

ANÁLISE DA TOLERÂNCIA DE LEVEDURAS DECOMpositoras DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA FRENTE A ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ETANOL E A VARIAÇÕES DE pH DO MEIO

ADRIANA CECÍLIA ZANCHET^{1*}, ÉVELYN TAIZE BARRILLI¹, LETÍCIA MARA MILANI¹, VIVIANE TADIOTO¹, SÉRGIO LUIZ ALVES JÚNIOR¹

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

*Autor para correspondência: Adriana Cecília Zanchet (zanchet.adriana@gmail.com).

1 Introdução

O etanol produzido no Brasil é oriundo do processo da fermentação da sacarose, açúcar majoritário no caldo da cana-de-açúcar. Contudo, tanto o bagaço quanto a palha proveniente dessa matéria-prima (biomassa lignocelulósica) possuem uma grande quantidade de açúcares fermentáveis, mas que não são utilizados na fermentação de etanol de primeira geração. Esse material, portanto, poderia promover um aumento na quantidade de etanol obtida sem aumentar a área de cana plantada (GONÇALVES et al., 2005). Para isso, é preciso ampliar o número de pesquisas que contribuam com a otimização dessa produção de etanol, chamado de segunda geração. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (principal espécie utilizada na produção do etanol de primeira geração) apresenta boa tolerância às condições de estresse das dornas de fermentação em escala industrial (LANDRY et al., 2006), contudo é incapaz de fermentar uma parcela dos carboidratos encontrados na biomassa lignocelulósica. Modificações genéticas seriam, assim, necessárias para seu uso na produção do etanol de segunda geração (STAMBUK et al., 2008). Desse modo, a alternativa que se tem à engenharia genética passa a ser a seleção de outras leveduras que possam apresentar performances similares a *S. cerevisiae*.

2 Objetivo

O trabalho se propôs a analisar, em leveduras isoladas de ambientes naturais, seus níveis de tolerância a fatores de estresse similares aos encontrados na indústria sucroalcooleira durante a produção do álcool combustível.

3 Metodologia

Inicialmente, realizou-se o pré-cultivo das células das leveduras por 48h antes de inoculá-las em frascos Erlenmeyer contendo 1/5 do volume de meio líquido sintético mínimo (6,7 g/L de base nitrogenada e 20 g/L de glicose), sendo a cultura incubada em um agitador a 28°C e 145±10 rpm. Em tempos pré-determinados ao longo do cultivo, amostras foram retiradas para a determinação do crescimento celular, por meio da medida da densidade óptica das amostras em espectrofotômetro (DO_{570nm}), e para a determinação da fermentação da glicose. Realizou-se a dosagem do etanol produzido durante os cultivos (fermentação de glicose) por método enzimático colorimétrico, adaptado de Rodionov et al. (2002).

Para permitir a avaliação dos graus de tolerância a diferentes valores de pH, ajustou-se o pH dos meios para 3,0, 5,0 ou 8,0. Para avaliar a tolerância a etanol, acresceu-se 50 g/L ou 100 g/L de etanol nos meios de cultivo (nesse caso, o pH do meio foi ajustado em 5,0).

4 Resultados e Discussão

Para as análises dos perfis de crescimento celular em diferentes valores de pH e sob diferentes concentrações de etanol, selecionou-se cinco cepas – FLONA-CE-3.4, UFFS-CE-3.6, CHAP-018, CHAP-025 e UFFS-CE-3.1.2 – pertencentes a este grupo de pesquisa. Essas condições testadas demonstraram que as linhagens foram mais tolerantes à variação do pH (Fig. 1) do que a altas concentrações de etanol presentes no meio (Fig. 2).

Como pode ser observado na Fig. 1, as linhagens testadas não tiveram suas performances de crescimento celular afetadas em razão da variação de pH. Contudo, ao se avaliar a fermentação da glicose ao longo desses cultivos, em diferentes valores de pH, percebeu-se que a cepa UFFS-CE-3.1.2 produziu 40% menos etanol em pH 8,0 quando comparado ao que foi produzido em pH 3,0 e 5,0. As fermentações realizadas pelas demais cepas, porém, também não foram afetadas pela variação do pH. Nesse sentido, destacaram-se as cepas FLONA-CE-3.4 e UFFS-CE-3.1.2, cujos rendimentos fermentativos atingiram respectivamente 60% e 70% do máximo teórico (dados não apresentados nas figuras).

O mesmo perfil de tolerância, no entanto, não se observou quando os meios de cultivo foram acrescidos de 50 g/L ou 100 g/L de etanol (Fig. 2). Os dados demonstram que as linhagens FLONA-CE-3.4, CHAP-018, CHAP 025 e UFFS-CE-3.1.2 são muito sensíveis à toxicidade do etanol, sendo incapazes de crescer na presença das concentrações impostas

desse álcool. A cepa UFFS-CE-3.6, por sua vez, foi a única que apresentou um crescimento exponencial após 25 h de adaptação ao meio contendo 50 g/L de etanol (Fig. 2A); um desempenho, contudo, tardio se comparado com o crescimento celular no meio sem etanol, iniciado depois de 10 h (vide Fig. 1). Sob concentração de 100 g/L de etanol, porém, a cepa UFFS-CE-3.6, da mesma forma que as demais, também não apresentou crescimento celular (Fig. 2B). A resistência a elevados níveis de etanol é imprescindível no fim do processo de fermentação, quando as dornas nas indústrias brasileiras apresentam em média 85 g/L de concentração de etanol (CTBE, 2016).

5 Conclusão

Embora tenham se mostrado sensíveis a altas concentrações de etanol presentes no meio, as leveduras testadas apresentaram tolerância a uma variação de pH de até cinco unidades, característica extremamente desejável ao ambiente industrial. Nos diferentes valores de pH testados, as leveduras foram capazes de igualmente fermentar a glicose, chegando, algumas delas, a produzir etanol em valores bem próximos do máximo teórico da fermentação alcoólica. Desse modo, os dados permitem confirmar a possibilidade de se encontrar, em ambientes naturais, leveduras capazes de serem empregadas na indústria sucroalcooleira. Ademais, os resultados obtidos vêm proporcionar também um aumento do conhecimento das leveduras presentes na microbiota local, graças a caracterização realizada de espécies até então pouco conhecidas.

Figura 1. Perfis de crescimento celular das linhagens UFFS-CE-3.6 (◆), FLONA-CE-3.4 (■), CHAP-018 (▲), CHAP-025 (×) e UFFS-CE-3.1.2 (✱) em meio sintético mínimo com 20 g/L de glicose e pH ajustado alternadamente em 5,0 (A), 3,0 (B) e 8,0 (C).

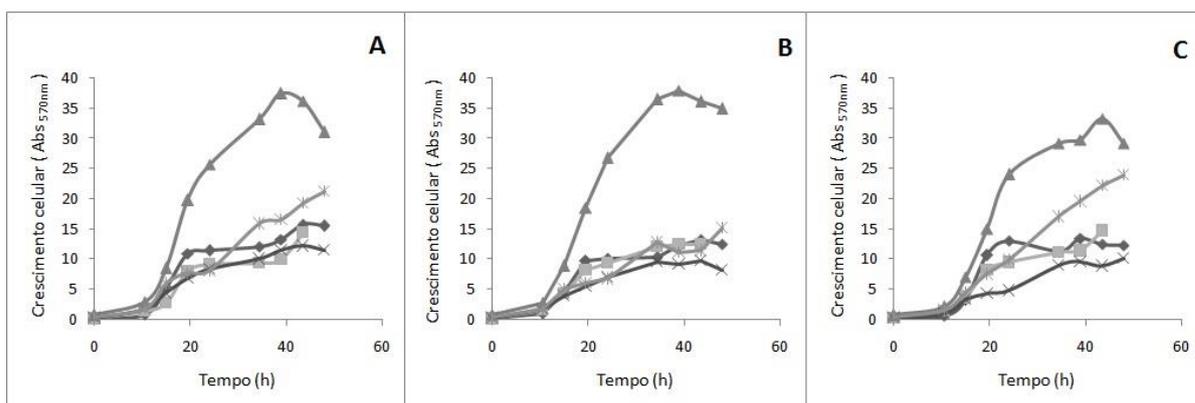
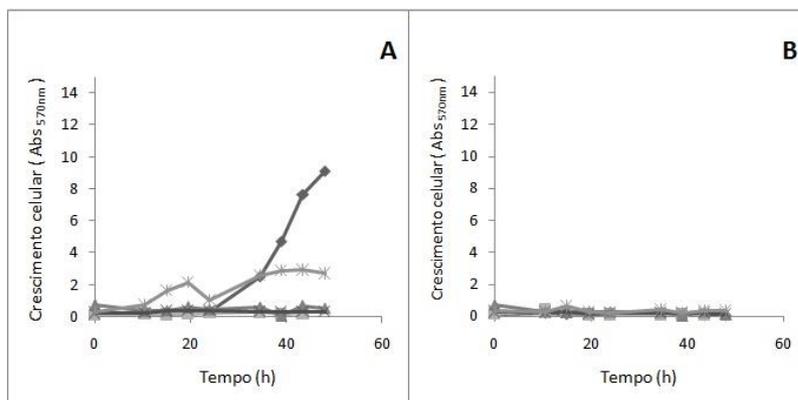


Figura 2. Perfis de crescimento celular das linhagens UFFS-CE-3.6 (◆), FLONA-CE-3.4 (■), CHAP-018 (▲), CHAP-025 (×) e UFFS-CE-3.1.2 (✱) em meio sintético mínimo com 20 g/L de glicose acrescido de 50 g/L (A) ou 100 g/L de etanol (B).



Palavras-chave: Etanol 2G; Fermentação; Leveduras; Glicose; Tolerância.

Fonte de Financiamento

CNPq (Edital MCTI/CNPq/Universal 14/2014).

Referências

- CTBE. Fermentação VHG com o dobro de etanol e 60% menos vinhaça. 2014. Disponível em: <<http://ctbe.cnpem.br/fermentacao-vhg-dobro-etanol-menos-vinhaca/>>. Acesso em: 15 fev. 2016.
- GONÇALVES, A. R.; BENAR, P.; COSTA, S. M.; RUZENE, D. S.; MORYIA, R. Y.; LUZ, S. M.; FERRETTI, L. P. Integrated processes for use of pulps and lignins obtained from sugarcane bagasse and straw. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 121, p. 821-826, 2005.
- LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Ecol.** v. 15, p. 575-591, 2006.
- RODIONOV, Y.V.; KEPPE, 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

A.C. Zanchet é aluna de IC voluntária, Edital 294/UFFS/2015, Proc. 23205.001727/2015-06.