

## CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL EM MEIOS CONTENDO GLICOSE, XILOSE E CELOBIOSE

VIVIANI TADIOTO<sup>1,2</sup>, CAROLINE MÜLLER<sup>2,3</sup>, BORIS U. STAMBUK<sup>4</sup>,  
HELEN TREICHEL<sup>5</sup>, SÉRGIO L. ALVES JR.<sup>2,6</sup>

### 1 INTRODUÇÃO

Biorrefinarias de segunda-geração utilizam resíduos lignocelulósicos como matéria-prima, e seu processo produtivo depende da hidrólise dessas biomassas ricas em celulose e hemicelulose. Como resultado dessa hidrólise, são obtidos majoritariamente os monossacarídeos glicose e xilose e o dissacarídeo celobiose, sendo este último presente em proporção pelo menos cinco vezes menor em relação aos dois monossacarídeos citados. Além disso, inibidores do metabolismo fermentativo (como furfural, ácido fórmico e, predominantemente, ácido acético) também resultam do pré-tratamento e hidrólise prévios à fermentação. Devido à presença desses compostos, torna-se necessária a seleção de leveduras tolerantes a seus efeitos tóxicos, para garantir eficiência ao processo (BONATTO *et al.*, 2020; MONCADA; TAMAYO; CARDONA, 2014; MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020).

Nas biorrefinarias, o xilitol e o etanol 2G são dois dos produtos predominantemente avaliados na literatura. Enquanto a glicose e a celobiose podem ser utilizadas pelas leveduras empregadas no processo por meio de fermentação alcoólica, a xilose pode ser tanto destinada à produção do biocombustível quanto do açúcar-álcool em questão. O acúmulo de xilitol nos meios industriais que contêm xilose decorre de um desbalanço redox entre as duas primeiras enzimas envolvidas no metabolismo da referida pentose, que dependem diferentemente das coenzimas NADPH/NADP<sup>+</sup> e NAD<sup>+</sup>/NADH (ELIODÓRIO *et al.*, 2019). Contudo, haja vista suas inúmeras aplicações, especialmente na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos, a obtenção do xilitol tornou-se extremamente desejável, sendo este um dos

<sup>1</sup> Estudante do curso de graduação em Eng. Ambiental e Sanitária, *Campus* Chapecó, UFFS. Bolsista PRO-ICT, Edital nº 270/GR/UFFS/2020.

<sup>2</sup> Laboratório de Bioquímica e Genética, *Campus* Chapecó, UFFS.

<sup>3</sup> Doutora, Bolsista PNP/CAPEs do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, *Campus* Erechim, UFFS.

<sup>4</sup> Professor doutor, Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras, Depto. de Bioquímica, CCB/UFSC.

<sup>5</sup> Professora doutora, Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, *Campus* Erechim, UFFS.

<sup>6</sup> Orientador. Professor doutor.

Subprojeto: Caracterização de celobioses, celulasas e xilanasas expressas por leveduras isoladas do intestino de lagartas.

produtos de maior valor agregado em biorrefinarias (ANTUNES *et al.*, 2021).

## 2 OBJETIVOS

Com vistas à otimização da produção simultânea de xilitol e etanol em biorrefinarias de segunda-geração, este trabalho avaliou as melhores condições de cultivo e o desempenho fermentativo de três leveduras em meios de cultura sintéticos contendo os carboidratos e os inibidores de fermentação majoritariamente encontrados em hidrolisados lignocelulósicos.

## 3 METODOLOGIA

A levedura selvagem *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2, previamente isolada por este grupo de pesquisa a partir de amostras de matéria vegetal em decomposição (BAZOTI *et al.*, 2017), e duas linhagens de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, PE-2 e JDY-01 (BASSO *et al.*, 2008; DEOTI, 2017), foram cultivadas a 30°C, 150 rpm, em frascos Erlenmeyer com 1/5 de seu volume preenchido com meios de cultura líquidos compostos de 6,7 g/L de base nitrogenada de leveduras (YNB), 1,0 g/L de furfural, 0,5 g/L de ácido fórmico e diferentes valores de pH e concentrações de carboidratos (glicose, xilose e celobiose) e ácido acético, conforme a matriz de Delineamento Composto Central (DCC) da tabela 1.

O DCC foi montado e analisado com o *software* Protimiza (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Na tabela 1, a coluna “açúcares totais” representa a combinação dos três carboidratos analisados: 40 g/L de glicose, 40 g/L de xilose e 8 g/L de celobiose (88 g/L total); 25 g/L de glicose, 25 g/L de xilose e 5 g/L de celobiose (55 g/L total); e 10 g/L de glicose, 10 g/L de xilose e 2 g/L de celobiose (22 g/L total). Após 48 h de cultivo, a biomassa celular foi determinada pela densidade óptica em 570 nm. Os açúcares remanescentes e a concentração de xilitol e etanol produzidos foram determinados por HPLC (BARRILLI *et al.*, 2020).

**Tabela 1.** Matriz de DCC com a combinação das variáveis açúcares totais, pH e ácido acético em 11 ensaios, sendo os três últimos triplicatas do ponto central.

Ensaio	Açúcares totais (g/L)	pH	Ácido acético (g/L)
1	22.0	2.0	0.0
2	88.0	2.0	0.0
3	22.0	8.0	0.0
4	88.0	8.0	0.0
5	22.0	2.0	5.0
6	88.0	2.0	5.0
7	22.0	8.0	5.0
8	88.0	8.0	5.0
9	55.0	5.0	2.5
10	55.0	5.0	2.5
11	55.0	5.0	2.5

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o DCC demonstram que a levedura selvagem, no que concerne o consumo de celobiose, apresenta ampla vantagem em relação às duas linhagens de *S. cerevisiae* analisadas (Tabela 2). De fato, a literatura aponta que esta espécie carece de  $\beta$ -glicosidases periplasmáticas capazes de hidrolisar este dissacarídeo ou transportadores aptos a internalizá-lo, inviabilizando assim o seu metabolismo (ELIODÓRIO *et al.*, 2019).

**Tabela 2.** Biomassa celular, consumo de açúcares e produção de xilitol e etanol após 48 h de cultivo com as cepas UFFS-CE-3.1.2, PE-2 e JDY-01, conforme DCC descrito na metodologia.

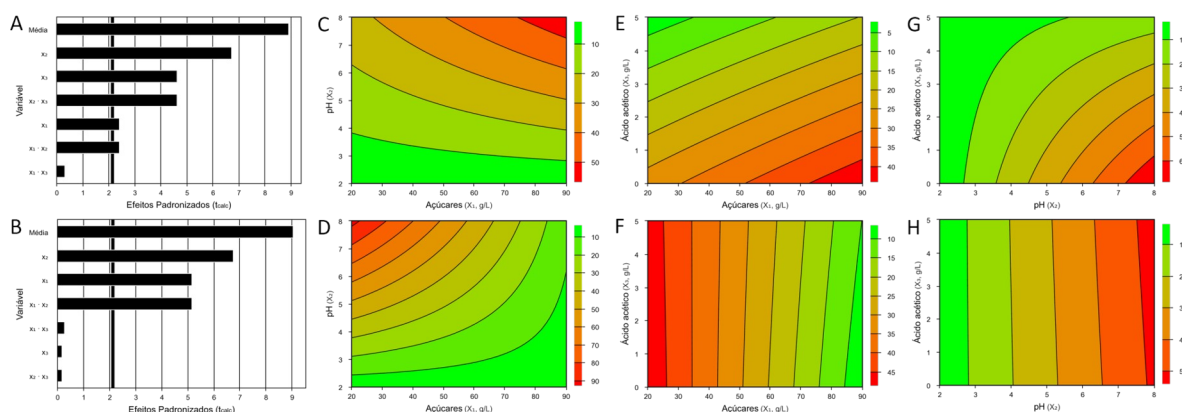
UFFS-CE-3.1.2								
Ensaio	Biomassa celular <sup>a</sup>	Consumo de açúcares <sup>c</sup>			Xilitol		Etanol	
		Glicose	Xilose	Celobiose	Produção <sup>a</sup>	Rendimento <sup>b</sup>	Produção <sup>a</sup>	Rendimento <sup>b</sup>
1	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	15.55	100.00	88.07	100.00	0.51	50.50	0.00	0.00
4	12.63	100.00	19.91	7.71	3.29	82.15	8.97	101.93
5	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	24.65	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	12.33	100.00	18.20	14.42	0.98	24.55	9.69	110.16
9	18.08	100.00	38.97	61.13	0.58	23.00	3.38	61.38
10	19.18	100.00	42.21	68.67	0.75	29.92	3.59	65.23
11	18.73	100.00	40.20	69.75	0.87	34.66	4.57	83.01
PE-2								
1	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	7.10	100.00	13.49	0.00	0.88	87.85	0.00	0.00
4	4.00	100.00	0.00	0.00	0.33	8.29	11.24	127.72
5	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	7.83	100.00	16.93	0.00	0.86	86.20	0.00	0.00
8	13.78	100.00	7.33	0.00	0.59	14.84	10.99	124.89
9	22.20	100.00	1.19	0.00	1.08	43.16	3.87	70.30
10	5.90	100.00	5.15	0.91	0.85	34.18	4.16	75.68
11	6.23	100.00	1.42	0.00	0.90	35.84	4.41	80.26
JDY-01								
1	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	9.48	100.00	81.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	7.30	100.00	47.63	0.00	0.00	0.00	15.13	171.89
5	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	16.18	100.00	100.00	76.84	0.00	0.00	1.76	79.77
8	26.18	100.00	28.35	0.00	0.00	0.00	14.76	167.74
9	13.00	100.00	89.68	0.00	0.00	0.00	10.14	184.30
10	13.03	100.00	87.51	4.68	0.00	0.00	9.38	170.57
11	12.23	100.00	87.63	0.00	0.00	0.00	10.50	190.88

<sup>a</sup> Os valores apresentados estão em g/L.

<sup>b</sup> Os valores estão em mg/g e representam o coeficiente entre a quantidade de produto obtido e o total de açúcares disponíveis inicialmente. No caso do xilitol, apenas a quantidade de xilose foi considerada.

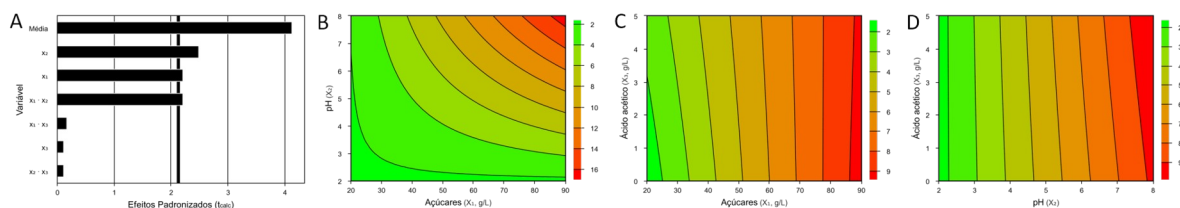
<sup>c</sup> Os valores representam o percentual (%) de açúcar consumido em relação ao total disponibilizado.

O crescimento celular e o consumo de glicose ocorreram em proporções semelhantes para as três cepas, enquanto a xilose foi mais consumida pela cepa JDY-01. As duas cepas que menos produziram etanol, UFFS-CE-3.1.2 e PE-2, acumularam xilitol no meio de cultura a partir da xilose consumida pelas células, porém com um volume até três superior para a UFFS-CE-3.1.2 (Tabela 2). Considerando um nível de significância de 10%, o rendimento desse produto pela UFFS-CE-3.1.2 foi significativamente influenciado pelas três variáveis analisadas, enquanto o desempenho da PE-2 não foi afetado significativamente pelo ácido acético (Figura 1). Para ambas as cepas, o  $t$  calculado foi positivo para o pH, sugerindo que os valores mais altos favoreceram o rendimento de xilitol. Contudo, em relação à concentração de açúcar, enquanto para a cepa selvagem o  $t$  calculado foi positivo, indicando que o aumento na concentração da fonte de carbono proporcionou aumento de rendimento de xilitol, para a cepa industrial PE-2, o  $t$  calculado foi negativo (mais açúcar, menor rendimento) (Figura 1).



**Figura 1.** Gráficos de Pareto (A,B) e superfícies de resposta (C–H) para o rendimento de glicerol observado nos ensaios das cepas UFFS-CE-3.1.2 (A,C,E,G) e PE-2 (B,D,F,H). As superfícies de resposta comparam pH x concentração de açúcares (C,D), ácido acético x concentração de açúcares (E,F) e ácido acético x pH (G,H). O gradiente do verde ao vermelho representa ganho de rendimento.

Em contrapartida, a cepa JDY-01, cujo genoma foi engenheirado (a partir da parental PE-2) para evitar o desbalanço redox entre as duas primeiras reações do metabolismo da xilose (DEOTI, 2017), não acumulou xilitol e utilizou a pentose disponível no meio de cultura como fonte de carbono para crescimento celular e fermentação alcoólica. Nesse sentido, cabe destacar a influência significativa ( $\alpha=10\%$ ) positiva das variáveis concentração de açúcares e pH. É interessante notar que a presença de ácido acético não afetou significativamente (de forma negativa) o desempenho dessa linhagem (Figura 2). De fato, uma das modificações realizadas na construção dessa levedura — a sobre-expressão do gene *TAL1* — já foi reportada como benéfica para a tolerância a ácidos fracos (LI *et al.*, 2014).



**Figura 2.** - Gráfico de Pareto (A) e superfícies de resposta (B–D) para a produção de etanol observada nos ensaios da cepa JDY-01. As superfícies de resposta comparam pH x concentração de açúcares (B), ácido acético x concentração de açúcares (C) e ácido acético x pH (D).

## 5 CONCLUSÃO

A cepa selvagem UFFS-CE-3.1.2 apresentou maior potencial de produção de xilitol, e a cepa engenheirada JDY-01, o melhor desempenho quanto à produção de etanol. Para ambas, maiores valores de pH e açúcares foram favoráveis para seus produtos gerados. Embora o ácido acético não tenha tido efeito sobre a performance da JDY-01, o rendimento de xilitol obtido pela UFFS-CE-3.1.2 foi superior nas concentrações mais baixas do referido inibidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, F. A. F. *et al.* Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. **Renewable Energy**, v. 163, p. 1343–1355, 2021.
- BARRILLI, É. T. *et al.* Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 7, p. 1729–1739, 2020.
- BASSO, L. C. *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BAZOTI, S. F. *et al.* Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, 2017.
- BONATTO, C. *et al.* Biomass to bioenergy research: current and future trends for biofuels. *In: RECENT DEVELOPMENTS IN BIOENERGY RESEARCH*: Elsevier, 2020. p. 1–17.
- DEOTI, J. R. **Avaliação da tolerância a ácidos carboxílicos inibidores de fermentação por leveduras assimiladoras de pentoses**. Dissertação de mestrado, 2017. [www.repositorio.ufsc.br/handle/123456789/188974](http://www.repositorio.ufsc.br/handle/123456789/188974).
- ELIODÓRIO, K. P. *et al.* Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. *In: ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY*: Academic Press Inc., 2019. v. 109, p. 61–119.
- LI, Y.-C. *et al.* Synergistic effects of TAL1 over-expression and PHO13 deletion on the weak acid inhibition of xylose fermentation by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 10, p. 2011–2021, 2014.
- MONCADA, J.; TAMAYO, J. A.; CARDONA, C. A. Integrating first, second, and third generation biorefineries: Incorporating microalgae into the sugarcane biorefinery. **Chemical Engineering Science**, v. 118, p. 126–140, 2014.
- MORALES-OYERVIDES, L. *et al.* Medium design from corncob hydrolyzate for pigment production by *Talaromyces atrovirens* GH2: Kinetics modeling and pigments characterization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107698, 2020.
- RODRIGUES, M. A.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization, first edn.** CRC Press. 1st. ed.: CRC Press, 2014.

**Palavras-chave:** *Wickerhamomyces* sp.; *Saccharomyces cerevisiae*; biorrefinaria.

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES-2020-0213.

**Financiamento:** UFFS