



CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PALHA E BAGAÇO DE MILHO EM DECOMPOSIÇÃO[†]

ÉVELYN T. BARRILLI^{1,2,*}, LETICIA M. MILANI^{1,2}, VIVIANI TADIOTO^{1,2},
JOÃO P. BENDER^{1,3}, SÉRGIO L. ALVES JR^{1,4}.

1 Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, e este tipo de combustível é produzido principalmente a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar. No entanto, é possível produzir etanol de segunda geração a partir de vários resíduos lignocelulósicos que possuam alto teor de açúcares fermentescíveis. Em contrapartida, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, atualmente o microrganismo mais utilizado na produção de etanol, é incapaz de hidrolisar os polissacarídeos desses resíduos e até mesmo de fermentar significativa porção dos carboidratos obtidos a partir dessa hidrólise, como o dissacarídeo celobiose e a pentose xilose (LEE et al., 2013; STAMBUK et al., 2008).

De acordo com dados recentes do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola do IBGE, foram produzidos mais de 100 milhões de toneladas de milho nos últimos dois anos em nosso país. Desse modo, os resíduos dessa cultura merecem destaque no tocante à produção de etanol. Por esse motivo, faz-se necessária a otimização do processo fermentativo, que depende de leveduras capazes de hidrolisar e metabolizar os referidos carboidratos.

2 Objetivos

- Determinar, em leveduras isoladas de biomassa lignocelulósica de milho em decomposição, a capacidade de metabolização de glicose, xilose, celobiose e celulose;
- Determinar a atividade intracelular e periplasmática das enzimas celobiasas das leveduras previamente isoladas.

1Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos.

2Discente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS, *Campus* Chapecó.

3Doutor em Engenharia de Alimentos, UFFS, *Campus* Chapecó.

4Doutor em Biotecnologia, UFFS, *Campus* Chapecó. Orientador.

* Bolsista FAPESC/UFFS. Autor para correspondência: evelyntaize_b@hotmail.com.

[†] Vinculado ao projeto “Pré-tratamento, hidrólise e fermentação de biomassa lignocelulósica de milho”.

3 Material e Métodos

Dez linhagens escolhidas entre isolados de leveduras obtidos de bagaço e palha de milho em decomposição foram submetidas 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, celobiose ou celulose como fontes de carbono, pH 5). As culturas, então, foram incubadas em agitador a 25°C e 145 ± 10 rpm durante 48 h adicionais. Para verificar a capacidade de as leveduras metabolizarem os carboidratos em questão, o crescimento celular foi acompanhado durante essas 48 h: em tempos pré-determinados, retirou-se amostras para a determinação da densidade óptica por espectrofotometria a 570 nm (DO_{570nm}).

Os ensaios enzimáticos foram realizados com células intactas incubadas com celobiose 0,3 M em tampão Tris succinato 0,15 M, pH 5,0 (para atividade periplasmática), ou células permeabilizadas incubadas com celobiose 0,2 M em tampão MOPS-NaOH 0,1 M, pH 6,8 (para atividade intracelular), por fim a glicose liberada foi dosada por kit colorimétrico da Analisa (SANTOS et al., 2011). A atividade celobiase está expressa em U [g células]⁻¹, onde uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 μmol de glicose produzida por minuto a 30°C.

4 Resultados e Discussão

Inicialmente, foram analisadas dez cepas quanto a sua capacidade de metabolizar glicose, xilose, celobiose e celulose, conforme apresentado na Tabela 1. Todas as linhagens foram capazes de crescer em meios contendo alternadamente os três primeiros carboidratos, no entanto, nenhuma foi capaz de consumir a celulose como fonte de carbono. Portanto, embora inaptas a hidrolisar este polissacarídeo, essas linhagens selvagens apresentaram perfil interessante para a produção de etanol de segunda geração, haja vista terem sido capazes de metabolizar xilose e celobiose, algo que não seria possível para as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Posteriormente foram analisadas as atividades celobiase (intracelular e periplasmática) das mesmas dez cepas, conforme Figura 1. Quando as células foram cultivadas em meio com celobiose, oito cepas apresentaram altas atividades de celobiase intracelular de ~ 130 a 350 U [g células]⁻¹ (Figura 1-A). Outras duas estirpes (CHAP-083 e CHAP-108) apresentaram valores inferiores a 56 U [g células]⁻¹. Já quando as células foram previamente cultivadas em

glicose, todas as cepas testadas apresentaram atividades desprezíveis de hidrólise de celobiose. Assim como verificado por Santos et al. (2011), essas cepas não apresentaram atividade periplasmática, mesmo em células previamente cultivadas em meios com celobiose (Figura 1-B).

Essa inibição da atividade celobiase em células crescidas em glicose pode ser um fator limitante para a produção de etanol em meios que contenham a hexose e o dissacarídeo juntos. Dados semelhantes, no entanto, já foram observados por outros autores, o que demonstra ser esta uma condição comum para as leveduras (CADETE e ROSA, 2018).

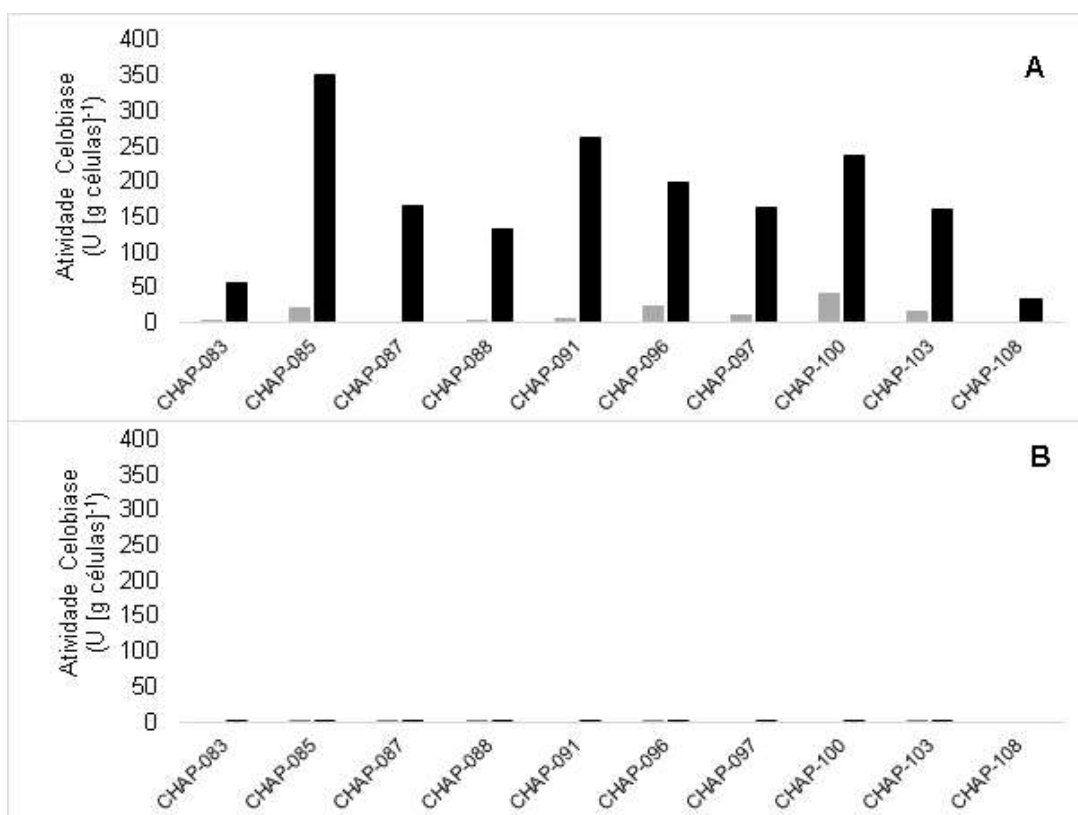
5 Conclusão

De modo que oito cepas apresentaram dados expressivos de atividade celobiase intracelular a partir de células pré cultivadas em celobiose, nossos resultados sugerem um potencial de aplicação industrial dessas leveduras selvagens ou de suas celobiasas, apesar da presença de glicose ser um forte repressor dessa atividade enzimática. Sua aplicação, para otimização da produção de etanol de segunda geração, ainda pode ser reforçada frente a capacidade de as dez cepas metabolizarem xilose e celobiose.

Tabela 1. Capacidade de metabolização de glicose, xilose, celobiose e celulose pelas dez linhagens de leveduras selvagens isoladas de bagaço e palha de milho em decomposição.

Linhagens	Glicose	Xilose	Celobiose	Celulose
CHAP-083	+	+	+	-
CHAP-085	+	+	+	-
CHAP-087	+	+	+	-
CHAP-088	+	+	+	-
CHAP-091	+	+	+	-
CHAP-096	+	+	+	-
CHAP-097	+	+	+	-
CHAP-100	+	+	+	-
CHAP-103	+	+	+	-
CHAP-108	+	+	+	-

Figura 1. Atividade celobiase intracelular (A) e periplasmática (B) em células crescidas em meios contendo 2% de glicose (barras cinzas) ou 2% de celobiose (barras pretas).



Referências

CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeast of the genus *Spathaspora*: potencial candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**. v.35, p. 191-199, 2018.

LEE, W.H.; NAN, H.; KIM, H.J.; JIN, Y.S. Simultaneous saccharification and fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without supplementing extracellular β -glucosidase. **Journal of Biotechnology**. v.167, p.316-322, 2013.

SANTOS, R. O.; CADETE, R. M.; BADOTTI, F.; MOURO, A.; WALLHEIM, D. O.; GOMES, F. C.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *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.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of scientific and industrial research**. v. 67, p. 918-926, 2008.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração; celobiose; celobiase; glicose; xilose.

Financiamento: CNPq (Processo 454215/2014-02) e FAPESC (Edital 07/2015).