



ANÁLISE DO METABOLISMO DE XILOSE POR UMA NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO *Wickerhamomyces* SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

A. C. LUCARONI^{1*}, A. GIEHL¹, L. DEOTI¹, V. TADIOTO¹ e S. L. ALVES JR.¹

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó,
Laboratório de Bioquímica e Genética

*E-mail para contato: lucaroniana@gmail.com

RESUMO – A biomassa lignocelulósica é um recurso abundante e de baixo custo, que pode ser empregado na produção de etanol de segunda geração (etanol 2G). Todavia, existem desafios a serem superados para que a fabricação de etanol 2G seja economicamente viável, como a busca por microrganismos capazes de tolerar inibidores provenientes do pré-tratamento da biomassa e de metabolizar a xilose, açúcar abundante em resíduos lignocelulósicos, uma vez que as leveduras industriais atualmente empregadas na primeira geração do combustível não conseguem fazê-lo. Isto posto, o presente trabalho analisou o potencial de uma levedura selvagem, UFFS-CE-3.1.2, pertencente a uma nova espécie do gênero *Wickerhamomyces*. A linhagem foi submetida a experimentos de fermentação em batelada e de avaliação do grau de tolerância a três inibidores comuns (ácido acético, ácido fórmico e furfural). Também foram quantificados o consumo de açúcares, glicose e xilose, e a produção de etanol. A cepa UFFS-CE-3.1.2 demonstrou-se capaz de tolerar altas concentrações de inibidores, porém fermentou a xilose com baixa eficiência quando comparado à glicose. De todo modo, sua capacidade de gerar biomassa a partir da referida pentose demonstra potencial de metabolização do carboidrato, podendo fornecer genes para serem heterologamente expressos nas leveduras industriais já selecionadas para as usinas de primeira geração, e com isso contribuir para a otimização da produção do etanol 2G.

1. INTRODUÇÃO

As atuais mudanças ambientais e as flutuações de preços dos combustíveis fósseis têm intensificado as buscas por alternativas limpas e renováveis (Sharma *et al.*, 2018). Embora o Brasil seja o segundo maior produtor de etanol combustível do mundo e faça uso da cana-de-açúcar como matéria prima, essa produção gera uma considerável quantidade de resíduos agroindústrias, isto é, cerca de 140 kg de bagaço e 140 kg de palha são geradas a cada 1 tonelada de cana-de-açúcar cultivada (BNDES-CGEE, 2008; Mesa-Pérez *et al.*, 2013). Atualmente, estes resíduos são utilizados para gerar energia através da queima, pela própria indústria. Todavia, esses resíduos podem ser transformados em etanol de segunda geração (etanol 2G), aumentando a produção em até 50%, sem aumentar a área de plantio e sem competir com a produção de alimentos (Silva *et al.*, 2014).



O bagaço e a palha da cana-de-açúcar são constituídos por celulose, hemicelulose e lignina. Para que os monômeros de açúcares fiquem prontamente disponíveis, a lignina deve ser rompida em uma etapa prévia de pré-tratamento. Deste processo preliminar à fermentação podem resultar inibidores do processo fermentativo, como ácidos alifáticos, compostos fenólicos e aldeídos de furanos, responsáveis pela redução da eficiência da produção (Todhanakasem *et al.*, 2018).

Hoje, o microrganismo fermentador mais utilizado na indústria do etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, essa espécie não é capaz de fermentar a xilose, o principal carboidrato da fração hemicelulose dos resíduos lignocelulósicos, haja vista sua deficiência de enzimas envolvidas na conversão da xilose até xilulose-5P (xilose-redutase, xilitol desidrogenase e xiluloquinase), que então adentra a via das pentoses-fosfato (Stambuk *et al.* 2008). Visto isso, se faz necessária a busca por leveduras selvagens capazes tolerar os inibidores supramencionados e de metabolizar a xilose. Com isso, é possível avaliar o potencial desses microrganismos serem diretamente empregados no ambiente industrial ou de fornecerem genes às cepas industriais de *S. cerevisiae* no intuito de torná-las aptas à fermentação da xilose. Nesse contexto, o presente estudo analisou o potencial da cepa selvagem UFFS-CE-3.1.2, representante de uma nova espécie de levedura (ainda não descrita) do gênero *Wickerhamomyces*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Levedura e Meios de Cultura Utilizados

A cepa UFFS-CE-3.1.2 é uma nova espécie do gênero *Wickerhamomyces*, ainda não descrita. Essa levedura foi isolada a partir de matéria vegetal em decomposição, coletada nas matas do *campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul (região de Mata Atlântica, no oeste do estado de Santa Catarina). Seu isolamento e sua identificação taxonômica ocorreram conforme descrito por Bazoti *et al.* (2017).

Tanto para o processo de fermentação em batelada quanto para a avaliação do crescimento celular, as células de levedura foram pré-cultivadas em meio YPD (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona e 20 g L⁻¹ de glicose) durante 48 h a 25°C e 145 rpm. Após o crescimento celular, ambos os processos fizeram uso do meio sintético mínimo YNB (6,7 g L⁻¹ de base nitrogenada de levedura e 20 g L⁻¹ de glicose ou xilose).

No entanto, para o crescimento celular, cada frasco Erlenmeyer foi acrescido por um inibidor (ácido acético, ácido fórmico ou furfural) em concentrações crescentes. Também foram realizados experimentos de controle (0 g L⁻¹ inibidor), totalizando 24 frascos. As concentrações de ácido acético foram de 0,6 g L⁻¹, 1,8 g L⁻¹ e 3,6 g L⁻¹, para o ácido fórmico utilizou-se 0,1 g L⁻¹, 0,3 g L⁻¹ e 0,6 g L⁻¹, já para o furfural, foram utilizadas 0,3 g L⁻¹, 0,9 g L⁻¹ e 1,8 g L⁻¹.

2.2. Fermentação em Batelada e Crescimento celular

Para dar início à fermentação em batelada, as células tiveram de ser cultivadas até que alcançassem a fase exponencial de crescimento celular. Quando isso ocorreu, as células foram lavadas e colocadas em suspensão em meio YNB até que a concentração de células atingisse aproximadamente 10 g L^{-1} . As fermentações foram realizadas sob agitação constante de 145 rpm, a 25°C por 8 h. Alíquotas foram retiradas para análise de consumo de açúcares e produção de etanol.

Para o crescimento celular, as células foram inoculadas, em meio YNB, após um pré-cultivo de 48h. Para observar o crescimento, foram coletadas amostras periodicamente para medição da absorbância, no comprimento de onda de 570 nm (DO_{570}). Amostras foram coletadas e centrifugadas para retirada do sobrenadante, para posterior quantificação de açúcares e de etanol. Todo experimento ocorreu sob agitação constante de 145 rpm, a 25°C por 48 h.

2.3. Quantificação de Açúcares e de Etanol

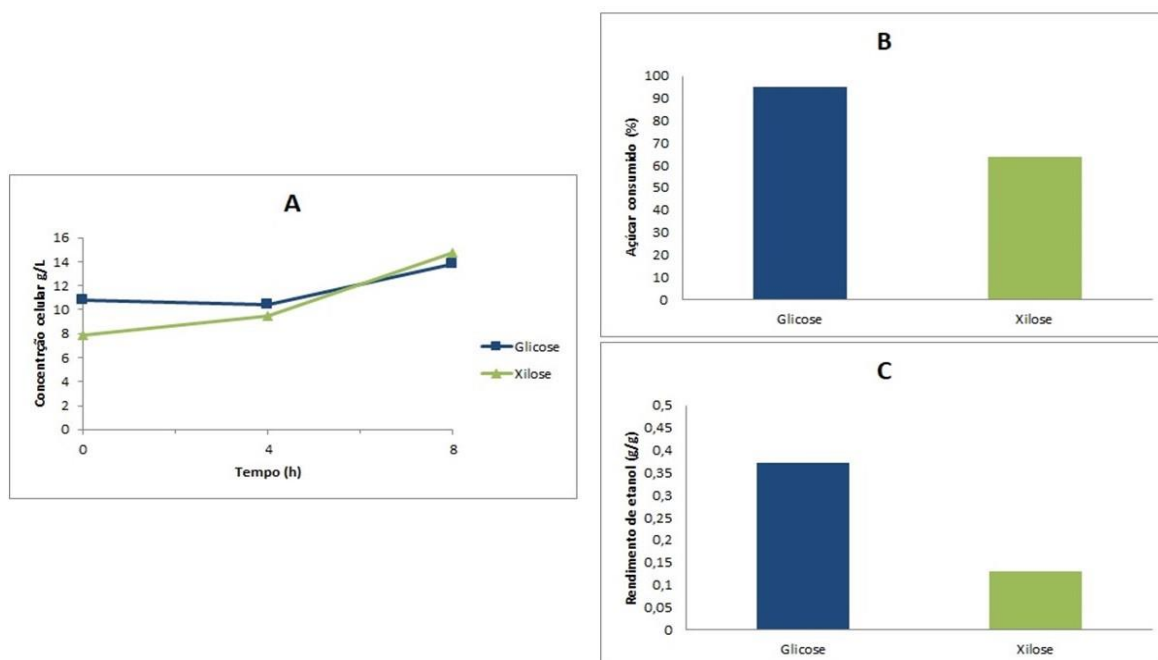
A quantificação do consumo de açúcares e a produção de etanol foi determinada em HPLC, com fase móvel de $5 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$, a 50°C , com fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ em coluna Aminex HPX-87H, Bio-Rad, e detecção por índice de refração RID-10, Shimadzu.

Para o cálculo do rendimento de etanol foi utilizada a razão entre a quantidade de etanol produzida e a quantidade de açúcar consumido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

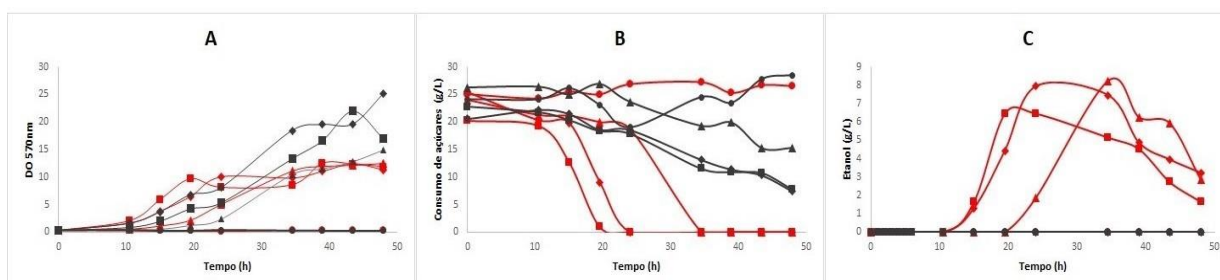
No intuito de analisar o perfil de metabolização de xilose pela cepa UFFS-CE-3.1.2, as células dessa levedura foram inoculadas em meios contendo o carboidrato em questão. Segundo Stambuk *et al.* (2008), grande parte das espécies de leveduras são capazes de fermentar a glicose com eficiência; visto isso também foram realizados ensaios com essa hexose para fins comparativos (Figura 1). De fato, pode-se observar na Figura 1B que aproximadamente 90% da glicose foi consumida, enquanto a xilose teve uma taxa de consumo por volta de 64%. Entretanto, a Figura 1A demonstra que com 4 h de experimento, a concentração celular em ambos carboidratos se aproximou e, com 8 h, essa concentração em xilose chegou a superar a presente em glicose. Isso é explicado pelo que se observa em relação à produção de etanol nos dois meios testados (Figura 1C), haja vista que a linhagem UFFS-CE-3.1.2 obteve um rendimento fermentativo de apenas $\sim 0,13 \text{ g g}^{-1}$ em meio contendo xilose. Sendo assim, os dados apresentam-se coerentes com a literatura: quando açúcares são metabolizados preferencialmente pela via respiratória (ou seja, são pouco ou quase nada fermentados), o carbono é desviado para uma maior produção de biomassa celular (Duval *et al.*, 2010).

Figura 1 – Fermentação em batelada com glicose e xilose como fonte de carbono.



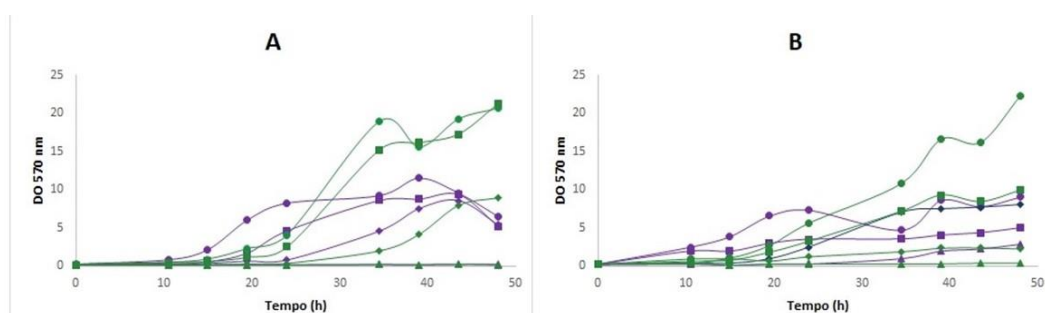
Embora o desempenho fermentativo dessa levedura diante da xilose não tenha sido tão destacado, suas células, por outro lado, apresentaram expressivo potencial de tolerância ao ácido acético. Como pode ser observado na Figura 2A, a linhagem teve seu crescimento completamente inibido apenas na concentração mais alta testada desse inibidor ($3,6 \text{ g L}^{-1}$). Entretanto, a literatura demonstra que essa concentração do ácido é maior do que a presente normalmente nos hidrolisados (Fonseca *et al.*, 2011). É importante destacar também que esse nível de tolerância é similar ao que Du *et al.* (2019) observaram recentemente para a levedura *Spathaspora passalidarum*, espécie também encontrada na Mata Atlântica (Cadete e Rosa, 2018). Cabe ressaltar ainda que, nos meios com xilose, na ausência do inibidor e com $0,6 \text{ g L}^{-1}$ desse ácido, a levedura obteve maior crescimento do que em meios com glicose. De fato, como pode ser visto na Figura 2C, o etanol foi produzido apenas em meios contendo a hexose, corroborando os dados obtidos na fermentação em batelada (Figura 1).

Figura 2 – Crescimento celular (A), consumo de açúcares (B) e produção de etanol (C) com o inibidor ácido acético, nas concentrações de 0 g L^{-1} (■), $0,6 \text{ g L}^{-1}$ (◆), $1,8 \text{ g L}^{-1}$ (▲) e $3,6 \text{ g L}^{-1}$ (●). As curvas em vermelho representam meios com 20 g L^{-1} de glicose e as curvas em cinza representam meios com 20 g L^{-1} de xilose.



Apesar de apresentar uma maior fase *lag* em meios contendo xilose, a linhagem foi capaz de ter, novamente, maior crescimento em meios contendo xilose, quando a concentração de ácido fórmico (Figura 3A) e de furfural (Figura 3B) eram baixas. Segundo Senatham *et al.* (2016), concentrações de 0,9 g L⁻¹ a 2 g L⁻¹ de furfural podem inibir completamente o crescimento celular, entretanto, a levedura foi capaz de tolerar 0,9 g L⁻¹ do inibidor e apresentar um pequeno crescimento em 1,8 g L⁻¹.

Figura 3 – Perfis de crescimento celular com 20 g L⁻¹ de glicose (curvas roxas) e com 20 g L⁻¹ de xilose (curvas verdes) acrescidos com ácido fórmico (A), nas concentrações de 0 g L⁻¹ (●), 0,1 g L⁻¹ (■), 0,3 g L⁻¹ (◆) e 0,6 g L⁻¹ (▲), ou furfural (B), nas concentrações de 0 g L⁻¹ (●), 0,3 g L⁻¹ (■), 0,9 g L⁻¹ (◆) e 1,8 g L⁻¹ (▲).



4. CONCLUSÃO

A nova espécie do gênero *Wickerhamomyces* apresentou satisfatório nível de tolerância a inibidores de fermentação em comparação com o que se observa na literatura para outras leveduras selvagens. Por outro lado, a linhagem aqui testada dessa nova espécie fermentou pouco eficientemente a xilose. De todo modo, sua capacidade de converter a xilose em biomassa celular demonstra a presença de uma maquinaria enzimática em suas células capaz de metabolizar por completo essa pentose, mesmo na presença de inibidores, o que já representa uma expressiva vantagem sobre as cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. Assim sendo, a levedura UFFS-CE-3.1.2 pode contribuir para a otimização da produção de etanol de segunda geração, fornecendo, às referidas linhagens industriais, os genes que codificam as três primeiras enzimas envolvidas no metabolismo da pentose em questão.

5. REFERÊNCIAS

- BAZOTI, S. F.; GOLUNSKI, S.; SIQUEIRA, D. P.; SCAPINI, T.; BARRILLI, É. T.; MAYER, D. A.; BARROS, K. O.; ROSA, C. A.; STAMBUK, B. U.; ALVES JR., S. L.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. *Bio. Tech.*, v. 244, p. 582-587, 2017.
- BNDES-CGEE, *Sugarcane-based Bioethanol: Energy for Sustainable Development*. Rio de Janeiro: Editora: BNDES, 2008.



- CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast*, v. 35, p. 191-199, 2018.
- DU, C., LI, Y., ZHAO, X., PEI, X., YUAN, W., BAI, F., JIANG, Y. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 103, p. 2845-2855, 2019.
- DUVAL, E. H.; ALVES Jr., S. L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G.; STAMBUK, B. U. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy 52 number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. *Journal of Applied Microbiology*, v.109, p.248-259, 2010.
- FONSECA, B. G.; MOUTTA RDE, O.; FERRAZ FDE, O.; VIEIRA, E. R.; NOGUEIRA, A. S.; BARATELLA, B. F.; RODRIGUES, L. C.; HOU-RUI, Z.; DA SILVA, S. S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 38, p. 199-207, 2011.
- MESA-PÉREZ, J. M.; ROCHA, J. D.; BARBOSA-CORTEZ, L. A.; PENEDO-MEDINA, M.; LUENGO, C. A.; CASCAROSA, E. Fast oxidative pyrolysis of sugar cane straw in a fluidized bed reactor. *App. Thermal Engineering*, v. 56, p. 167-175, 2013.
- SENATHAM, S.; CHAMDUANG, T.; KAEWCHINGDUANG, Y.; THAMMASITTIRONG, A.; SRISODSUK, M.; ELLISTON, A.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance of *Scheffersomyces shehatae* for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate. *Springer Plus*, v. 5, p. 327-345, 2016.
- SHARMA, S.; AURORA, A.; SHARMA, P.; SINGH, S.; NAIN, L.; PAUL, D. Notable mixed substrate fermentation by native *Kodamaea ohmeri* strain isolated from *Lagenaria siceraria* flowers and ethanol production on paddy straw hydrolysates. *Chem. Central Journal*, v. 12, p. 327-345, 2018.
- SILVA, L. F. TACIRO, M. K.; RAICHER, G.; PICOLLI, R. A.; MENDONÇA, T. T.; LOPES, M. S.; GOMEZ, J. G. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 71, p. 2-7, 2014.
- 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 co-fermenting yeast strains. *J Sci Ind Res.*, v. 67, p. 918-926, 2008.
- TODHANAKASEM, T.; YODSANGA, S.; SOWATAD, A.; KANOKRATANA, P.; THANONKEO, P.; CAMPREDA, V. Inhibition analysis of inhibitors derived from lignocellulose pretreatment on the metabolic activity of *Zymomonas mobilis* biofilm and planktonic cells and the proteomic responses. *Biotech. Bioengineering*, v. 115, p. 70-81, 2018.