6	1,6340	0,491	6	1,2620	0,2327

**Tabela 2.** Densidades ópticas da *Kluyveromyces marxianus* em diferentes concentrações de glicose.

2,5 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2600	-1,347
3	0,4020	-0,911
4	0,6740	-0,395
5	1,4960	0,403
6	3,4100	1,227

2,5 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2550	-1,3665
3	0,4110	-0,8892
4	0,6980	-0,3595
5	1,5200	0,4187
6	3,4200	1,2296

5,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2410	-1,423
3	0,3930	-0,934
4	0,6800	-0,386
5	1,5000	0,405
6	3,6000	1,281

5,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2500	-1,3863
3	0,4110	-0,8892
4	0,6950	-0,3638
5	1,5420	0,4331
6	3,6300	1,2892

10,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2500	-1,386
3	0,4110	-0,889
4	0,7000	-0,357
5	1,5580	0,443
6	3,7200	1,314

10,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2580	-1,3548
3	0,4180	-0,8723
4	0,7120	-0,3397
5	1,5580	0,4434
6	3,9400	1,3712

20,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2500	-1,386
3	0,4150	-0,879
4	0,7200	-0,329
5	1,6000	0,47
6	4,0500	1,399

20,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2540	-1,3704
3	0,4200	-0,8675
4	0,7180	-0,3313
5	1,6400	0,4947
6	4,0000	1,3863

**Tabela 3.** Densidades ópticas da *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes concentrações de glicose.

2,5 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2500	-1,386
3	0,3330	-1,1
4	0,4950	-0,703
5	0,7290	-0,316
6	1,2000	0,182

2,5 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2270	-1,4828
3	0,3000	-1,204
4	0,4420	-0,8164
5	0,6410	-0,4447
6	1,0640	0,062

5,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2350	-1,448
3	0,3330	-1,1
4	0,5000	-0,693
5	0,7510	-0,286
6	1,3500	0,3

5,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2170	-1,5279
3	0,2760	-1,2874
4	0,4360	-0,8301
5	0,6470	-0,4354
6	1,1940	0,1773

10,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2300	-1,47
3	0,3430	-1,07
4	0,5200	-0,654
5	0,7860	-0,241
6	1,4300	0,358

10,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2230	-1,5006
3	0,2810	-1,2694
4	0,4690	-0,7572
5	0,7310	-0,3133
6	1,3480	0,2986

20,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2350	-1,448
3	0,3490	-1,053
4	0,5370	-0,622
5	0,8110	-0,209
6	1,5180	0,417

20,0 g/L		
Tempo	DO600	LnDO
2	0,2230	-1,5006
3	0,3120	-1,1648
4	0,4610	-0,7744
5	0,7500	-0,2877
6	1,4420	0,366