

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LEVEDURAS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE MILHO

ÉVELYN T. BARRILLI^{1,2*}, LETICIA M. MILANI^{1,2}, VIVIANI TADIOTO^{1,2},
JOÃO P. BENDER^{1,2}, SÉRGIO L. ALVES JR.^{1,2}

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó; ²Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos; *Autor para correspondência: Évelyn Taize Barrilli (evelyntaize_b@hotmail.com).

1 Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol combustível no mundo. O etanol atualmente produzido em nosso país é proveniente da fermentação do caldo de cana-de-açúcar e do melaço, substratos ricos em sacarose, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, a produção brasileira poderia ser aumentada ainda mais com a viabilização do uso de resíduos lignocelulósicos (STAMBUK et al., 2008). Segundo estimativas do IBGE, em 2015 foram gerados cerca de 55 milhões de toneladas de resíduos da colheita de milho no país, sendo esta, então, uma biomassa em destaque para fins energéticos, em especial, na produção de etanol.

No entanto, se faz necessária a otimização do processo fermentativo, que depende de uma levedura capaz de metabolizar os açúcares provindos da hidrólise dos resíduos lignocelulósicos do milho, para garantir a produção do chamado etanol de segunda geração.

2 Objetivos

- Isolar leveduras a partir de amostras de biomassa de milho em decomposição;
- Caracterizar bioquimicamente as leveduras isoladas através da utilização de meios de cultura com as seguintes fontes de carbono separadas: glicose, xilose e celobiose.

3 Metodologia

O isolamento das linhagens ocorreu conforme protocolo descrito por Cadete et al. (2009), a partir de amostras de palha e caule residuais da produção de milho. 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, xilose ou celobiose como

fontes de carbono, pH 5). As culturas, então, foram incubadas em agitador a 25°C e 145 ± 10 rpm durante 48 h adicionais. Em tempos pré-determinados, retirou-se amostras para a determinação do crescimento celular por espectrofotometria a 570 nm (DO_{570nm}) e para determinação do consumo de açúcares e de produção etanol.

A dosagem dos açúcares consumidos durante os crescimentos celulares foi realizada através do método de DNS em microplacas desenvolvido por Santos et al. (2017). A dosagem da produção de etanol ocorreu a partir das mesmas alíquotas via HPLC (detector RID-10A, coluna C18, 4min40seg de retenção, H₃PO₄ 0,1% como fase móvel e temperatura de 40°C).

4 Resultados e Discussão

A partir de amostras de caule e palha de milho em decomposição, coletadas na área experimental da UFFS (*Campus Chapecó*), foram isoladas 26 linhagens de leveduras. Os códigos das linhagens seguem numeração da coleção deste grupo de pesquisa. Desse montante, foram escolhidas inicialmente seis cepas para a análise de perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol, conforme apresentado nas Figuras 1 a 3.

Na Figura 1 encontram-se os dados das seis linhagens em meios contendo glicose. O crescimento celular (Figura 1A) mostrou-se muito semelhante para todas as cepas analisadas. A fase *lag* durou em média 10 h, até que a glicose começasse a ser consumida (Figura 1B). Em 15 a 20 h de cultivo, quando findada a glicose, constatou-se produção de etanol por todas as cepas, com destaque para os 2,5 g.L⁻¹ produzidos pela CHAP-108 (Figura 1C).

Já nas Figuras 2 e 3, os dados demonstram que as cepas são capazes de metabolizar tanto xilose quanto celobiose, porém com fase *lag* mais longa (15 a 20 h até o início da fase exponencial de crescimento) do que a observada em glicose. Ainda se verifica, nas Figuras 2B e 3B, que, ao fim do crescimento celular, praticamente todo o carboidrato disponibilizado foi consumido. No entanto, esse metabolismo se mostrou essencialmente respiratório, haja vista a ausência de produção de etanol a partir dessas fontes de carbono (Figuras 2C e 3C).

Assim sendo, a velocidade maior de consumo enfatiza a preferência das linhagens pela glicose, como também verificado por Santos et al. (2011). Embora não tenha ocorrido fermentação de xilose e celobiose, os resultados são positivos, pois esses açúcares efetivamente foram metabolizados pelas leveduras testadas, o que não ocorre em *S. cerevisiae* (STAMBUK et al., 2008). O metabolismo respiratório pode ser explicado pela influência da aeração e pela fonte de nitrogênio empregada nos meios de cultura (HANDE et al., 2013).

5 Conclusão

Embora não tenham fermentado a xilose e a celobiose, as seis linhagens analisadas foram capazes de assimilar esses dois carboidratos, demonstrando, assim, possuir as enzimas necessárias à metabolização de ambos açúcares. Assim sendo, as linhagens caracterizadas apresentam potencial para contribuir para a produção de etanol de segunda geração.

Figura 1. Perfis de crescimento celular (A), consumo de glicose (B) e produção de etanol (C) das linhagens CHAP-083 (●), CHAP-085 (■), CHAP-088 (▲), CHAP-091 (⌘), CHAP-097 (×) e CHAP-108 (◆) em meios sintéticos mínimos contendo 2% de glicose.

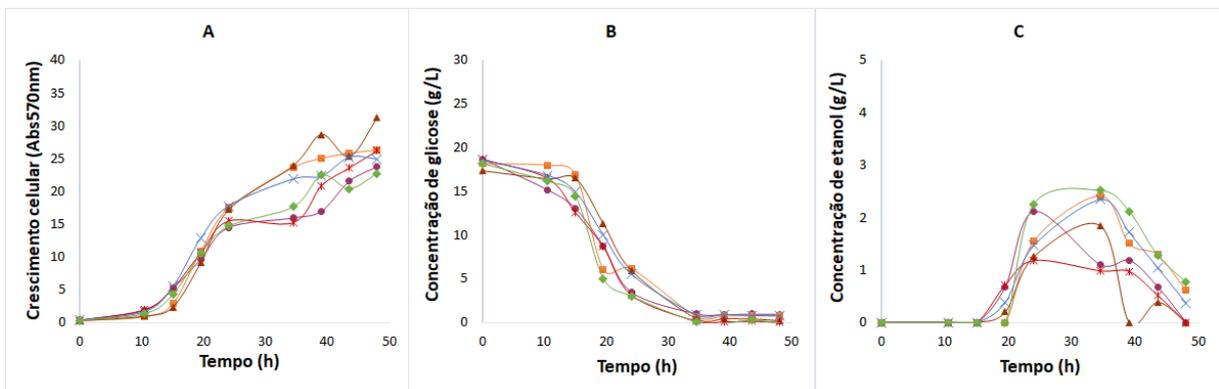


Figura 2. Perfis de crescimento celular (A), consumo de xilose (B) e produção de etanol (C) das linhagens CHAP-083 (●), CHAP-085 (■), CHAP-088 (▲), CHAP-091 (⌘), CHAP-097 (×) e CHAP-108 (◆) em meios sintéticos mínimos contendo 2% de xilose.

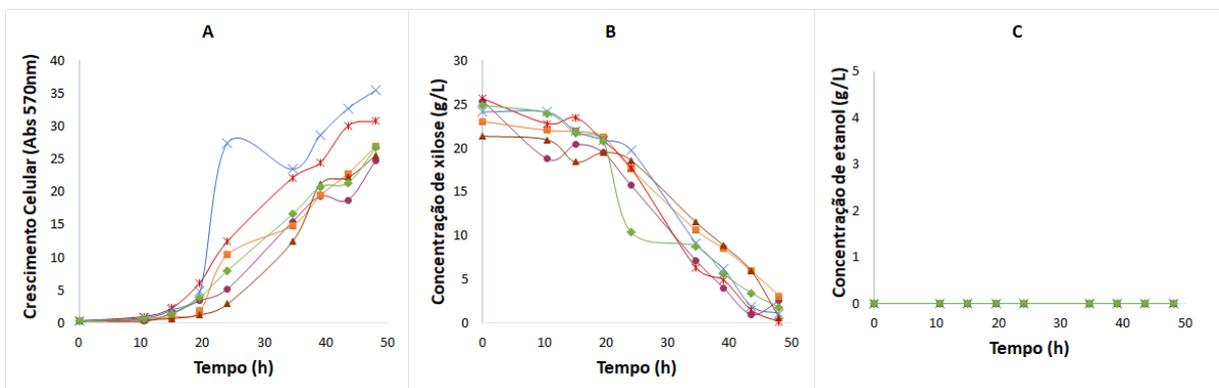
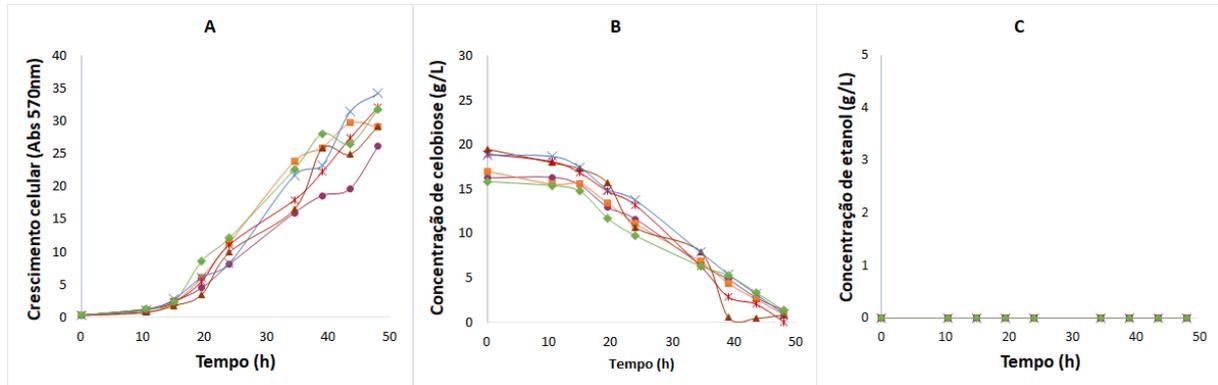


Figura 3. Perfis de crescimento celular (A), consumo de celobiose (B) e produção de etanol (C) das linhagens CHAP-083 (●), CHAP-085 (■), CHAP-088 (▲), CHAP-091 (⌘), CHAP-097 (⌘) e CHAP-108 (◆) em meios sintéticos mínimos contendo 2% de celobiose.



Referências

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 9, p. 1338-1342, 2009.

HANDE, A. et al. Evaluation of ethanol production by a new isolate of yeast during fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Ann. Microbiol.**, v. 63, p 63-70, 2013.

SANTOS, A. A. et al. Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. **Braz. J. Food Technol.**, v. 20, p. e2015113, 2017.

SANTOS, R. O. et al. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 635-642, 2011.

STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **J. Sci. Ind. Res.** v. 67, p. 918-926, 2008.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração, fermentação, glicose, xilose, celobiose.

Fonte de Financiamento: CNPq (Processo 454215/2014-02) e FAPESC (Edital 07/2015 – título: Pré-tratamento, hidrólise e fermentação de biomassa lignocelulósica de milho).