

FERMENTAÇÃO DE CELOBIOSE POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Candida pseudointermedia* ISOLADA DE BIOMASSA VEGETAL EM DECOMPOSIÇÃO

Viviani Tadioto^{1*}, Evelyn T. Barrilli¹, Letícia M. Milani¹, Ana C. Lucaroni¹, Letícia Deoti¹, Anderson Giehl¹, Odinei Fogolari², Caroline Müller³, Helen Treichel⁴, Sérgio L Alves Jr.⁵

1. Estudante de Eng. Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul
2. Tecnólogo Área Química da Central de Análises do *Campus* Chapecó da UFFS
3. Pós-doutoranda do Laboratório de Bioquímica e Genética do *Campus* Chapecó da UFFS
4. Professora Coordenadora do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da UFFS
5. Professor Coordenador do Laboratório de Bioquímica e Genética da UFFS/Orientador

*vivianitadioto@hotmail.com

Resumo

O etanol 2G é um dos mais promissores combustíveis renováveis da matriz energética do Brasil. Para que a sua produção, no entanto, torne-se mais atrativa aos produtores, é necessário superar alguns desafios, como a fermentação do dissacarídeo celobiose. Tendo em vista que as linhagens atualmente empregadas pelas usinas são incapazes de fazer isso, é necessário encontrar outras leveduras que o façam. Assim, este estudo submeteu uma nova cepa da espécie *Candida pseudointermedia* a meios contendo alternadamente glicose ou celobiose como carboidratos, para avaliar seu potencial fermentativo e sua atividade de hidrólise do dissacarídeo. Os resultados obtidos demonstram que essa levedura é capaz de fermentar a celobiose, graças a uma elevada capacidade hidrolítica desse dissacarídeo. Portanto, *C. pseudointermedia* pode contribuir com a otimização da produção de etanol 2G, já que oportuniza a conversão, em etanol, de um dos principais carboidratos encontrados nos hidrolisados lignocelulósicos.

Palavras-chave: etanol; levedura; hidrólise.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Introdução

A geração de energia no mundo contemporâneo precisa levar em conta dois aspectos para além da segurança energética: a pegada hídrica e a competição com a produção de alimentos de cada processo produtivo. Nesse contexto, o etanol de segunda geração (2G) surge como excelente alternativa, especialmente para a matriz energética do Brasil. Esse imenso potencial do país se deve principalmente à já elevada produção brasileira da primeira geração do combustível e à possibilidade de utilizar seus próprios resíduos para a fabricação do etanol 2G, aumentando em até 50% o montante nacional produzido, sem demandar mais áreas de plantio de cana-de-açúcar (Stambuk et al., 2008). Isso termina por diminuir a necessidade de água para irrigação e o uso de terras para culturas energéticas.

Por outro lado, a produção de etanol 2G ainda enfrenta alguns desafios, que precisam ser superados para que ela se torne mais atrativa aos produtores. Esse processo biotecnológico ocorre a partir da fermentação de hidrolisados obtidos a partir de biomassa lignocelulósica. Para que o processo fermentativo ocorra, porém, são necessárias duas etapas prévias: (1^o) pré-tratamento da biomassa, para separar a lignina das frações celulose e hemicelulose, e (2^o) hidrólise desses polissacarídeos, para oportunizar mono e dissacarídeos ao microrganismo fermentador (Bhutto et al., 2017). No entanto, alguns desses carboidratos, como a celobiose (dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose unidas entre si por uma ligação glicosídica do tipo β -1,4), não são fermentados pela levedura atualmente empregada pelas usinas (*Saccharomyces cerevisiae*). Desse modo, a busca por leveduras capazes de fazê-lo torna-se extremamente desejável, e, de fato, isso tem ocorrido em nichos microbianos onde a biomassa lignocelulósica é substrato para o desenvolvimento de microrganismos. Recentemente, alguns trabalhos têm apontado o isolamento de leveduras de biomassa vegetal em decomposição, e essas têm sido capazes de metabolizar diferentes carboidratos presentes nesses materiais (Santos et al. 2011; Lopes et al. 2018). Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar o metabolismo de celobiose em uma nova cepa da espécie *Candida pseudointermedia*, previamente isolada de restos vegetais coletados de serrapilheira.

Metodologia

Levedura utilizada e fermentação em batelada

A linhagem UFFS-CE-3.6, da espécie *Candida pseudointermedia*, foi isolada de material vegetal em decomposição coletado na serrapilheira das matas do *Campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul (27°7' de latitude Sul e 52°42' de longitude Oeste).

Para a fermentação em batelada, as células da levedura foram inicialmente pré-cultivadas em YPD (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona e 20 g L⁻¹ de glicose) até sua fase exponencial de crescimento. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em meio sintético mínimo YNB (6,7 g L⁻¹ de base nitrogenada de levedura) contendo alternadamente 20 g L⁻¹ de glicose ou celobiose como fonte de carbono, de

modo a atingirem a concentração de ~10 g de células por litro. As fermentações foram realizadas a 25°C, sob 145 rpm, durante 24 h com retirada de amostras (nos intervalos apresentados na Figura 1) para determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol.

O consumo de açúcares e a produção de etanol foram determinados em HPLC: fase móvel 5 mM H₂SO₄, 50°C, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ em coluna Aminex HPX-87H, Bio-Rad, e detecção por índice de refração RID-10, Shimadzu.

O rendimento de etanol ($Y_{e/s}$) foi calculado pelo quociente entre a quantidade de etanol produzido e a quantidade de açúcar consumido, sendo apresentado como $g_{\text{etanol}} g_{\text{açúcar}}^{-1}$.

Atividade celobiase periplasmática e intracelular

A atividade de hidrólise periplasmática e intracelular de celobiose foi determinada em células crescidas até a fase exponencial de crescimento em meios ricos YP (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona) contendo alternadamente 20 g L⁻¹ glicose ou celobiose como fontes de carbono, conforme descrito por Santos et al. (2011). Para a realização da cinética enzimática, as células foram incubadas com 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 mM de celobiose. A velocidade máxima foi calculada pela equação de Lineweaver-Burk (Nelson e Cox, 2011).

A atividade celobiase está expressa em U [g células]⁻¹, onde uma unidade corresponde a 1 μmol de glicose produzida por minuto a 30°C.

Resultados e Discussão

No intuito de verificar a capacidade de fermentação de celobiose por *Candida pseudointermedia*, as células da linhagem UFFS-CE-3.6 foram inoculadas em meios contendo alternadamente glicose ou o referido dissacarídeo. A análise em meio com glicose foi realizada para efeito comparativo, haja vista que a maior parte das espécies de leveduras é capaz de fermentar eficientemente essa hexose (Stambuk et al., 2008). De fato, como pode ser verificado na Figura 1, em apenas duas horas de incubação, a glicose disponível no meio foi completamente consumida pelas células, que, diante desse açúcar, apresentaram rendimento de etanol igual a 0,315 g g⁻¹, o que corresponde a ~62% do rendimento máximo teórico (Hamelinck et al. 2005). Por outro lado, o consumo de celobiose foi nove vezes mais lento, tendo as células necessitado de 18 horas de incubação para exaurir o dissacarídeo do meio. Apesar disso, a cepa ainda assim foi capaz de fermentar a celobiose, tendo produzido 2,7 g L⁻¹ de etanol e, assim, apresentado um rendimento fermentativo de 0,116 g g⁻¹.

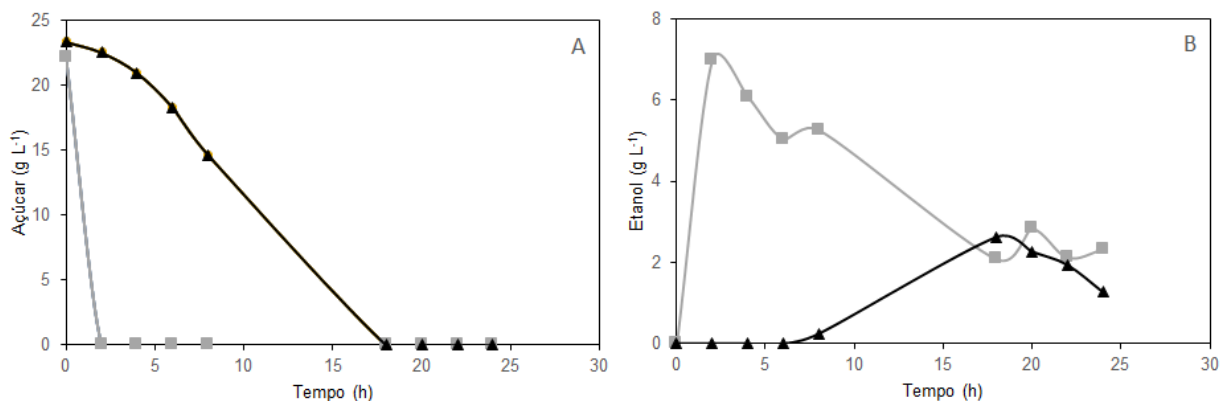


Figura 1. Consumo de açúcares (A) e produção de etanol (B) durante fermentação em batelada conduzida em meio YNB contendo glicose (quadrado cinza) ou celobiose (triângulo preto) como fonte de carbono. Os dados apresentados representam a média obtida entre dois experimentos completamente independentes, tendo os desvios padrões sido sempre inferiores a 10%.

A literatura demonstra que, em leveduras, a hidrólise de celobiose pode ocorrer no periplasma (Guo et al., 2015) e/ou no interior da célula (Santos et al., 2011). Assim sendo, a cepa UFFS-CE-3.6 foi cultivada em meios YP contendo glicose ou celobiose e, na sequência, suas células foram analisadas quanto à atividade celobiase. Independentemente do carboidrato presente no meio de crescimento, essa levedura não apresentou atividade periplasmática (dados não mostrados). Por outro lado, a atividade intracelular mostrou-se bastante expressiva, com a velocidade máxima atingindo 185,2 U [g células]⁻¹, quando as células foram previamente cultivadas em meio contendo celobiose (Figura 2). Esse valor foi similar ao observado por Santos et al. (2011), que caracterizaram o metabolismo de celobiose na levedura *C. queiroziae*, a qual apresentou rendimento fermentativo ainda superior ao que fora aqui observado para *C. pseudointermedia*.

As células previamente cultivadas em meio com glicose foram incapazes de hidrolisar a celobiose (Figura 2). De fato, essa hexose é reconhecidamente um repressor da expressão de genes envolvidos no metabolismo de outros carboidratos (Cadete e Rosa, 2018). Assim sendo, os dados obtidos demonstram que a presença de glicose inibe a expressão de celobiasas nas células de *C. pseudointermedia* e, conseqüentemente, impede a hidrólise do dissacarídeo em questão.

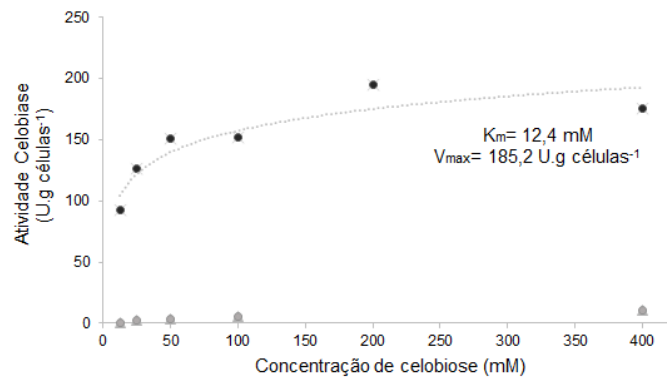


Figura 2. Cinética de hidrólise de celobiose por células de leveduras previamente cultivadas em meios com glicose (círculos cinzas) ou celobiose (círculos pretos). Os dados apresentados representam a média obtida entre dois experimentos completamente independentes, tendo os desvios padrões sido sempre inferiores a 10%.

Embora a repressão pela glicose seja uma característica desinteressante para a indústria do etanol – haja vista que, nos hidrolisados lignocelulósicos, glicose e celobiose estão simultaneamente presentes –, a capacidade de hidrólise intracelular da celobiose é algo extremamente desejável, pois diminui a formação de monossacarídeos do lado de fora da célula, conseqüentemente reduzindo a chance de contaminação bacteriana na dorna (Greig e Trivisano, 2004) e o estresse osmótico sobre as células de leveduras.

Conclusões

A levedura *Candida pseudointermedia* UFFS-CE-3.6 mostrou-se capaz de fermentar a celobiose, característica que representa uma vantagem expressiva sobre as cepas industriais da espécie *S. cerevisiae* (atualmente empregadas na produção de etanol), que são incapazes de metabolizar esse dissacarídeo. Além disso, embora o rendimento fermentativo dessa levedura possa ser considerado insatisfatório para as pretensões das usinas, a elevada atividade celobiase intracelular apresentada pelas células da linhagem aqui analisada demonstra a possibilidade de aplicação biotecnológica das suas enzimas, pois suas celobiasas intracelulares podem vir a ser heterologamente expressas em leveduras industriais. Isso tende a garantir o consumo direto do carboidrato em questão, com hidrólise no citoplasma, liberando internamente moléculas de glicose que podem ser convertidas a etanol. Ademais, essa forma de metabolizar a celobiose evita contaminações bacterianas e estresse osmótico para o microrganismo fermentador e, conseqüentemente, garante maior produtividade de etanol. Portanto, *C. pseudointermedia* apresenta potencial para contribuir com a otimização da produção de etanol 2G, tendo em vista que suas enzimas podem proporcionar a fermentação da celobiose presente em hidrolisados lignocelulósicos.

Referências bibliográficas

- BHUTTO, A. W. et al. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**. 2017; 122:724-745.
- CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**. 2018; 35:191-199.
- GREIG, D.; TRIVISANO, M. The Prisoner's Dilemma and polymorphism in yeast SUC genes. **Proc Biol Sci**. 2004; 271:S25-S26.
- GUO, Z. et al. Development of cellobiose-degrading ability in *Yarrowia lipolytica* strain by overexpression of endogenous genes. **Biotechnol Biofuels** 2015; 8:109.
- HAMELINCK, C. N. et al. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass Bioenergy**. 2005; 28:384-410.
- LOPES, M. R. et al. Characterisation of the diversity and physiology of cellobiose-fermenting yeasts isolated from rotting wood in Brazilian ecosystems. **Fungal Biol**. 2018; 122:668-676.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- 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**. 2011; 99:635-642.
- STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **J Sci Ind Res**. 2008; 67:918-926.