

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LEVEDURAS DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM DECOMPOSIÇÃO NO OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA

ÉVELYN TAIZE BARRILLI^{1*}, ADRIANA CECÍLIA ZANCHET¹, LUCIENE RODRIGUES ADORNO¹, YUARÃ MIGNONI¹, SÉRGIO LUIZ ALVES JÚNIOR¹

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó, Curso de Engenharia Ambiental

*Autor para correspondência: Évelyn Taize Barrilli (evelyntaize_b@hotmail.com)

1 Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor de álcool combustível do mundo. O etanol atualmente produzido em nosso país (chamado de etanol de primeira geração) é proveniente da fermentação do caldo de cana-de-açúcar e do melaço, substratos ricos em sacarose, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Como subproduto dessa produção, obtêm-se cerca de 150 milhões de toneladas de bagaço de cana anualmente, algo que pode ser também utilizado na produção de etanol (nesse caso, chamado de etanol de segunda geração, etanol 2G ou etanol lignocelulósico), tendo em vista os carboidratos presentes nessa biomassa lignocelulósica.

Contudo, a levedura *S. cerevisiae*, embora seja o microrganismo melhor adaptado à indústria sucroalcooleira, é incapaz de fermentar significativa parcela dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica, entre eles o polissacarídeo xilana e o monossacarídeo que o constitui, a xilose (STAMBUK et al, 2008). Em vista dessa incapacidade da levedura *S. cerevisiae*, a presente pesquisa se propôs a analisar outras espécies, isoladas de matéria vegetal em decomposição, no intuito de verificar suas capacidades fermentativas diante da xilose e assim contribuir para o aperfeiçoamento da produção de etanol 2G.

2 Objetivo

Caracterizar os perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol de leveduras isoladas de biomassa lignocelulósica em decomposição.

3 Metodologia

Conforme protocolo descrito por Cadete et al. (2009), realizou-se o isolamento das linhagens a partir de amostras de biomassa em decomposição. Após o isolamento, submeteu-se as linhagens escolhidas a um pré-cultivo de 48 h antes de serem inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo 1/5 do volume de meio líquido sintético mínimo (0,67% de base nitrogenada e alternadamente 2% de glicose ou xilose como fontes de carbono, pH 5), sendo a cultura incubada em um agitador a 28°C e 145±10 rpm. Em tempos pré-determinados ao longo do cultivo, retirou-se amostras para a determinação do crescimento celular por espectrofotometria a 570 nm (DO_{570nm}) e para a determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol, conforme descrito abaixo.

A dosagem de xilose e glicose consumidas durante os crescimentos celulares foi realizada através de adaptações para microplacas do método colorimétrico de DNS para detecção de açúcares redutores (MILLER, 1959). A partir das mesmas alíquotas dos crescimentos celulares, quantificou-se também a produção de etanol por método enzimático colorimétrico, conforme protocolo adaptado de Rodionov et al. (2002).

4 Resultados e Discussão

No intuito de selecionar linhagens que pudessem contribuir para a viabilização da produção de etanol de segunda geração, o presente trabalho se propôs a analisar, em leveduras que foram isoladas de biomassa lignocelulósica em decomposição, seus perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol. Para isso, isolou-se 44 novas cepas a partir de amostras de material lignocelulósico em decomposição coletadas na Floresta Nacional de Chapecó (FLONA-Chapecó). Dessas últimas linhagens isoladas, trabalhou-se com as cepas CHAP-018 e CHAP-025. Além disso, analisou-se também outras três cepas da coleção deste grupo de pesquisa, previamente isoladas de amostras coletadas na FLONA-Chapecó e no *Campus* Chapecó da UFFS (FLONA-CE-3.4, UFFS-CE-3.6 e UFFS-CE-3.2.1).

O crescimento celular foi analisado nas cinco linhagens crescidas em meios com glicose ou xilose como fonte de carbono. As cinco linhagens foram capazes de metabolizar ambos os açúcares, embora tenham apresentado velocidades de crescimento e consumo de açúcares distintas (Fig. 1 e Fig. 2). Apesar de nenhuma das cinco linhagens ter sido capaz de fermentar a xilose (Fig. 2C), somente a cepa CHAP-025, dentre as cepas testadas, foi incapaz

de produzir etanol a partir da glicose como fonte de carbono (Fig. 1C). Vale ressaltar que as linhagens FLONA-CE-3.4 e UFFS-CE-3.1.2 se destacaram por produzir, respectivamente, cerca de 6 e 7 g/L de etanol quando cultivadas em glicose (Fig. 1C). Tendo em vista que o máximo teórico, tomando como base os 20 g/L de açúcar disponibilizados, seria de aproximadamente 10 g/L de etanol (HAMELINCK et al. 2005), é notavelmente satisfatório o rendimento fermentativo das cepas FLONA-CE-3.4 e UFFS-CE-3.1.2 utilizando a glicose como fonte de carbono, haja vista as condições de crescimento a que as células foram submetidas (aerobiose e meio sintético mínimo).

5 Conclusão

Embora tenham apresentado, diante da xilose, metabolismo respiratório em vez de fermentativo, quatro das cinco linhagens testadas consumiram por completo essa pentose durante o tempo de cultivo, o que se mostra como um diferencial em relação a cepas de *S. cerevisiae*. Além disso, apenas uma das linhagens analisadas deixou de fermentar a glicose, monossacarídeo também presente em grande quantidade nos hidrolisados de biomassa lignocelulósica (neste caso, proveniente especialmente da quebra da celulose, em vez da xilana, como é o caso da xilose). Assim sendo, os resultados obtidos demonstram que o isolamento de leveduras de biomassa vegetal em decomposição pode servir de alternativa na busca por microrganismos que contribuam para a otimização da produção de etanol de segunda geração.

Figura 1. Perfis de crescimento celular (A), consumo de glicose (B) e produção de etanol (C) das linhagens UFFS-CE-3.6 (■), FLONA-CE-3.4 (◆), UFFS-CE-3.1.2 (▲), CHAP-018 (●) e CHAP-025 (⋈) em meios sintéticos mínimos contendo 2% de glicose.

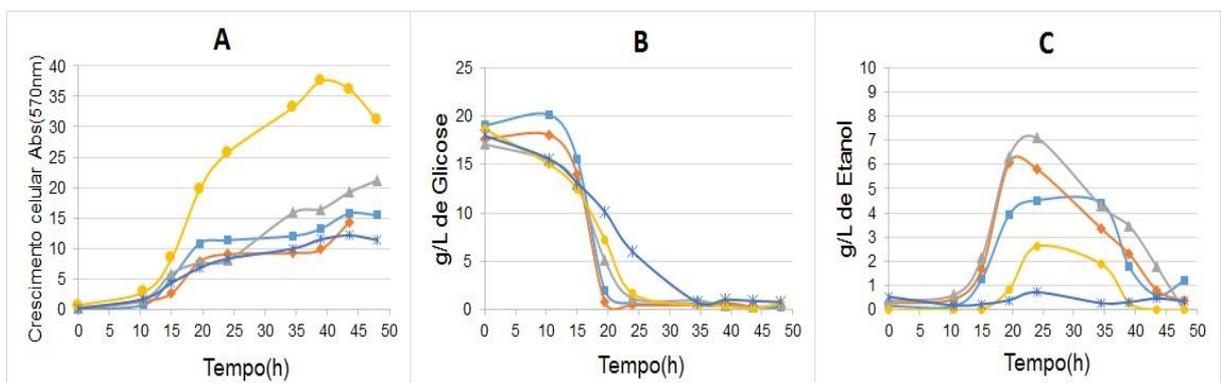
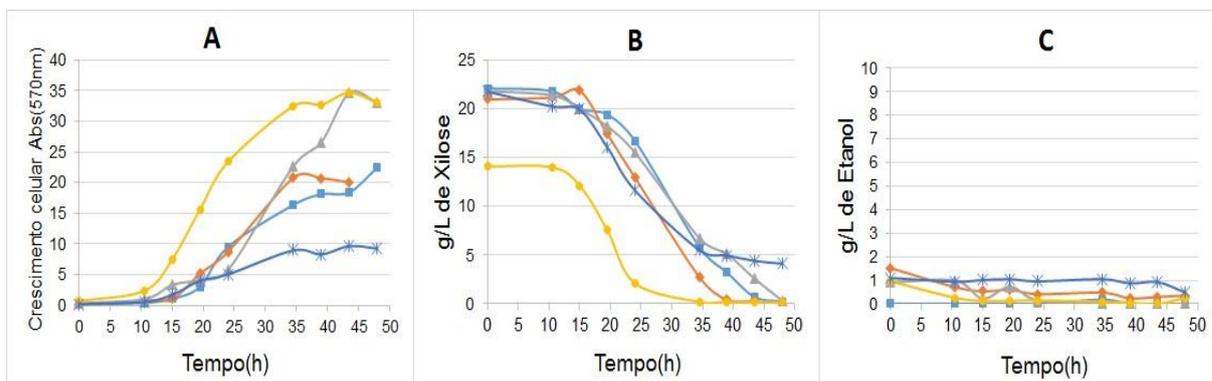


Figura 2. Perfis de crescimento celular (A), consumo de xilose (B) e produção de etanol (C) das linhagens UFFS-CE-3.6 (■), FLONA-CE-3.4 (◆), UFFS-CE-3.1.2 (▲), CHAP-018 (●) e CHAP-025 (⋈) em meios sintéticos mínimos contendo 2% de xilose.



Palavras-chave: Etanol 2g; Fermentação; Glicose; Xilose; Leveduras.

Fonte de Financiamento

CNPq (Edital MCTI/CNPq/Universal 14/2014) e UFFS (PRO-ICT – Edital 281/UFFS/2015)

Referências

CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A, GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M-A; ROSA, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res.** v. 9, p. 1-5, 2009.

HAMELINCK, C.N.; VAN HOOIJDONK, G; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy.** v. 28, p. 384-410, 2005.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry.** v. 31, p. 426-429, 1959.

RODIONOV, Y.V.; KEPPEN, O.I.; SUKHACHEVA, M.V. A photometric assay for ethanol. **Appl. Biochem. Microbiol.** v. 38, p. 395-396, 2002.

STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; FLOREZ-PARDO, L.M.; SOUTO-MAIOR, A.M.; BON, E.P.S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **J. Sci. Ind. Res.** v. 67, p. 918-926, 2008.

Dados adicionais

E.T. Barrilli é bolsista PRO-ICT, Edital 281/UFFS/2015, Processo 23205.001728/2015-42.