



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA – PPG-DB

SELEÇÃO DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS CAPAZES DE METABOLIZAR
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO E FERMENTAR D-XILOSE

ÍTALO THIAGO SILVEIRA ROCHA MATOS

MANAUS
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA – PPG-DB

SELEÇÃO DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS CAPAZES DE METABOLIZAR
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO E FERMENTAR D-XILOSE

ÍTALO THIAGO SILVEIRA ROCHA MATOS
ORIENTADOR: PROF. DR. SPARTACO ASTOLFI FILHO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica, Área de concentração em Biodiversidade Amazônica.

MANAUS
2010

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Matos, Ítalo Thiago Silveira Rocha

M433s Seleção de leveduras amazônicas capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico e fermentar D-xilose / Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos. - Manaus: UFAM, 2010.
68 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) —
Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

1. Diversidade Microbiana 2. Leveduras 3. Hidrolisado Hemicelulósico I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 546 (043.3)

Sinopse:

Foi feito isolamento e seleção de leveduras capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e de fermentar D-xilose. Para tanto, a prospecção foi efetuada em quatro diferentes habitat amazônicos: solos de savana, coletados no cerrado roraimense; solos de matas de terra firme, coletados em floresta urbana na cidade de Manaus; intestino de besouros da família Carabidae e conteúdo abdominal de cupins do gênero *Nasutitermes*. Foram isolados ao todo 76 leveduras, sendo 28 capazes de assimilar D-xilose e 3 capazes de fermentar o referido açúcar.

Dedicatória

Maria Luiza e Pedro Enéas,

Àqueles que nos últimos anos aprenderam que pai é
uma coisa que aparece vez ou outra, brinca, ama-
nos, faz-nos felizes e depois vai embora, pra voltar
Deus sabe quando. A estes, quase num pedido de
perdão, dedico.

Agradecimentos

Ao Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia da Universidade Federal do Amazonas, que a partir da elaboração do plano de capacitação do corpo docente tornou esta realização um objetivo concreto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio por meio dos programas de fomento a pesquisa e pós-graduação *Strictu Sensu*.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela concessão, embora parcial, de bolsa de estudos por meio do programa POSGRAD.

Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, pelo apoio prestado e prontidão em atender-me, ajudando a contornar a falta de material.

Ao Laboratório de Genética de Microrganismos – LAGEM / ICB / UFAM, na pessoa da Profa. Dra. Rosana de Medeiros Galvão, por acolher-me em seu laboratório e estar sempre disposta a ajudar.

A equipe do Laboratório de Micologia – DPUA / ICB / UFAM, Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, M.Sc. Larissa Kirsch, M.Sc. Rozana Palheta e M.Sc. Tarciana Amorim, por seu apoio prestado na hora de esclarecer dúvidas referentes às várias técnicas empregadas no estudo de leveduras.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, por aceitar o desafio de orientar um discente quando este não poderia dedicar-se integralmente as atividades do mestrado,

A Luciana Cassa Araujo Barbosa, por sua co-orientação e, acima de tudo, por sua amizade, fazendo-me sentir por muitas vezes perfilhado.

Aos colegas e amigos do ICSEZ, Angelo Neto, Daniel Casagrande, Diego Mota, Grazielle Santello, Márcio e Monyka Hoshiba, Midian Monteiro, Tiago Costa e Sandra Rocha. Suas interpretações, opiniões, dicas de redação; ou simplesmente a cervejinha depois de um dia exaustivo de trabalho fizeram parte desta conquista.

Ao amigo Pedro Amoedo, docente do ICSEZ, pela força prestada na hora dos cálculos estatísticos e regressões lineares.

A minha família, Antonia Erileuda Silveira Rocha, Eline dos Anjos Azevedo Matos, Gabrielle Silveira Rocha Matos e Irismar Silveira Rocha, mulheres da minha vida, suporte moral incondicional e irrestrito, em todos os sentidos da palavra, durante estes dois anos deste trabalho. Ao Deus que nos guarda de tropeçar, para nos apresentar puros diante da sua glória. Ao único Deus, salvador por meio de Cristo, o Senhor.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os quais muitos agora, de forma ingrata e injusta, não citei os nomes.

Sumário

FICHA CATALOGRÁFICA.....	i
DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
Aquecimento global, combustíveis fósseis e etanol.....	1
Microrganismos e fermentação.....	2
Indústria da fermentação e novos substratos.....	3
Caracterização dos habitat pesquisados.....	8
OBJETIVOS.....	11
Objetivo geral.....	11
Objetivos específicos.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO 1: SELEÇÃO DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS FERMENTADORAS DE D-XILOSE E CAPAZES DE METABOLIZAR HIDROLISADO HEMICELULÓSICO.....	17
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	20
Resultados e Discussão.....	24
Conclusões.....	29
Referências Bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 2: CRESCIMENTO CELULAR, FERMENTAÇÃO, TERMOTOLERÂNCIA E TOLERÂNCIA AO ETANOL POR TRÊS LINHAGENS DE LEVEDURAS AMAZÔNICAS FERMENTADORAS DE D-XILOSE.....	34
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	36
Resultados e Discussão.....	40
Conclusões.....	52
Referências Bibliográficas.....	52
CONCLUSÃO GERAL.....	56

Resumo

Foram isoladas leveduras a partir de diferentes habitats amazônicos, a saber, intestino de besouros da família Carabidae, conteúdo abdominal de cupins (*Nasutitermes sp.*), amostras de solos coletados em áreas de savanas (formação geomorfológica Boa Vista – RR) e em matas de terra firme (Manaus – AM). As leveduras foram isoladas segundo a capacidade de crescer *invitro* usando hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar (HACA) como fonte única de carbono, sendo selecionadas aquelas que fossem capazes de assimilar e fermentar D-xilose. Para tanto se utilizou meio de cultura composto por hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar (concentração de açúcar redutor total ajustada para 1%), suplementado por *Yeast Nitrogen Base* (YNB – 6,7 g/L) e Agar (20 g/L). A capacidade de assimilar D-xilose foi atestada pela técnica *replica-plating*, descrita por Barnett et al. (1990), cultivando as colônias isoladas em placas de Petri contendo D-xilose (50 mM), YNB (6,7 g/L) e Agar (20 g/L). A capacidade fermentativa foi testada em tubos de ensaio contendo meio YUKX líquido, composto por extrato de leveduras (1,5 g/L), uréia (1,25 g/L), KH_2PO_4 (1,1 g/L) e D-xilose (50 g/L). Em cada tubo de ensaio foi adicionado um tubo de Durham para retenção de gás liberado pela fermentação. Outro teste qualitativo de fermentação foi efetuado, cultivando as leveduras em tubos Falcon® de 50 mL contendo 10 mL de YUKX. Os tubos foram vedados com rolhas de borracha contendo um orifício fechado por uma mangueira. Após sete dias de cultivo, a mangueira foi aberta dentro de uma coluna de água, para evidenciar o desprendimento de gás pela atividade fermentativa. Foram isoladas ao todo 76 colônias de leveduras, sendo duas associadas a solos de savana, oito associadas a solos de florestas de terra firme, 12 associadas a besouros da família Carabidae e 54 associadas à *Nasutitermes sp.* Dentre estas, 28 foram capazes de assimilar D-xilose e três capazes de fermentar o referido açúcar, sendo duas associadas à Carabidae e uma a *Nasutitermes sp.* Estes resultados concordam com o que foi escrito anteriormente por Breznak (1982) e Blackwell (2004), os quais consideram que o trato digestivo de insetos xilófagos é uma rica fonte de microrganismos de interesse biotecnológico.

As três linhagens de leveduras, fermentadoras de D-xilose (LC27, IB04 e IB09) foram cultivadas em YUKX e em HACA, a fim de caracterizá-las quanto ao crescimento celular (mensurando a densidade ótica / $\lambda = 600 \text{ nm}$) e o consumo de açúcar redutor (quantificado pelo método DNS). O ensaio em fermentômetro foi executado para avaliação da perda de massa por desprendimento de CO_2 a fim de se estimar a produtividade de etanol. Avaliou-se ainda a termotolerância (choque térmico a 52 °C por 9 minutos) e tolerância ao etanol (cultivo estacionário por 7 dias em YPD + 20% etanol). Todos os experimentos foram feitos em duplicata, com pH inicial 5,5 e temperatura a 35 °C. O consumo de açúcar redutor total em HACA foi em média de 78,3%, enquanto que em YUKX o consumo médio foi de 55,9%. Quando cultivadas em HACA, as linhagens demonstraram ainda potencial de sacarificação, elevando a concentração de ART em até 48% durante as primeiras 8 horas de cultivo. As linhagens IB04 e IB09 são termotolerantes, apresentando viabilidade celular superior a 85%, enquanto que LC27 esses valores foram inferiores a 40%. O teste de tolerância ao etanol demonstrou resistência pelas três linhagens, com média de 81 unidades formadoras de colônia nas primeiras 24 horas, tornando-se incontáveis a partir das 48 horas. A evolução de CO_2 (valor médio de 3,2 g/L) permite estimar produção de etanol, mas com baixo rendimento, com estimativa de 3,34g/L. Todas apresentam potencial para utilização em processos biotecnológicos usando hidrolisado hemicelulósico como substrato.

Abstract

Yeasts were isolated from different Amazon habitat: beetles gut (Carabidae), midgut and hindgut of *Nasutitermes sp.*, soil samples from savanna (Boa Vista city, Roraima state) and Amazon rain forest. The yeasts were selected according to the capability of metabolize sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (HACA) as one carbon source, assimilate and fermenting D-xylose. To selective medium preparation, HACA was diluted until reducing sugar concentration was 1% and supplemented with Yeast Nitrogen Base (YNB – 6,7 g/L) and Agar (20 g/L). Xylose assimilating ability was investigated using replica-plating, as described by Barnett et al. (1990), using D-xylose (50 mM), YNB (6,7 g/L) and Agar (20 g/L). Fermenting capability was evaluated using flasks with 10 mL of YUKX medium (Yeast extract – 1,5 g/L; Urea – 1,25 g/L; KH_2PO_4 – 1,1 g/L and D-xylose – 50 g/L), containing a Durham tube. Another fermentation test was performed using Falcon® tubes (50 mL) with 10 mL of YUKX, sealed with rubber stopper. A valve allowed CO_2 liberation as fermentative evidence. A number of 76 colonies were isolated (2 from savanna, 8 from rain forest, 12 from Carabidae and 54 from *Nasutitermes sp.*), among these were detected 28 that have ability to growth on D-xylose as unique carbon source and 3 were able to ferment that sugar. These results agree with Breznak (1982) and Blackwell et al. (2004), which consider that insect gut (as termites and beetle) is a rich source of microorganisms that metabolize hemicelluloses for biotechnology purpose.

Three D-xylose fermenting strains isolated from Amazon insects (LC27, IB04 and IB09) were cultivated at HACA and YUKX medium. The cell growth and sugar consumption were evaluated using OD600 and DNS methods, respectively. Thermo tolerance and ethanol tolerance were investigated using heat-shock (52 °C, 9 minutes) and ethanol-shock (YPD + 20% ethanol during one week), evaluating cell viability. A fermenting assay was performed, monitoring CO_2 releasing to estimate ethanol production. Sugar consumption was 78,3% at HACA medium, while at YUKX was 55,9%. Both strains are able to do hemicellulosic hydrolysate saccharification, raising reducing sugar from 42,5 g/L up to 63 g/L. The cell viability after heat-shock was upper 85% for IB04 and IB09 strains, but LC27 had a cell-viability lower than 40%. The cultivation after ethanol shock shows tolerance by all tested strains. The fermenting assay allows estimate low ethanol yield, average about 3,34 g/L. These results indicate potential for biotechnological using of hemicellulosic derived.

Lista de Abreviações e Siglas

YUKX: Meio de cultura composto por Extrato de leveduras, Uréia, KH_2PO_4 e D-xilose.

HACA: Hidrolisado ácido hemicelulósico cana-de-açúcar.

YNB: Yeast Nitrogen Base, “Base Nitrogenada de Leveduras”, fonte de nitrogênio usado para teste de assimilação de açúcares.

DNS: Ácido 3,5 – Dinitro – Salicílico.

kgf/cm²: Quilograma de força por centímetro quadrado.

ART: Açúcar Redutor Total.

g/L: Unidade de concentração (gramas por litro)

x g: Fator de multiplicação da força da gravidade.

UFC: Unidades Formadoras de Colônia.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Rota metabólica para fermentação de D-xilose e L-arabinose (adaptado de HAHN-HÄGERDALL et al., 2007).

Figura 2: Curva padrão para dosagem de açúcar redutor total (mg/mL) pelo método DNS ($y=0,1035x + 0,0442$; $R^2=0,9979$).

Figura 3: Intestino de besouro Carabidae dissecado.

Figura 4: Extrusão do conteúdo abdominal de *Nasutitermes sp.*

Figura 5: Inoculação de *Nasutitermes sp.* em 1,0 mL de HACA+YNB líquido.

Figura 6: Sistema para teste de fermentação qualitativo, alternativo ao teste com tubo de Durham.

Figura 7: Teste de assimilação de D-xilose (*replica-plating*) para leveduras isoladas de solos de terra firme e intestino de Carabidae (A) e em associação com *Nasutitermes sp.* e de solos de savana (B). Colônias de leveduras em destaque demonstram assimilação de D-xilose..

Figura 8: Retenção de gás em tubo de Durham, evidenciando capacidade fermentativa de D-xilose pelo isolado LC27.

Figura 9: Curva de crescimento em YUKX das linhagens LC27, IB04 e IB09.

Figura 10: Consumo de açúcar redutor total em 96 horas de cultivo (meio YUKX).

Figura 11: Curva de crescimento em HACA.

Figura 12: Sacarificação e posterior consumo de açúcar redutor em hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar.

Figura 13: Evolução de CO₂ em YUKX.

Figura 14: Comparação da proporção de células viáveis de cada linhagem após choque térmico.

Figura 15: Semeadura em placas de Petri contendo YNBX (20 g/L de Agar) após 7 dias de cultivo estacionário em YPD + 20% (v/v) de etanol. A: LC27, B: IB04 e C: IB09.

Tabela 1: Prefixo de identificação de leveduras segundo o habitat do qual foram isoladas.

Tabela 2: Total de colônias isoladas separadas por habitat pesquisado.

Tabela 3: Taxa de Crescimento Específico, Consumo Relativo de Açúcar e Produtividade Celular dos cultivos em YUKX (valores máximos).

Tabela 4: Açúcar consumido por hora a cada intervalo de 12 horas.

Tabela 5: Taxa de Crescimento Específico, Consumo Relativo de Açúcar e Produtividade Celular dos cultivos em HACA (valores máximos).

Tabela 6: Taxa de açúcar consumido por hora ao longo do cultivo em HACA.

Tabela 7: Evolução de CO₂.

Tabela 8: Contagem de colônias em 24 horas após 3 (t₁), 6 (t₂) e 9 (t₃) minutos de choque térmico (52 °C).

Tabela 9: Contagem de colônias formadas em 24 horas após 7 dias de incubação em YPD + etanol (20% v/v)

INTRODUÇÃO

Aquecimento global, combustíveis fósseis e etanol.

Em meados da década de 70, o preço do barril de petróleo forçou os governos a buscarem combustíveis alternativos. O etanol, até então visto como subproduto da cana-de-açúcar, ganhou destaque como fonte de energia. O decreto nº. 76.593 de 14 de novembro de 1975 instituiu o Pró-álcool, programa pelo qual o governo federal estimulava a produção de etanol combustível a partir de cana-de-açúcar. Na década de 80, o preço do barril de petróleo decresceu em mais de 50%, tornando o álcool não-competitivo. Houve desabastecimento do mercado, haja vista a produção de etanol tenha se mantido constante e a produção de automóveis movidos a álcool tenha crescido. Até a metade da década de 90 o Pró-álcool atravessou uma fase de estagnação. (Biodieselbr.com)

Com os olhos do mundo voltados para o acúmulo de gases que provocam efeito estufa na atmosfera terrestre (pelo conseqüente aumento da temperatura global), a adição de etanol a gasolina, bem como a substituição deste hidrocarboneto fóssil pelo etanol, tornaram-se alternativas atraentes, levando novamente a produção de álcool a ocupar lugar de destaque no cenário econômico mundial. Estima-se que o uso de etanol representou de 1975 a 2000, uma economia de divisas da ordem de 11,5 bilhões de dólares. Acrescido a isso, foram evitadas nesse período emissões de cerca de 110 milhões de toneladas de carbono (contido no CO₂) e a importação de aproximadamente 550 milhões de barris de petróleo. (Biodieselbr.com)

Microrganismos e fermentação:

Leveduras são microrganismos integrantes do reino Fungi, predominantemente unicelulares e com reprodução assexuada por brotamento, pertencentes aos fillos Basidiomycota e Ascomycota, e com alguns exemplares no filo forma Deuteromycota (ALEXOPOULOS et al., 1996). Diversas espécies podem apresentar forma filamentosa em algum momento do ciclo de vida, e os fillos dicarióticos, Basidiomycota e Ascomycota, correspondem a 98% de todas as espécies descritas, sendo 34 e 64% respectivamente (STAJICH et al., 2009).

A arte da fermentação usando a capacidade fermentativa destes microrganismos é muito antiga. A capacidade das leveduras de produzir álcool na fabricação de cerveja já era conhecida pelos Sumérios e Babilônicos antes de 6000 a.C. Mais tarde, por volta de 4000 a.C., os egípcios descobriram que as leveduras poderiam ser usadas como fermento na panificação, processo que hoje sabemos deve-se a liberação de dióxido de carbono decorrente da fermentação de açúcares livres (DEMAIN & SOLOMON, 1981).

No contexto atual, as constantes flutuações no preço do petróleo no mercado internacional e a urgência em reduzir a emissão de gases que provocam efeito-estufa criam a necessidade da produção de combustíveis renováveis que poluam pouco e sejam economicamente viáveis. Os biocombustíveis, isto é, combustíveis baseados em biomassa, atendem a estes pré-requisitos. Entre estes, o etanol de cana-de-açúcar apresenta o maior rendimento de energia por unidade energética empregada, bem como menor demanda de área de plantio por veículo alimentado (SAGAR & KARTHA, 2007). Goldemberg (2008) argumenta que a substituição da gasolina pelo etanol de cana-de-açúcar reduziria em 91% a emissão de gases do efeito estufa.

O caldo de cana, uma solução aquosa de açúcares onde o mais abundante é a sacarose, é fermentado a etanol. A seguir o fermentado é destilado para separação do álcool formado, empregando grandes volumes de água no resfriamento. De acordo com Pimentel e Patzek (2007),

a produção de 1000 litros de etanol (99,5% de pureza) requer o emprego de 21000 litros de água, desde a moagem até a destilação.

Os substratos tradicionalmente utilizados nos processos de fermentação etílica são tipicamente ricos em hexoses. A utilização destes açúcares como fonte de carbono para fermentação é amplamente difundida, com bioprocessos otimizados. A produção de etanol utilizando pentoses como xilose e arabinose, abundantes na hemicelulose, carece de otimização, havendo poucos microrganismos com conhecida capacidade de fazê-lo. O isolamento de microrganismos capazes de metabolizar pentoses constitui o primeiro passo para identificação de sua capacidade fermentativa.

Indústria da fermentação e novos substratos:

Resíduos agrícolas e industriais (indústria de celulose e papel, por exemplo) são matérias-primas utilizáveis pelos microrganismos fermentadores. A utilização destes para produção de etanol reduziria a liberação de resíduos sólidos para o meio ambiente e seria interessante do ponto de vista econômico, devido ao baixo custo dos resíduos. Resíduos agrícolas de vegetais amplamente cultivados, como soja (*Glycine max* L.) e milho (*Zea mays* L), podem servir de matéria-prima para obtenção de substratos à fermentação alcoólica (SCHIRMER-MICHEL et al. 2007; MONIRUZZAMAN et al. 1997).

O Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar (CUNHA et al. 2006), tem o caldo de cana como principal fonte de carbono para fermentação alcoólica. Recentemente, a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar tem sido criticada por autoridades internacionais, sob os argumentos de promover o desmatamento da Floresta Amazônica para abertura de novas áreas de plantio, e de comprometer a produção de alimentos pela ocupação de áreas agricultáveis. Neste contexto, a

utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais torna-se uma alternativa interessante, podendo aumentar a produção de etanol por área cultivada.

O bagaço da cana-de-açúcar é o principal resíduo agrícola brasileiro, com produção anual estimada entre 5 e 12 milhões de toneladas. Este contém um terço de toda a energia da cana-de-açúcar (GOLDEMBERG, 2008), e sua utilização para fermentação poderá elevar a produção de etanol do Brasil, que corresponde a cerca de 33% da produção mundial (CERQUEIRA LEITE et al., 2008), entre 7 e 12% (TAKAHASHI et al., 2000). Para Rossell (2007) o domínio da tecnologia de fermentação do bagaço e da palha de cana-de-açúcar pode elevar a produção de etanol em até 40%, sem a necessidade de aumentar a área plantada em único hectare até 2025; aumentando a participação do etanol no PIB para valores entre US\$ 250 e US\$ 300. Além disso, se pelo menos a metade do bagaço de cana produzido no Brasil fosse empregado na produção de etanol, a necessidade de uso da terra seria reduzida entre 33 e 38%, gerando cerca de 3,7 a 4,0 mil litros a mais por hectare cultivado (CERQUEIRA LEITE et al., 2008).

A composição do bagaço é variável de acordo com as condições ambientais, mas cerca de 30-35% deste corresponde a hemicelulose (TAKAHASHI et al., 2000). Segundo Saha (2003), a hemicelulose corresponde de 20 a 40% do bagaço de cana-de-açúcar. É formado de polímeros heterogêneos de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e açúcares ácidos. É o segundo mais importante polissacarídeo estrutural dos vegetais superiores, sendo menos abundante apenas que a celulose. A proporção de cada carboidrato na hemicelulose também é variável, mas a xilose ocupa sempre lugar de destaque. Em alguns tipos de madeira, a xilose chega a representar 89,3% dos carboidratos componentes da hemicelulose (SAHA, 2003). Cheng et al. (2007), obtiveram xilose em torno de 56% dos componentes resultantes da hidrólise ácida de bagaço de cana. Outros autores obtiveram entre 72 e 82% de D-xilose no conteúdo de açúcar redutor total em hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar (CANILHA et al., 2009; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009).

A hidrólise é o processo empregado para sacarificação, isto é, tornar os carboidratos poliméricos em açúcares solúveis disponíveis à fermentação. A hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pode ser feita por meio de auto-hidrólise, hidrólise enzimática e hidrólise ácida, pela adição de ácidos inorgânicos diluídos. A auto-hidrólise consiste em tratamento por choque térmico a temperaturas superiores a 190 °C, resultando na conversão de hemicelulose a xilo-oligossacarídeos. A hidrólise enzimática é feita pela mistura de certa quantidade de enzimas ao substrato lignocelulósico, liberando açúcares fermentáveis. O problema destes processos estão principalmente no custo, pela intensa produção de calor, necessária à auto-hidrólise, e o preço elevado das enzimas, bem como os investimentos na manutenção de temperatura e pH ótimos a atividade enzimática. Além disso, as enzimas hemicelulolíticas não podem ser usadas na hidrólise direta, pois são inibidas pela estrutura cristalina da lignocelulose, sendo necessário empregar pré-tratamento físico ou químico para obtenção de hidrólise completa (PANDEY et al., 2000; WHITE et al., 2008; CANILHA et al., 2009). A utilização de ácidos inorgânicos diluídos, como HCl, HNO₃ e H₂SO₄, levam a hidrólise quase completa da fração hemicelulósica em unidades monoméricas de pentoses e hexoses (WHITE et al., 2008).

A hidrólise ácida gera muitos inibidores ao crescimento microbiano, como furfural, hidroximetilfurfural, ácidos fórmico, levulínico e acético. Para tornar o crescimento microbiano viável, diversas técnicas de detoxificação podem ser empregadas. Entre estas temos centrifugação, filtração, adição de carvão ativado, biodetoxificação, eletrodialise e correção do pH por adição de hidróxido de cálcio (CANILHA et al., 2009; HOU-RUI et al., 2009).

A correção do pH pela adição de cal é a alternativa mais barata. O processo consiste na adição da base, elevando o pH a valores entre 8 e 11, seguido de posterior reacidificação ou fermentação direta em condição alcalina (CARVALHO LIMA et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; MOHAGHEHI et al., 2006). Algumas técnicas de detoxificação podem ainda provocar a redução na concentração de açúcar redutor entre 5 e 12% (CANILHA et al., 2009)

Logo, hidrolisados hemicelulósicos desintoxicados por técnicas simples, como a correção do pH por adição de hidróxido de cálcio, apresentam elevados teores de inibidores, podendo ser empregados como meios seletivos para microrganismos de alta resistência. Esta característica pode baratear os produtos biotecnológicos de valor agregado baseados em hidrolisados hemicelulósicos, haja vista a redução nos investimentos necessários à detoxificação.

Segundo Dien et al. (1998), os microrganismos tradicionalmente usados na fermentação para produção de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*, fermentam hexoses com eficiência, mas são incapazes de metabolizar pentoses. Apesar do número relativamente grande de espécies com conhecida capacidade de fermentar pentoses, menos de 1% destas é capaz de produzir etanol a partir de xilose (HAHN-HÄGERDALL et al., 2007).

O metabolismo de pentoses por fungos consiste na produção de D-xilulose-5-fosfato através de uma cascata enzimática (Figura 1), a qual será metabolizada pela via das pentoses fosfato e posteriormente reduzida a etanol (HAHN-HÄGERDALL et al., 2007).

Leveduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* podem fermentar xilose a etanol (MONIRUZZAMAN et al. 1997), e *P. tannophilus* é bastante promissora para produção de etanol usando hidrolisados lignocelulósicos (CHENG et al., 2007). Todavia, a eficiência da produção de etanol lignocelulósico por estas espécies ainda é baixa se comparada à fermentação alcoólica de glicose por *Saccharomyces cerevisiae* (AGBOGBO et al., 2006).

Segundo Lebeau et al. (1997), embora incapaz de produzir etanol a partir de xilose, na presença de co-fatores como a glicose, *S. cerevisiae* pode utilizá-la para produzir xilitol, um açúcar / álcool que pode ser utilizado na redução de cárie dentária e que possui grande potencial adoçante, podendo ser usado para conferir sabor a alimentos destinados a diabéticos ou em dietas hipocalóricas (SAHA, 2003).

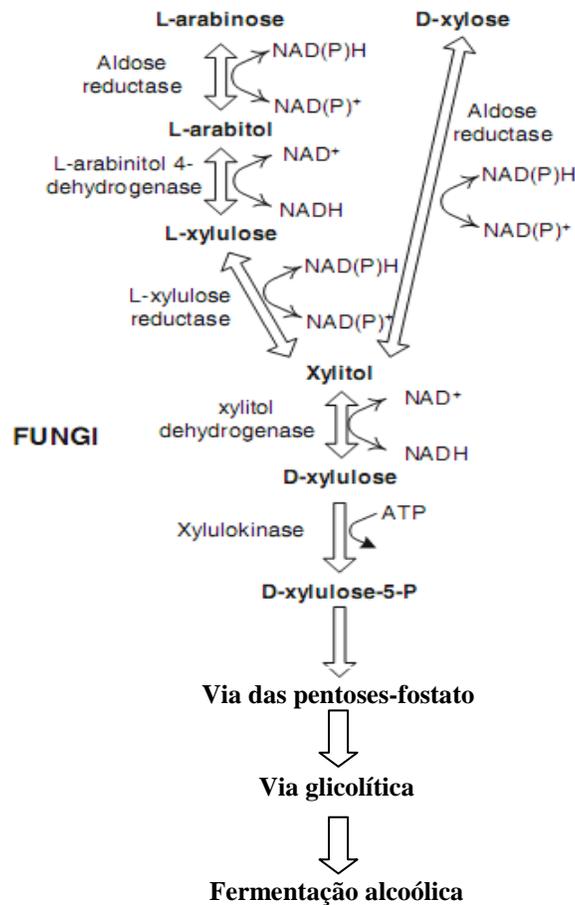


Figura 1: Rota metabólica para fermentação de D-xilose e L-arabinose (extraído de HANH-HAGERDALL et al., 2007).

A pesquisa biotecnológica genética busca atualmente a produção de enzimas e/ou microrganismos recombinantes, por engenharia genética, que possam ser empregados na fermentação de pentoses com produção de etanol economicamente viável. Empregando linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* na fermentação alcoólica de D-xilose, Moniruzzaman et al. (1997) obtiveram produção correspondente a 66% do máximo teórico de etanol. Katahira et al. (2006), desenvolveram uma linhagem recombinante de levedura utilizando os genes das enzimas xilose reductase, xilitol desidrogenase (ambos de *Pichia stipitis*), xiluloquinase (de *Saccharomyces cerevisiae*) e β -glicosidase (de *Aspergillus aculeatus*). Esta foi capaz de fermentar completamente xilose e celooligossacarídeos em 36 horas, obtendo 0,39 g de etanol por grama de açúcar. Matsushika et al. (2008) produziram uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de consumir 97% da

xilose presente no meio, com produtividade de etanol em valores equivalentes a 69% do máximo teórico. O problema das linhagens recombinantes diz respeito principalmente a sua instabilidade nos processos fermentativos ou em culturas contínuas (DIEN et al., 1998), além de todas as incertezas a respeito do comportamento de um microrganismo recombinante em condições naturais.

O microrganismo ideal, portanto, será aquele capaz de produzir etanol utilizando hexoses e pentoses geradas da hidrólise de lignocelulose (CHENG et al., 2007), apresentando tolerância ao etanol e aos inibidores microbianos gerados durante os processos hidrolíticos de resíduos lignocelulósicos.

Caracterização dos habitat pesquisados:

Para este trabalho, foram considerados os seguintes *habitat* no contexto Amazônico: amostras de solo de savanas amazônicas e de florestas de terra firme, conteúdo intestinal de cupins e coleópteros que se alimentem de madeira.

As matas de terra firme são áreas cobertas por florestas densas que não são inundadas com a mesma regularidade da várzea. Apesar da exuberante flora de espermatófitas, o solo da Floresta Amazônica é considerado pobre. Sioli (1991) justifica a exuberância da floresta Amazônica afirmando que esta não vive do solo, mas sim sobre ele. A floresta é suprida pela decomposição da matéria orgânica principalmente vegetal, oriunda do dossel, decomposta pela intensa atividade microbiana nas camadas mais superficiais do solo.

De acordo com Barbosa (2001), savanas são “formações tropicais e subtropicais com cobertura graminóide contínua, ocasionalmente interrompida por árvores e arbustos e, que existem na África, América Latina, Ásia e Austrália”. As savanas podem ser classificadas em savana gramíneo-lenhosa, savana parque e savana estépica-parque. Neste trabalho serão utilizadas

amostras de solos de savanas gramíneo-lenhosas da formação geomorfológica denominada Formação Boa Vista, com predominância de vegetação graminosa, incluindo diversas espécies de Cyperaceae e pequenas ervas (AB`SABER, 1997, *apud* BARBOSA, 2001). O solo é classificado como Latossolo amarelo, considerado muito argiloso e de grande expressão geográfica na Amazônia (SOUSA et al., 2004).

A co-evolução entre insetos e plantas diz respeito tanto a associações harmônicas (polinização e dispersão) quanto desarmônicas (predação e parasitismo). Várias ordens de insetos apresentam parasitismo em vegetais em pelo menos uma etapa do ciclo de vida. Para cada aquisição evolutiva de defesa das plantas, uma nova apomorfia é selecionada entre os insetos para que estes assegurem sua sobrevivência. A associação entre insetos e microrganismos foi sem dúvida um passo decisivo na evolução deste grupo, haja vista a capacidade de produzir enzimas que degradem polissacarídeos estruturais de plantas ser sabidamente baixa entre os animais (RUPPERT et al., 2005).

Blackwell et al. (2004) encontraram diversas leveduras associadas ao intestino de besouros da família Passalidae, coletados na América Central. Entre estas, uma intimamente relacionada à *Pichia stipitis*, conhecida pela sua capacidade de assimilar e fermentar xilose. É admissível que a associação entre besouros que se alimentam de madeira e leveduras capazes de fermentar xilose seja benéfica aos besouros.

Alguns cupins cultivam basídios na madeira em que constroem seus ninhos. O fungo cresce ao longo da madeira, degradando-a para posterior alimentação dos cupins. Em outras ordens de insetos, formas juvenis ingerem as fezes das formas adultas, adquirindo a microbiota intestinal, que é decisiva na capacidade de digestão e assimilação de polissacarídeos vegetais (RUPPERT et al., 2005). A endossimbiose de cupins e microrganismos também é conhecida. Fortes evidências apontam que o maior volume de assimilação de polissacarídeos ocorre no intestino posterior dos cupins, e que tal atividade é dirigida pela microbiota associada a esta região do intestino.

No início dos anos 1980, estimava-se que o estudo da microbiota intestinal de cupins forneceria novas estratégias para bioconversão anaeróbia de madeira a combustíveis e outros produtos químicos de valor agregado (BREZNAK, 1982).

O lúmen intestinal de insetos que possuem uma dieta rica em madeira é, sem dúvida, um provável habitat para microrganismos que metabolizam, entre outros carboidratos, as pentoses presentes na hemicelulose.

A biodiversidade amazônica possui números estimados para metazoários e vegetais, mas a diversidade microbiana da Amazônia, particularmente no que diz respeito aos fungos, permanece com números inestimáveis. As novas técnicas de estudo de diversidade microbiana permitem inferir que em 1,0 g de solo existam mais de 10^4 genomas diferentes (TORSVIK et al., 1998).

Considerando a Amazônia como detentora da maior concentração de biodiversidade do planeta, bem como a imensurável quantidade de matéria orgânica vegetal diariamente decomposta em seus domínios, é razoável estimar que, entre os diversos *Taxa* que habitam a maior floresta tropical do mundo, sua desconhecida microbiota abrigue microrganismos capazes de metabolizar xilose e outras pentoses de origem hemicelulósica para produzir etanol e outros produtos de interesse biotecnológico.

Dada a importância que as pentoses, especialmente a xilose, assumem hoje como fonte alternativa para a produção de etanol a partir de recursos renováveis e abundantes, como os resíduos agrícolas com potencial poluidor, este trabalho propôs-se a isolar microrganismos capazes de metabolizá-la, fornecendo ferramentas para o posterior desenvolvimento de bioprocessos. A obtenção de uma levedura capaz de produzir etanol a partir de xilose traduzir-se-á, a médio ou longo prazo, em maior produção de etanol por hectare cultivado, possibilitando a utilização de resíduos agrícolas, evitando assim o desmatamento e/ou a ocupação de áreas cultiváveis pelo plantio de cana, disponibilizando-as para produção de outros alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Obter, a partir da Diversidade Microbiana Amazônica, leveduras capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, selecionando-as segundo a capacidade de metabolizar D-xilose para produção de etanol.

Objetivos específicos

- Isolar de diferentes ambientes do bioma Amazônia leveduras capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, produzido por hidrólise ácida;
- Caracterizar qualitativa e quantitativamente os isolados quanto à assimilação de D-xilose e açúcar redutor total em hidrolisado hemicelulósico;
- Quantificar o crescimento e viabilidade celular utilizando hidrolisado ácido hemicelulósico de cana-de-açúcar e D-xilose como fonte única de carbono;
- Determinar a produtividade celular (massa de células / massa de açúcar consumido) e caracterizar o perfil da assimilação de açúcar (açúcar consumido / intervalo de tempo);
- Determinar a velocidade de crescimento (μ_{MAX}) durante a fase *log* da curva de crescimento;
- Estimar a produção de etanol, segundo a evolução de CO₂, por ensaio em fermentômetro;
- Preservar os isolados em coleção de cultura pelos métodos de Castellani e em Glicerol 25%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBOGBO, Frank K.; COWARD-KELLY, Guillermo; TORRY-SMITH, Mads; WENGER, Kevin S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. In **Process biochemistry**. Nº 41: 2333-2336. 2006.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4^a ed. John Wiley & Sons, New York: 1996.
- BARBOSA, Reinaldo Imbrózio. **Savanas da Amazônia: emissão de gases do efeito estufa e material particulado pela queima e decomposição da biomassa acima do solo, sem a troca do uso da terra em Roraima, Brasil**. Manaus: INPA/UA, 2001. Tese de Doutorado em Ecologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia / Universidade do Amazonas, 2001.
- Biodieselbr.com. <<<http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool.htm>>> Acessado em 06 de março de 2008.
- BLACKWELL, Meredith; SUH, Sung-Oui; WHITE, Merlin M.; NGUYEN, Nhu H. The status and characterization of *Enteroramus dimorphus*: a xylose-fermenting yeast attached to the gut of beetles. In **Mycologia**. Nº 96, v. 4, p. 756–760, 2004.
- BREZNAK, John A. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. In **Ann. Rev. Microbiol.** Nº 36, p. 323-343, 1982.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** DOI 10.1007/s12010-009-8792-8. 2009.
- CARVALHO, J.R.; MARTON, J.M.; SILVA, F. e MARIA das GRAÇAS, A. Avaliação do Sistema Combinado de Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de

Cana-de-Açúcar com Carvão Ativo e Resinas de Troca Iônica para sua Utilização como Meio de Fermentação. **Revista Analytica**. 18: 48-55. 2005.

- CARVALHO LIMA, K.G.; TAKAHASHI, C.M. e ALTERTHUM, F. Ethanol production from corn cob hydrolysates by *Escherichia coli* KO11. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 29: 124 – 128. 2002.
- CERQUEIRA LEITE, R. C., LEAL, M. R. L. V., CORTEZ, L. A. B., GRIFFIN, W. M., SCANDIFFIO, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**. 2008. DOI: [10.1016/j.energy.2008.11.001](https://doi.org/10.1016/j.energy.2008.11.001)
- CHENG, Ke-Ke; GE, Jing-Ping; ZHANG, Jian-An; LING, Hong-Zhi; ZHOU, Yu-Jie; YANG, Ming-De; XU, Jing-Ming. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. In **Biotechnol lett**. N° 29, p. 1051-1055, 2007.
- CUNHA, A.F.; MISSAWA, S.K.; GOMES, L.H.; REIS, S.F. e PEREIRA, G.A.G. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. **FEMS Yeast Res**. 6: 280–287. 2006. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00038.x
- DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. Industrial microbiology: Introducing an issue on the making of food, drink, pharmaceuticals and industrial chemicals by microorganisms, with special reference to newer methods of programming the microorganisms for their task. In **Scientific American**. N° 3, v. 245, p. 43–52, 1981.
- DIEN, Bruce S.; HESPELL, Robert B.; WYCKOFF, Herbert A.; BOTHAST, Rodney J. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. In **Enzyme and microbial technology**. N° 23, p. 366-371, 1998.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian Biofuels industry. In **Biotechnology for Biofuels**. [doi:10.1186/1754-6834-1-6](https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-6), 2008.

- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology**. 74:937–953. 2007. DOI 10.1007/s00253-006-0827-2
- HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A. e TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology** 100: 1238–1245. 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.062
- HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S.S.; SARROUH, B.F.; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J. e QIU, X. Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology**. 152:199–212. 2009. DOI 10.1007/s12010-008-8249-5
- KATAHIRA, Satoshi; MIZUIKE, Atsuko; FUKUDA, Hideki; KONDO, Akihiko. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose and celloligosaccharide-assimilating yeast strain. *In* **Appl Microbiol Biotechnol**. N° 72, p. 1136-1143, 2006.
- LEBEAU, Thierry; JOUENNE, Thierry; JUNTER, Guy-Alain. Fermentation of D-xilose by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *In* **Biotechnology letters**. v. 19, p. 615-618, 1997.
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. 2008. DOI:10.1016/j.biortech.2008.11.047

- MOHAGHEGHI, A.; RUTH, M. e SCHELL, D.J. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. **Process Biochemistry**. 41: 1806–1811. 2006.
- MONIRUZZAMAN, M.; DIEN, B. S.; SKORY, C. D.; CHEN, Z. D.; HESPELL, R. B.; HO, N. W. Y.; DALE, B. E.; BOTHAST, R. J. Fermentation of corn fibre by an engineered xylose utilizing *Saccharomyces* yeast strain. *In* **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Nº 13, p. 341-346, 1997.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. e SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. 74: 69–80. 2000.
- PIMENTEL, D. e PATZEK, T. Ethanol Production: Energy and Economic Issues Related to U.S. and Brazilian Sugarcane. **Natural Resources Research**. Vol. 16, No. 3: 235-242. 2007. DOI: 10.1007/s11053-007-9049-2
- ROSSELL, C. E. V. O futuro energético do país está no bagaço. *In* **Jornal da UNICAMP**. 05 a 11 de março de 2007. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- RUPPERT, Edward E.; FOX, Richard S.; BARNES, Robert D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª ed. São Paulo: Roca, 2005.
- SAGAR, A.D. e KARTHA, S. Bioenergy and Sustainable Development? **Annual Review Environmental Resource**. 32: 131–167. 2007.
- SAHA, Badal C. Hemicellulose bioconversion. *In* **J Ind Microbiol Biotechnol**. Nº 30, p. 279–291, 2003.
- SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLORES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**. Nº 99, p. 2898–2904, 2007.

- SIOLI, Harald. **Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais**. 3ª ed. Petrópolis: Vozes, 1991.
- SOUSA, Zigomar M.; LEITE, José A.; BEUTLER, Amauri N. Comportamento de atributos físicos de um latossolo amarelo sob agroecossistemas do Amazonas. *In* **Engenharia Agrícola**. Jaboticabal. Nº 30, v. 24, p. 654-662, 2004.
- STAJICH, J.E.; BERBEE, M.L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D.S.; JAMES, T.Y. SPATAFORA, J.W. e TAYLOR, J.W. The Fungi. **Current Biology**. V. 19, Nº 18: 840-845. 2009.
- TAKAHASHI, Caroline Maki; LIMA, Katia Gianni de Carvalho; TAKAHASHI, Debora Fumie; ALTERTHUM, Flavio. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Nº 16: 829-834, 2000.
- TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; ØVREÅS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**. 64: 53–62. 1998.
- WHITE, J.S.; YOHANNAN, B.K. e WALKER, G.M. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. **FEMS Yeast Research**. 8: 1175–1184. 2008. DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00390.x

Capítulo 1: Seleção de Leveduras Amazônicas Fermentadoras de D-Xilose e Capazes de Metabolizar Hidrolisado Hemicelulósico.

Introdução

Leveduras são organismos do reino Fungi, pertencentes às divisões Ascomycota, Basidiomycota e alguns representantes no filo forma Deuteromycota (ALEXOPOULOS et al., 1996). As duas primeiras correspondem respectivamente a 64 e 34% das espécies de fungos descritas. Algumas leveduras podem apresentar fases do ciclo de vida na forma filamentosa. A maioria das leveduras de interesse industrial pertence ao subfilo Saccharomycotina (STAJICH et al., 2009).

O emprego de fungos na indústria de fermentação dá-se nas mais diversificadas áreas como no enriquecimento protéico da ração animal, produção de biomassa para suplementação e alimentação humana e processos fermentativos na produção de enzimas, combustíveis e outros produtos baseados na fermentação (PANDEY et al., 2000a). Entre as diferentes matérias-primas que podem ser empregados como substratos para exploração deste potencial encontram-se os resíduos agrícolas como vagem de soja (SCHIRMER-MICHEL et al., 2007), mandioca, casca de café, polpa de beterraba e maçã e bagaço de cana-de-açúcar (PANDEY et al., 2000b). Este último é o mais importante resíduo agrícola brasileiro. Takahashi et al. (2000) estimam que a produção anual varia entre 5 e 12 milhões de toneladas, de acordo com a safra.

As aplicações biotecnológicas do bagaço de cana-de-açúcar vão desde a simples combustão para produção de energia termelétrica nas usinas de álcool e açúcar (RÍPOLI et al., 2000) passando pela utilização como ração animal até a hidrólise para posterior fermentação etílica (DIAS et al., 2009). O bagaço contém em torno de 1/3 de toda a energia presente na cana (GOLDEMBERG, 2008) e sua constituição química é variável de acordo com as condições ambientais, mas segundo Saha (2003), entre 20 e 40% deste corresponde a hemicelulose. Este polissacarídeo é formado de

heteropolímeros de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e açúcares ácidos. É o segundo mais importante polissacarídeo estrutural dos vegetais superiores, sendo menos abundante apenas que a celulose. A proporção de cada carboidrato na hemicelulose também é variável, mas a xilose ocupa sempre lugar de destaque. De acordo com o tipo de hidrólise e com o procedimento empregado na desintoxicação, a proporção de xilose em relação aos açúcares totais presentes em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pode oscilar de 56 (CHENG et al., 2007) a até 82% (HERNANDEZ-SALAS et al., 2009).

Os processos de hidrólise visam a sacarificação, isto é, a liberação dos monossacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica para sua posterior fermentação. A hidrólise pode ser feita por tratamento térmico (± 190 °C); enzimático, pela ação de hemicelulases; ou pela adição de ácidos inorgânicos diluídos, com temperaturas entre 90 e 130 °C. Quando comparados a este último, os dois primeiros processos de hidrólise são extremamente dispendiosos, por conta da quantidade de calor requerida ou pela manutenção das condições ótimas para atividade enzimática (CANILHA et al., 2009). Outra inconveniência da hidrólise enzimática é que as quantidades de enzima empregadas devem ser muito altas, encarecendo ainda mais o processo (PANDEY et al., 2000a).

A hidrólise ácida pode empregar diversos ácidos inorgânicos, principalmente HCl, HNO₃ e H₂SO₄. A utilização de ácido sulfúrico pode ser mais vantajosa pelo fato deste ácido dissociar dois prótons H⁺, o dobro dos outros ácidos (WHITE et al., 2008).

Os processos de hidrólise ácida consistem essencialmente na mistura de bagaço moído e desidratado, proporção sólido:líquido variando entre 1:10 e 2:10, com solução de ácido sulfúrico diluído à concentração de 1 a 3% (v/v) (TAKAHASHI et al., 2000. DUARTE et al., 2008. WHITE et al., 2008). Este processo gera diversos inibidores do crescimento microbiano, sendo necessário empregar técnicas físicas e/ou químicas para remoção destes, tais como centrifugação, neutralização com hidróxidos, eletrodialise e adição de carvão ativado. Estas apresentam

limitações, havendo boas alternativas na biodetoxificação, isto é, a utilização de microrganismos que assimilem estes inibidores (HOU-RUI et al., 2009).

O Brasil desponta como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, respondendo por 33% da produção mundial de álcool (CERQUEIRA LEITE et al., 2008). Ainda assim a necessidade de competitividade no mercado internacional cria a demanda de expansão da produção. Diversos estudos são realizados no sentido de elevar a produção brasileira de etanol sem comprometer a preservação ambiental nem a produção de alimentos (GOLDEMBERG, 2008). Segundo Rossell (2007), “o futuro energético do País está no bagaço”, com a expectativa de que o domínio das tecnologias de fermentação das pentoses presentes no hidrolisado hemicelulósico eleve a atual produção brasileira de etanol em 40% até 2025.

A fermentação de glicose e outras hexoses a etanol é uma tecnologia amplamente dominada. Polímeros como amido e celulose, quando hidrolisados, liberam moléculas de glicose que podem ser fermentadas com relativa facilidade por *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura mais comumente empregada na usina alcooleira. Todavia a fermentação alcoólica das pentoses, abundantes nos hidrolisados hemicelulósicos, só pode ser feita por um número relativamente baixo de leveduras do gênero *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen* e *Pichia*, com eficiência ainda não equiparável a fermentação de hexoses (YABLOCHKOVA et al., 2003).

Diversos trabalhos têm sido realizados no sentido de construir linhagens recombinantes de bactérias e leveduras pela expressão de enzimas oriundas de espécies selvagens fermentadoras de pentoses. Todavia a utilização de microrganismos transgênicos esbarra na sua falta de estabilidade fenotípica (DIEN et al., 1998), o que torna a seleção de linhagens selvagens fermentadoras de pentoses uma boa alternativa para solução desse problema.

O microrganismo ideal é aquele capaz de fermentar pentoses e hexoses (CHENG et al., 2007) e que apresente elevada tolerância aos inibidores formados durante a hidrólise ácida.

Neste contexto, a ciência deve concentrar esforços no sentido de selecionar linhagens selvagens (*wild-type*) capazes de metabolizar hidrolisados hemicelulósicos quer para emprego direto no pré-tratamento e/ou fermentação, quer como fontes ou hospedeiros de genes.

Objetivou-se com este trabalho selecionar leveduras em diferentes *habitat* amazônicos capazes de assimilar os açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar (HACA), as assim como as capazes de assimilar e fermentar D-xilose.

Material e Métodos

Preparo do hidrolisado e meio de cultura:

O hidrolisado foi preparado embebendo-se 100g de bagaço de cana-de-açúcar desidratado e triturado (espessura $\leq 1,0\text{mm}$) em 400 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 3% (v/v) por 24 horas (2,5:10 p/v entre bagaço de cana e ácido sulfúrico). Decorrido este prazo, a mistura foi autoclavada a $1,1 \text{ kgf/cm}^2$ ($121 \text{ }^\circ\text{C}$) por 40 minutos. A seguir o material foi prensado, coletada a fase líquida e descartada a fase sólida. A fase líquida teve o pH, cujo valor inicial era de $0,8 \pm 0,1$, corrigido para 5,5 pela adição de solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1,0 M. O sal formado durante a neutralização foi separado por filtração a vácuo.

O HACA obtido teve o açúcar redutor total (ART) dosado pelo método Ácido 3,5 – Dinitro - Salicílico (DNS) (BERTOLINI et al., 1991 *apud* ZHAO et al., 2008). Em um microtubo coletou-se 20 μL da amostra diluída dez vezes (10x), acrescentou-se 180 μL de H_2O destilada e 300 μL de solução de ácido dinitro-salicílico. O sistema foi fervido em banho-maria por 5 minutos e, a seguir, adicionou-se 1,0mL de H_2O destilada. A solução foi submetida à leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 550\text{nm}$) e a concentração de ART calculada conforme a curva padrão apresentada na figura 2, elaborada usando D-xilose como açúcar padrão.

O rendimento de ART (R_{ART}) por grama de biomassa foi calculado segundo descrito por Hernández-Salas et al. (2009), aplicando-se a fórmula $[R_{ART}=(C.V/W).100]$, onde C é a concentração de ART (g/L), V é o volume final recuperado de hidrolisado (L) e W é o peso seco de bagaço usado para hidrólise.

O meio seletivo foi preparado por diluição do HACA, ajustando-se a concentração de açúcar redutor total para a concentração de 1% (p/v) adicionado de Yeast Nitrogen Base (YNB, 6,7g/L) e Agar (20 g/L).

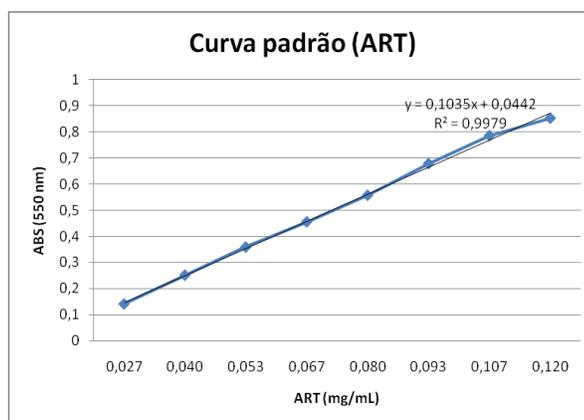


Figura 2: Curva padrão para dosagem de açúcar redutor total (mg/mL) pelo método DNS ($y=0,1035x + 0,0442$; $R^2=0,9979$)

Cultivo, Isolamento e Seleção:

As leveduras foram selecionadas segundo a capacidade de metabolizar os açúcares presentes no hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar (HACA) a partir de quatro ambientes amazônicos: solos de savanas, solos de matas de terra firme, intestino de besouros xilófagos e cupins. Todas as coletas foram executadas com autorização prévia das autoridades competentes, conforme os documentos N° 21164-1 e 22163-1, obtidos junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade por via eletrônica (www.icmbio.gov.br/sisbio).

As amostras de solo de savana foram coletadas na área experimental do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Roraima, numa área não manejada de savana gramíneo-lenhosa da Formação Boa Vista, com predomínio de vegetação graminosa nativa, incluindo

diversas espécies de Cyperaceae e pequenas ervas (BARBOSA, 2001). As amostras de solos de florestas de terra firme foram coletadas no campus da Universidade Federal do Amazonas (Manaus – AM), em área de floresta primária e coberta pela liteira.

Um total de dez amostras de solos de cada ecorregião (savana e mata de terra firme) foi coletado com uso de trado à profundidade de até 15 cm. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos (pré-esterilizados por exposição à luz UV durante 30 minutos) e homogeneizado. Em seguida uma alíquota de 10g de solo foi suspensa em 90mL de solução de NaCl 0,9% esterilizada. Uma alíquota de 100µL da suspensão foi inoculada em placas de Petri contendo meio seletivo, cultivando-se por espalhamento com alça de Drigalski (*spread-plate*) e incubação por 48 horas a 35 °C.

Dois exemplares da família Carabidae (Coleoptera, Insecta, Artropoda) foram coletados em ocos de castanheira na região do município de Maués-AM. Os animais foram decaptados e tiveram o tubo digestivo retirado (figura 3). A seguir o tubo digestório foi fracionado e os fragmentos inoculados em 1,0 mL de meio HACA+YNB líquido, incubados a 35 °C por 24 horas. Decorrido este prazo, uma alíquota de 100 µL foi cultivada por *spread-plate* em meio HACA+YNB em placas de Petri, tempo de incubação de 48 horas.



Figura 3: Intestino de besouro Carabidae dissecado.

Exemplares de *Nasutitermes sp.* (Termitidae, Isoptera, Insecta, Artropoda) foram coletados de um ninho localizado sobre o tronco de *Mangifera indica* L. no campus da Universidade Federal do

Amazonas (Manaus-AM). O abdome foi separado do restante do corpo e manipulado com alfinetes esterilizados até a extrusão do conteúdo abdominal (figura 4). Este foi então inoculado em 1,0 mL de meio HACA+YNB líquido (figura 5) e acondicionado a 35 °C por 24 horas. A seguir, uma alíquota de 100 µL foi semeada por *spread-plate* em meio HACA+YNB em placas de Petri, que foram então incubadas por 48 horas.

Decorridas as 48 horas, as colônias microbianas reconhecidas como leveduras foram repicadas para placas contendo meio HACA+YNB (ART = 1%) para obtenção de culturas puras.



Figura 4: Extrusão de conteúdo abdominal de *Nasutitermes sp.*



Figura 5: Inoculação de *Nasutitermes sp.* em 1,0 mL de HACA+YNB líquido.

Teste de assimilação e fermentação de D-Xilose:

Após isoladas, as leveduras foram testadas com relação a capacidade de assimilação e fermentação de D-Xilose. O teste de assimilação foi executado pela técnica *replica-plating*, usando YNB (6,7 g/L) e D-xilose 1,0 mM. Foram considerados capazes de assimilar o açúcar aqueles isolados que formassem colônia típica de leveduras, de forma não filamentosa, conforme descrito por Barnett et al. (1990).

O teste de capacidade fermentativa foi feito em meio líquido YUKX, composto por D-Xilose (50 g/L), Extrato de Levedura (1,5 g/L), Uréia (1,25 g/L) e KH_2PO_4 (1,1 g/L) com pH 5,5 em tubos de ensaio rosqueados contendo um tubo de Durham invertido para retenção de gás, liberado caso ocorresse fermentação (BARNETT et al., 1990). O teste com tubos de Durham foi executado utilizando *Pichia stipitis* CBS 5774 como controle positivo para fermentação de D-xilose.

Para atestar qualitativamente a capacidade fermentativa, aplicou-se outro teste de fermentação alternativo ao teste com tubos de Durham, utilizando um tubo tipo Falcon (50 mL), contendo 10 mL de meio YUKX, vedado por rolha de borracha contendo uma válvula para detecção de desprendimento de gás (figura 6). Os tubos foram mantidos em cultivo estacionário a 35 °C por 7 dias. Decorrido este prazo, a extremidade da mangueira foi posicionada dentro de uma coluna d'água e a válvula aberta para visualizar a liberação de bolhas, evidenciando atividade fermentativa pelo desprendimento de gás.



Figura 6: Sistema para teste de fermentação qualitativo, alternativo ao teste com tubo de Durham.

Resultados e Discussão

Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar:

A hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar resultou em 270 mL de volume final recuperado de hidrolisado hemicelulósico, com pH final 5,5 (obtido pela adição de hidróxido de cálcio) e açúcar redutor total na concentração de 46,3 g/L, valor 63,6% maior do que foi obtido por Canilha et al. (2009), utilizando ácido sulfúrico 2% v/v, elevando o pH até 7,0 (CaO) e reduzindo-o a 5,5 pela adição de ácido fosfórico. Cheng et al. (2007) obtiveram açúcar redutor a concentração de 67,4 g/L, todavia com pH final 10,2, o que pode representar a necessidade de neutralização para favorecer o crescimento da maioria das espécies de leveduras.

Segundo Duarte et al. (2008), quando comparado com outros hidrolisados hemicelulósicos (como de grãos de cevada ou madeira de eucalipto), o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar possui

maior concentrações de inibidores do crescimento microbiano. Considerando que o processo de hidrólise executado neste trabalho não dispôs de outros pré-tratamentos Além da correção do pH pela adição de Ca(OH)_2 1,0 M e posterior filtragem a vácuo do precipitado, a quantidade de inibidores microbianos presentes no hidrolisado hemicelulósico obtido foi relativamente alta, tornando-o um meio de cultura com alta seletividade, conduzindo à prospecção de leveduras que apresentam elevada tolerância a estes inibidores e, portanto, com elevado potencial biotecnológico, aplicáveis, por exemplo, na produção de extrato de levedura, *yeast single-cell protein* (DUARTE et al., 2008), biodetoxificação, produção de xilitol e fermentação etílica (HOU-RUI et al., 2009).

O rendimento de açúcar redutor total (R_{ART}) foi de 12,5% por peso seco de material lignocelulósico, valor semelhante ao obtido por Hernández-Salas et al. (2009) na hidrólise ácida de bagaço de agave (HCl, 90mg/g de bagaço) mas relativamente baixo quando comparado ao R_{ART} de bagaço de cana, que foi de 35,5% em média. Os valores de R_{ART} dos referidos autores pode estar associado ao tratamento térmico empregado previamente, anterior a hidrólise ácida.

Isolamento, testes de assimilação e fermentação de açúcares:

A prospecção nas amostras de solos resultou no crescimento de incontáveis colônias de fungos filamentosos, mas reduzido número de colônias de leveduras. Embora nenhum antibiótico tenha sido adicionado ao meio seletivo, nenhuma colônia bacteriana foi detectada.

Foram isoladas ao todo 76 colônias de leveduras, confirmadas por meio de reconhecimento microscópico e microcultivo. As colônias foram identificadas por um prefixo de acordo com o habitat do qual foram isoladas seguido por um número de ordem. O prefixo, de acordo com o habitat, está descrito na tabela 1.

As colônias isoladas foram cultivadas em meio sólido e depositadas em coleção pelo método de Castellani e em glicerol a 25%, preservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme descrito por Rodrigues et al. (1992).

Tabela 1: Prefixo de identificação de leveduras segundo o habitat do qual foram isoladas.

Hábitat	Prefixo
Solo de Savana	LSS
Solo de matas de terra firme	STF
Intestino de besouro	IB
<i>Nasutitermes sp.</i>	LC

No total, somente 36,8% dos isolados demonstraram capacidade de assimilar D-xilose e somente os isolados LC27, IB04 e IB09 (3,9% do total) demonstraram ser capazes de fermentar D-xilose.

O total de leveduras isoladas por habitat avaliado encontra-se na tabela 2.

Tabela 2: Total de colônias isoladas separadas por habitat pesquisado.

Hábitat	Total de Isolados	Assimilação de D-Xilose	Capacidade fermentativa
Solo de Savana	2	0	0
Solo de matas de terra firme	8	4	0
Intestino de besouro	12	12	2
<i>Nasutitermes sp.</i>	54	12	1

Considerando o número de amostras coletadas de todos os habitat, a maior proporção de leveduras isoladas por amostra é observada no intestino de besouros (6 isolados por amostra), seguido do conteúdo abdominal de *Nasutitermes sp.* (5,4 isolados por exemplar). As amostras de solo demonstraram baixa densidade de leveduras capazes de metabolizar hidrolisados hemicelulósicos com número de colônias isoladas por amostra inferior a 1.

Estes resultados são compatíveis com o que é dito por Suh et al. (2005), quando referem-se ao intestino de insetos como um habitat inexplorado com ampla diversidade microbiana, sendo esta associação indispensável para promover o aumento na diversidade de fungos e o sucesso dos

insetos na exploração de substratos pobres em nutrientes. Em seu trabalho, amostras de 27 famílias de coleópteros, entre elas Carabidae, foram coletadas na América Central ao longo de três anos, resultando em 650 colônias de leveduras isoladas dentre as quais 68% eram de espécies ainda não descritas. A análise filogenética apontou que a ampla maioria destas é da classe Saccharomycetes, algumas do clado *Pichia stipitis* (fermentadores de xilose). Blackwell et al. (2004) admitem que a fermentação de xilose beneficiaria besouros xilófagos.

Breznak (1982) sugeriu a ocorrência de uma densa microbiota fermentativa associada ao intestino de cupins e de outros insetos xilófagos ou detritívoros, os quais seriam responsáveis pela capacidade destes de assimilar os nutrientes presentes no material lignocelulósico. Estudos mais recentes apontam a que um dos exemplos mais interessantes de comunidades simbióticas complexas de procariontes e eucariontes é encontrado no intestino de cupins (FRÖHLICH et al., 2007), todavia ainda com poucos dados quanto a associação entre leveduras fermentadoras de pentoses e estes insetos.

A capacidade de assimilar D-xilose foi observada em STF1, STF3, STF5 e STF6; IB01, IB02, IB03, IB04, IB05, IB06, IB07, IB08, IB09, IB10, IB11 e IB12; LC27, LC28, LC29, LC30, LC31, LC32, LC33, LC34, LC35, LC36, LC37 e LC38 (figura 7).

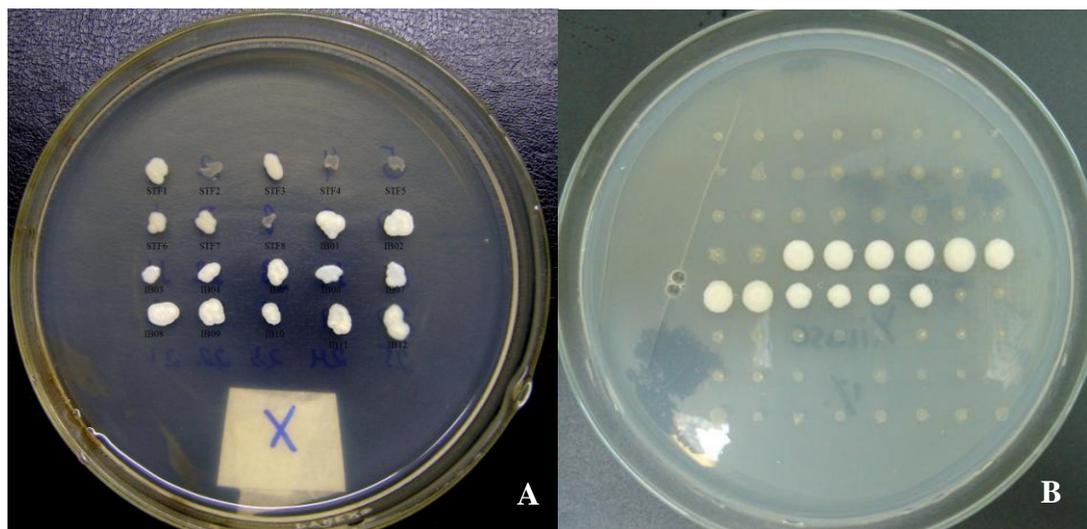


Figura 7: Teste de assimilação de D-xilose (*replica-plate*) para leveduras isoladas de solos de terra firme e intestino de Carabidae (A) e em associação com *Nasutitermes sp.* e de solos de savana (B). Colônias de leveduras em destaque demonstram assimilação de D-xilose.

O teste de fermentação em tubos de Durham apresentou como resultado positivo somente o isolado LC27 (figura 8), obtido em associação a *Nasutitermes sp.* O teste alternativo de fermentação apresentou resultado positivo para os isolados LC27, IB04 e IB09, estes últimos associados a besouros. O cultivo de *Pichia stipitis* CBS 5774 em tubos de ensaio para controle positivo de fermentação de D-xilose em tubos de Durham apresentou resultado negativo. Diante da conhecida capacidade fermentativa de D-xilose por *P. stipitis*, o referido teste tem sua eficácia questionável, demonstrando parecer não conclusivo quanto à capacidade de fermentar D-xilose. Este resultado negativo pode estar associado a limitações quanto à aeração. O tubo de ensaio usado no teste proporcionou baixa disponibilidade de oxigênio, e sabidamente a fermentação de D-xilose por *P. stipitis* é realizado em condições aeróbias (CONVERTI et al., 1999).

Hahn-Hägerdall et al. (2007) argumentam que fermentação de D-xilose e outras pentoses à etanol dá-se por metabolismo aeróbio, sendo necessário controle rigoroso sobre as concentrações de O₂ no substrato para fermentação, condição não proporcionada nos testes executados e que aumentaria os custos do processo no âmbito industrial.

No teste alternativo, *P. stipitis* apresentou resposta positiva, despreendendo gás na fermentação de D-xilose. Este resultado foi alcançado provavelmente pela maior disponibilidade de oxigênio dentro do tubo Falcon® de 50 mL.

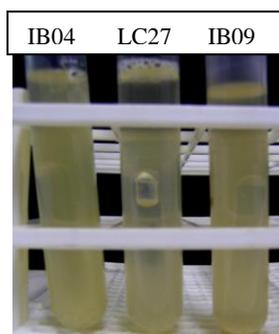


Figura 8: Retenção de gás em tubo de Durham, evidenciando capacidade fermentativa de D-xilose por LC27.

Conclusões

Diante dos resultados de *P. stipitis* em tubos de Durham e dos resultados apresentados em outros estudos, existe a visível necessidade de desenvolverem-se novos testes para prospecção de novas leveduras capazes de fermentar pentoses. Dentre as 76 colônias de leveduras capazes de utilizar hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar como fonte de carbono, 28 são capazes de assimilar D-xilose e 3 são capazes de fermentar esta pentose.

A microbiota das amostras de solo analisadas apresenta elevada densidade de fungos filamentosos, mas relativa pobreza em espécies de leveduras capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Entre os habitats pesquisados, os insetos xilófagos figuram como os melhores reservatórios de leveduras capazes de usar hidrolisado hemicelulósico como fonte única de carbono e com capacidade fermentativa frente a D-xilose.

Referencias bibliográficas

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4^a ed. John Wiley & Sons, New York: 1996.
- BARBOSA, Reinaldo Imbrózio. **Savanas da Amazônia: emissão de gases do efeito estufa e material particulado pela queima e decomposição da biomassa acima do solo, sem a troca do uso da terra em Roraima, Brasil**. Manaus: INPA/UA, 2001. Tese de Doutorado em Ecologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia / Universidade do Amazonas, 2001.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2^a ed. Cambridge University Press. Cambridge: 1990.

- BREZNAK, John A. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *In Ann. Rev. Microbiol.* N° 36, p. 323-343, 1982.
- BLACKWELL, Meredith; SUH, Sung-Oui; WHITE, Merlin M.; NGUYEN, Nhu H. The status and characterization of *Enteroramus dimorphus*: a xylose-fermenting yeast attached to the gut of beetles. *In Mycologia.* N° 96, v. 4, p. 756–760, 2004.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* DOI 10.1007/s12010-009-8792-8. 2009.
- CERQUEIRA LEITE, R. C., LEAL, M. R. L. V., CORTEZ, L. A. B., GRIFFIN, W. M., SCANDIFFIO, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy.* DOI: [10.1016/j.energy.2008.11.001](https://doi.org/10.1016/j.energy.2008.11.001), 2008.
- CHENG, Ke-Ke; GE, Jing-Ping; ZHANG, Jian-An; LING, Hong-Zhi; ZHOU, Yu-Jie; YANG, Ming-De; XU, Jing-Ming. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *In Biotechnol lett.* N° 29, p. 1051-1055, 2007.
- CONVERTI, A.; PEREGO, P. e DOMÍNGUEZ, J.M. Microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus* at different pH values. *Biotechnology Letters.* 21: 719–723, 1999.
- DIAS, M.O.S.; ENSINAS, A.V.; NEBRA, S.A.; FILHO, R.M.; ROSSELL, C.E.V.; MACIEL, R.M.W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. *Chemical Engineering Research and Design.* 87: 1206–1216. 2009.
- DIEN, Bruce S.; HESPELL, Robert B.; WYCKOFF, Herbert A.; BOTHAST, Rodney J. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *In Enzyme and microbial technology.* N° 23, p. 366-371, 1998.

- DUARTE, L.C.; CARVALHEIRO, F.; LOPES, S.; NEVES, I. e GÍRIO, F.M. Yeast Biomass Production in Brewery's Spent Grains Hemicellulosic Hydrolyzate. **Appl Biochem Biotechnol.** 148:119–129. 2008. DOI 10.1007/s12010-007-8046-6
- FRÖHLICH, J.; KOUSTIANE, C.; KÄMPFER, P.; ROSSELLO-MORA, R.; VALENS, M.; BERCHTOLDA, M.; KUHNIGKB, T.; HERTEL, H.; MAHESHWARI, D.K.; KÖNIG, H. Occurrence of rhizobia in the gut of the higher termite *Nasutitermes nigriceps*. **Systematic and Applied Microbiology.** 30: 68–74. 2007.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian Biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels.** [doi:10.1186/1754-6834-1-6](https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-6), 2008.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology.** 74:937–953. 2007. DOI 10.1007/s00253-006-0827-2
- HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A. e TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology** 100: 1238–1245. 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.062
- HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S.S.; SARROUH, B.F.; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J. e QIU, X. Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology.** 152:199–212. 2009. DOI 10.1007/s12010-008-8249-5
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. e SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology.** 74: 69–80. 2000.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S. e MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**. 74: 81–87. 2000.
- RÍPOLI, T.C.C.; MOLINA JR., W.F.; RÍPOLI, M.L.C. Energy potential of sugar cane biomass in Brazil. **Scientia Agricola**. v.57, n.4: 677-681. 2000.
- RODRIGUES, E.G.; LIRIO, V.S.; LACAZ, C.S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse medico em água destilada. **Rev. Inst. Med. Trop.** 34(2): 159-165. 1992.
- SAHA, Badal C. Hemicellulose bioconversion. *In* **J Ind Microbiol Biotechnol**. Nº 30, p. 279–291, 2003.
- SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLORES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**. Nº 99, p. 2898–2904, 2007.
- STAJICH, J.E.; BERBEE, M.L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D.S.; JAMES, T.Y. SPATAFORA, J.W. e TAYLOR, J.W. The Fungi. **Current Biology**. V. 19, Nº 18: 840-845. 2009.
- SUH, S.O.; McHUGH, J.V.; POLLOCK, D.D. e BLACKWELL, M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycol. Res.** 109 (3): 261–265. 2005. DOI:10.1017/S0953756205002388
- TAKAHASHI, Caroline Maki; LIMA, Katia Gianni de Carvalho; TAKAHASHI, Debora Fumie; ALTERTHUM, Flavio. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Nº 16: 829-834, 2000.

- WHITE, J.S.; YOHANNAN, B.K. e WALKER, G.M. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. **FEMS Yeast Research**. 8: 1175–1184. 2008. DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00390.x
- YABLOCHKOVA, E.N.; BOLOTNIKOVA, O.I.; MIKHAILOVA, N.P.; NEMOVA, N.N. e GINAK, A.I. Specific Features of Fermentation of D-Xylose and D-Glucose by Xylose-Assimilating Yeasts. **Applied Biochemistry and Microbiology**. V. 39, N. 3: 265–269. 2003.
- ZHAO, L., YU, J., ZHANG, X., TAN, T. The Ethanol Tolerance of *Pachysolen tannophilus* in Fermentation on Xylose. **Appl Biochem Biotechnol**. 2008. DOI: [10.1007/s12010-008-8308-y](https://doi.org/10.1007/s12010-008-8308-y).

Capítulo 2: Crescimento Celular, Fermentação, Termotolerância e Tolerância ao Etanol por Três Linhagens de Leveduras Amazônicas Fermentadoras de D-Xilose.

Introdução

A crise energética desencadeada no início dos anos 1970 impulsionou a pesquisa em busca da produção sustentável de combustíveis e outros produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica oriunda de matéria-prima atividade agrícola e de resíduos florestais (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). A demanda mundial pelo aumento da produção de energias limpas aumenta o debate em torno da sustentabilidade dos biocombustíveis, com argumentos pró e contra (COCKERILL e MARTIN, 2008).

No Brasil, o programa de biocombustíveis tem como carro-chefe o etanol produzido a partir do caldo de cana-de-açúcar. A produção brasileira de cana-de-açúcar apresentou crescimento anual de 3,77% ao longo dos últimos 29 anos, reduzindo o preço do metro cúbico de etanol brasileiro de US\$ 700 para menos de US\$ 200 de 1980 a 2005 (GOLDEMBERG, 2008).

Este crescimento reflete-se também na geração de resíduos. O bagaço de cana é o mais abundante e importante resíduo agrícola brasileiro (TAKAHASHI et al., 2000). No ano de 1991, a produção de bagaço de cana alcançou 59 milhões de toneladas (50% de umidade) (RÍPOLI et al., 2000). A safra de cana-de-açúcar estimada para o ano de 2009 é de 693,9 milhões de toneladas (IBGE, 2009). Considerando que em 2004 foram produzidos 110 milhões de toneladas de bagaço (GOLDEMBERG e LUCON, 2007), o que corresponde a cerca de 25% da safra colhida (BRASIL, 2009), espera-se uma produção em torno de 173,5 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar em 2009.

Este bagaço pode ser empregado para diversos fins, entre os quais o principal é a produção de energia termelétrica (GOLDEMBERG, 2008). De um modo geral, resíduos lignocelulósicos são

potenciais matérias-primas para diversos fins industriais, como a produção de biomassa de leveduras para produção de suplementos protéicos, como extrato de leveduras e SCP – *single-cell protein*; produção de xilitol, um açúcar-álcool com elevado potencial de uso na indústria de alimentos para diabéticos e/ou dietas hipocalóricas; e a produção de etanol combustível (SAHA, 2003). O bagaço de cana apresenta vantagens quando comparado a outros resíduos agrícolas, apresentando maior fermentabilidade e maior rendimento de açúcar redutor após os processos de hidrólise (HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009).

A hidrólise ácida apresenta algumas vantagens frente à hidrólise enzimática, relacionadas principalmente às condições demandadas pela hidrólise enzimática (manutenção de temperatura e pH ótimos, grandes quantidades de enzima, concentração de substrato e cofatores enzimáticos). Esta libera principalmente monossacarídeos fermentescíveis a etanol, com notável destaque para D-xilose (PANDEY et al., 2000; SAHA, 2003).

Os processos de hidrólise ácida geram diversos inibidores do crescimento microbiano, entre eles furfural, hidroxi-metilfurfural e principalmente ácido acético, sendo necessário empregar diversas técnicas para desintoxicação tais como adição de carvão ativado, eletrodialise, adição de hidróxidos (principalmente de cálcio), centrifugação e biodetoxificação, isto é, o emprego de microrganismos para assimilação dos inibidores formados (HOU-RUI et al., 2009). Hidrolisados hemicelulósicos desintoxicados por técnicas simples, como a correção do pH por adição de hidróxidos, apresentam elevados teores de inibidores, podendo ser empregados como meios seletivos para microrganismos de alta resistência. Esta característica pode baratear os produtos biotecnológicos de valor agregado baseados em hidrolisados hemicelulósicos, haja vista a redução nos investimentos necessários à detoxificação.

As espécies comumente empregadas na fermentação alcoólica de hexoses não são capazes de produzir etanol a partir de xilose, havendo somente um restrito número de espécies capazes de

fazê-lo (CANILHA et al., 2009) e com necessidade de empenho em estudos que visem a otimização dos bioprocessos.

Três leveduras fermentadoras de D-xilose isoladas de diferentes insetos, coletados na região amazônica, foram avaliadas comparativamente quanto à produção de biomassa e assimilação de açúcar redutor em hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar e meio sintético usando D-xilose como fonte de carbono. Foi avaliado o desprendimento de CO₂ para estimar a produtividade de etanol e dois parâmetros importantes para a indústria de fermentação, a saber, termotolerância e tolerância ao etanol.

Material e Métodos

Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos descritos a seguir foram fabricados pela Difco, Himedia, Sigma e Vetec.

Preparo do Hidrolisado, Meios de Cultura, Linhagens e Inóculo.

O hidrolisado ácido hemicelulósico de cana-de-açúcar (HACA) foi preparado como descrito anteriormente (capítulo 1, página 20). O meio HACA, com açúcar redutor total (ART) a 46,3 g/L, foi suplementado com extrato de levedura 1,5 g/L e uréia 1,25 g/L. O meio de cultura YUKX foi preparado utilizando-se extrato de levedura 1,5 g/L, uréia 1,25 g/L, KH₂PO₄ 1,1 g/L e D-xilose 50 g/L. Em ambos os casos o pH inicial foi ajustado para 5,5 usando HCl ou NaOH 1,0 M.

As leveduras fermentadoras de D-xilose utilizadas neste experimento são LC27, isolada de *Nasutitermes sp.*, IB04 e IB09, isoladas do intestino de besouros da família Carabidae, todas linhagens selvagens (*wild-type*) nativas da região amazônica. Os microrganismos, depositados em coleção pelo método Castellani (RODRIGUES et al., 1992), foram reativados em Agar

Sabouraud (glicose 4%), cultivados a 30 °C por 72 horas. O pré-inóculo foi preparado cultivando-se uma alçada em 100 mL de meio YUKX em frascos Erlenmeyer de 250 mL incubados a 35 °C e 120 rpm por 72 horas.

Ensaio em Fermentômetro

O ensaio em fermentômetro foi efetuado em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio YUKX. Centrifugou-se 40 mL do meio de inóculo por 45 minutos a 3500x g e 4 °C em tubos Falcon® de 50 mL, descartando-se o sobrenadante e inoculando-se o sedimentado, com massa total entre 1,52 e 1,68 g para 100 mL de meio. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e selo de água para permitir a saída de ar, sendo mantidos a 35 °C, 120 rpm por 120 horas, sendo pesados a cada 12 horas para acompanhamento da perda de massa por desprendimento de CO₂. A evolução de CO₂ foi utilizada para estimar a produção de etanol por cálculo estequiométrico, aplicando-se a fórmula $[m_{\text{EtOH}} = (m_{\text{CO}_2} \times 0,511)/0,489]$, onde m_{EtOH} corresponde a massa de etanol produzido (g) e m_{CO_2} corresponde a massa de dióxido de carbono (g) desprendido durante o ensaio.

Curvas de Crescimento e Consumo de Açúcar Redutor

As leveduras foram caracterizadas quanto ao crescimento celular e consumo de açúcar redutor em HACA e YUKX. O cultivo em meio YUKX foi executado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio líquido. Em ambos os casos as culturas foram mantidas a 35 °C, 120 rpm. O inóculo inicial oscilou entre 15,2 e 16,0 mg de células (peso úmido), totalizando massa celular inicial de 0,122 a 0,128 g/L. O cultivo em HACA foi feito em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio, com inóculo inicial de 0,125 mg de células (peso úmido) por mL de meio.

O consumo de açúcar redutor foi determinado pela dosagem da concentração de ART presente no meio de cultura pelo método DNS (BERTOLINI et al., 1991 *apud* ZHAO et al., 2008), calculado segundo uma curva padrão (figura 2). Para determinação da concentração de ART as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8000 x g e 25 °C para separação da biomassa. O sobrenadante foi analisado e armazenado sob congelamento a -20 °C para análises posteriores.

O crescimento celular foi monitorado coletando-se alíquotas das culturas, analisando-se a densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) (HEER e SAUER, 2008). No meio HACA, a OD₆₀₀ foi monitorada coletando-se 100 µL da cultura e diluindo-a dez vezes em água destilada esterilizada, haja vista ser um meio mais turvo; enquanto que das culturas em meio YUKX foram coletadas alíquotas de 1,0 mL. Em ambos os cultivos os frascos foram vedados com gaze e algodão.

Durante as primeiras 48 horas, as alíquotas foram coletadas a cada 4 horas para caracterização da fase de adaptação (fase *lag*), sendo a partir de então monitoradas a cada 12 horas.

Os cultivos foram mantidos por até 12 horas após o início da fase estacionária da curva de crescimento ou após 120 horas de cultivo, quantificando-se a viabilidade celular. O conteúdo dos frascos foi centrifugado por 45 minutos a 3500x g e 4 °C. Após avaliado o pH final, o sobrenadante foi armazenado sob congelamento a -20 °C para análises posteriores, enquanto o sedimento foi pesado para determinação de biomassa final produzida (peso úmido).

Teste de Tolerância ao Etanol e Termotolerância

O teste de tolerância ao etanol e termotolerância foram executados segundo a metodologia descrita por Vianna et al. (2008). A termotolerância foi testada também pelo método descrito por Ogawa et al. (2000). Os ensaios foram feitos em triplicata.

As leveduras foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de meio YPD líquido (extrato de levedura 10 g/L, peptona microbiológica 20 g/L e D-glicose 20 g/L), 120 rpm a 35 °C, por 72 horas (fase *log*). A seguir, adicionou-se assepticamente 10 mL de álcool etílico

absoluto, totalizando a concentração final de 20% (v/v) de etanol. Os frascos foram mantidos em cultivo estacionário a 35 °C ($\pm 1,0$ °C) por sete dias. Ao final deste período uma alíquota de 100 μ L foi cultivada em placas de Petri contendo meio YNBX (base nitrogenada de levedura, *yeast nitrogen base* 6,7 g/L, D-xilose 20 g/L e Agar 20 g/L). As placas foram incubadas a 35 °C por até 72 horas e observadas a cada 24 horas para contagem de colônias.

A tolerância a altas temperaturas foi avaliada pela aplicação de choque térmico letal, cultivando-se as leveduras em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido YUKX por 72 horas a 120 rpm e 35 °C. A seguir os frascos foram incubados em banho-maria a 52 °C por 9 minutos e logo em seguida a viabilidade celular foi mensurada (VIANNA et al., 2008). A cada 3 minutos uma alíquota de 100 μ L foi cultivada em placas de Petri contendo meio YUKX, suplementado com Agar (20 g/L), por espalhamento com alça de Drigalski (*spread-plate*). As placas foram incubadas a 35 °C por até 72 horas, observadas para contagem de colônias a cada 24 horas (OGAWA et al., 2000).

Cálculos e Parâmetros Matemáticos

A análise estatística foi efetuada no software Mynstat®, versão 12.02.00, por cálculo de ANOVA e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, de acordo com as condições necessárias para cada teste (normalidade e homogeneidade, $\alpha=0,05$).

A viabilidade celular (%) foi avaliada por coloração com solução de azul de metileno – citrato de sódio (1,0 g/L de azul de metileno, 20 g/L de citrato de sódio) e contagem em câmara de Neubauer, determinando-se a razão entre células mortas e o total de células (VIANNA et al., 2008). A taxa de crescimento específico (μ_{MAX} , h^{-1}) foi calculada pela regressão linear do $\ln(OD/OD_i)$ versus tempo de duração da fase *log* de crescimento, determinada pela obtenção da equação $\ln(OD/OD_i) = \mu_{MAX}.t + a$. A produtividade celular (PC, g/g) foi determinada ao final do cultivo baseado na biomassa produzida por grama de açúcar consumido. O consumo relativo de

açúcar (CRA, %) foi calculado pela razão entre a concentração final e inicial de açúcar redutor total, subtraída de 100% ($CRA = 100 - [(ART/ART_i) \times 100]$). Todos os ensaios foram realizados em duplicata (DUARTE et al., 2008). A quantidade de açúcar consumido por hora (g/h) foi avaliado a cada intervalo de 12 horas, calculando-se a diferença entre as concentrações a cada coleta e dividindo o valor obtido por 12.

Resultados e Discussão

Crescimento Celular e Consumo de Açúcar

O cultivo em YUKX durou um total de 96 horas para as três linhagens testadas. A fase de adaptação (*lag*) da linhagem LC27 durou 16 horas, instante a partir do qual a curva de crescimento entrou em fase exponencial (*log*). As linhagens IB04 e IB09 apresentaram fase *lag* com duração total de 8 horas. Todas apresentaram crescimento exponencial até as 44 horas de cultivo. A partir de então a curva passou a apresentar crescimento menos acentuado, entrando em fase estacionária a partir das 84 horas de cultivo. A cultura foi interrompida após 96 horas, quando observadas 12 horas de estagnação do crescimento microbiano.

Apesar de ter demandado maior período de adaptação ao meio, LC27 apresentou produção de biomassa superior a de IB04 e IB09. Os valores máximos de densidade ótica foram 1,587, 1,525 e 1,497 para LC27, IB04 e IB09 respectivamente. A curva de crescimento é apresentada integralmente na figura 9.

O cultivo de LC27 provocou acidificação do meio de cultura, reduzindo o pH de 5,5 para 4,0 ($\pm 0,1$). As linhagens IB04 e IB09 elevaram o pH do meio para 7,3 ($\pm 0,1$).

Cultivando *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae* em meio sintético composto por misturas de D-xilose e D-glicose, a acidificação do pH foi observada também por Wilkins et al. (2008), no cultivo de *K. marxianus*, e por Sanchez et al. (1999), cultivando *Candida shehatae* e

Pachysolen tannophilus. Em ambos os casos ocorreu secreção de ácido acético, podendo ainda explicar-se a acidificação pela produção de glicerol e outros alcoóis.

Quanto a elevação do pH, fato semelhante é observado em ensilagens, onde as leveduras provocam elevação do pH pela deterioração aeróbia principalmente de ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação da silagem (PEDROSO, 2004), pela produção de pigmentos carotenóides (VALDUGA et al., 2009) e pela secreção de proteínas no meio (A. PESSOA et al., 1996). A secreção de outros biocompostos, como exo-biopolímeros em fermentação submersa, por exemplo, também pode provocar elevação do pH (XU et al., 2003).

Tabela 3: Taxa de Crescimento Específico (μ_{MAX} , h^{-1}), Consumo Relativo de Açúcar e Produtividade Celular.

Linhagem	μ_{MAX} (h^{-1})	CRA (%)	PC (g/g)
LC27	0,09	60,86	0,666
IB04	0,07	44,63	1,275
IB09	0,07	62,48	0,883

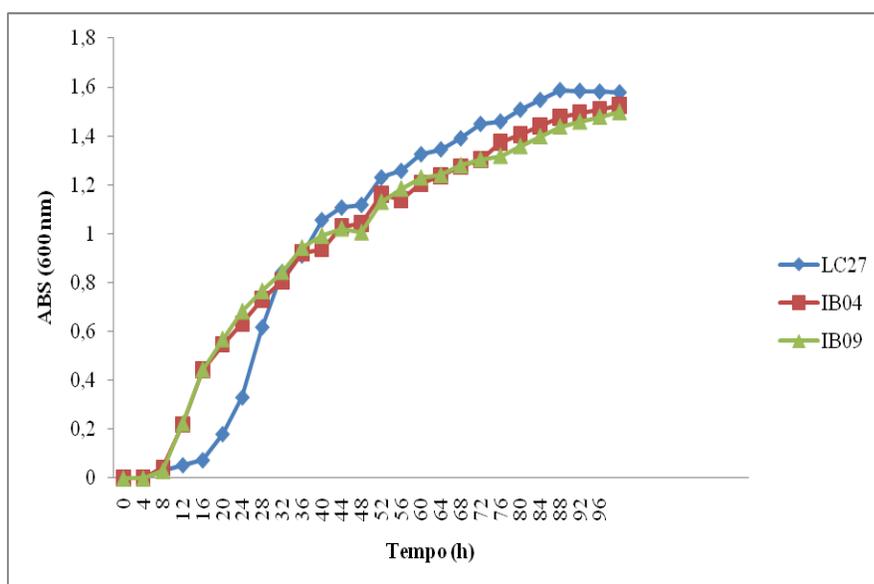


Figura 9: Curva de crescimento em YUKX das linhagens LC27, IB04 e IB09.

Os maiores valores de velocidade de crescimento foram observados no cultivo da linhagem LC27. De um modo geral, os valores de μ_{MAX} (tabela 3) foram consideravelmente baixos para as três linhagens, sem diferenças significativas. Estes valores demonstram que em meio sintético as leveduras testadas apresentam aumento pouco significativo na OD_{600} a cada hora de cultivo. O

baixo crescimento específico deve estar associado ao baixo consumo de açúcar redutor. Quando os valores de μ_{MAX} em meio sintético são comparados aos valores em HACA, é possível sugerir que o meio YUKX apresentou relativa pobreza em co-fatores minerais e/ou vitaminas requeridas pelas leveduras cultivadas. A comparação dos dados de crescimento celular das diferentes linhagens não apresentou diferença significativa (Kruskal-Wallis $v= 0,093$, $p=0,954$). As curvas de crescimento em meio sintético para as linhagens LC27, IB04 e IB09 apresentam semelhanças com o que é descrito por Sánchez et al. (1999), quando do cultivo de *C. shehatae* e *P. tannophilus* em hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar. Após uma fase de crescimento tipicamente exponencial, a curva apresenta crescimento contínuo, mas com valores de μ_{MAX} relativamente menores.

A linhagem IB04 apresentou maior eficiência na produção de biomassa, com maior produtividade celular por quantidade de açúcar consumido. Os valores do consumo relativo de açúcar e produtividade celular pelas três linhagens encontram-se na tabela 3.

Embora o crescimento celular tenha cessado às 84 horas de cultivo, o consumo de açúcar redutor atingiu o valor máximo às 96 horas (figura 10), isto é, ao final do processo. Todas as linhagens foram cultivadas com ART inicial de 51,3 g/L, observando-se maior taxa de consumo (g/h) nas últimas 12 horas para LC27 e IB09 (0,062 e 0,087 g/h respectivamente). O maior consumo por IB04 foi observado nas primeiras 12 horas, tendo consumido 0,096 g/h (tabela 4).

Resultados semelhantes de consumo relativo de açúcar foram obtidos por Wilkins et al. (2008), cultivando *Kluyveromyces marxianus* IMB4 (linhagem termotolerante) em pH 5,5 a 40 °C, com assimilação total de 51,6% da xilose presente no meio de cultura, não sendo observado crescimento celular. No mesmo trabalho, e cultivadas sob as mesmas condições, as linhagens IMB2 e IMB5 assimilaram 64,6 e 68,7% de xilose, padrões semelhantes aos observados para LC27 e IB09. A vantagem de IB04 sobre *K. marxianus* IMB4 é que a primeira elevou o pH do

meio para valores que tendem a neutralidade, enquanto que a segunda o acidificou pela liberação de ácido acético.

Tabela 4: Açúcar consumido por hora a cada intervalo de 12 horas.

Intervalo (h)	Açúcar Consumido (g/h)		
	LC27	IB04	IB09
0-12	0,054	0,096	0,041
12-24	0,016	0,020	0,025
24-36	0,020	0,014	0,029
36-48	0,014	0,007	0,012
48-60	0,015	0,005	0,047
60-72	0,048	0,018	0,016
72-84	0,030	0,018	0,009
84-96	0,062	0,014	0,087

A relação observada entre consumo de açúcar e produção de biomassa para IB04 é coincidente com a observada para a linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* MA-S4 (MATSUSHIKA et al., 2008), com consumo de somente 52% de xilose mas com elevada produção de biomassa. O diferencial de IB04 com relação a *S. cerevisiae* MA-S4, quando cultivadas em D-xilose, é que a primeira atingiu máxima produção de biomassa em 84 horas de cultivo, com fase *lag* durando apenas 8 horas, enquanto a segunda o fez em 96 horas de cultivo com 48 horas de fase *lag*. A extensão da fase *lag* de *S. cerevisiae* MA-S4 pode estar associada ao fato de seu pré-inóculo ter sido feito em meio YPD por 36 horas, enquanto que IB04 foi pré-cultivada em meio com xilose (YUKX) por 72 horas.

Os resultados indicam bom potencial biotecnológico de IB04 para produção de biomassa usando D-xilose como fonte de carbono.

O cultivo em HACA durou 120 horas, após observada ausência de crescimento celular por 12 horas. Com relação ao cultivo em YUKX, todas as linhagens apresentaram fase *lag* mais longa, com duração de 24 horas para IB04 e IB09, e 36 horas para LC27. A partir de 48 horas de cultura, os isolados de intestino de besouro apresentaram crescimento menos acentuado que LC27, que apresentou crescimento mais discreto somente após 60 horas de cultivo. Nos três casos a fase estacionária foi observada a partir de 108 horas. Ao final das 120 horas de cultivo, a

viabilidade celular foi avaliada, resultando em 90,34% ($\pm 0,42$), 75,96% ($\pm 2,62$) e 65,58% ($\pm 3,82$) de células viáveis para LC27, IB04 e IB09 respectivamente.

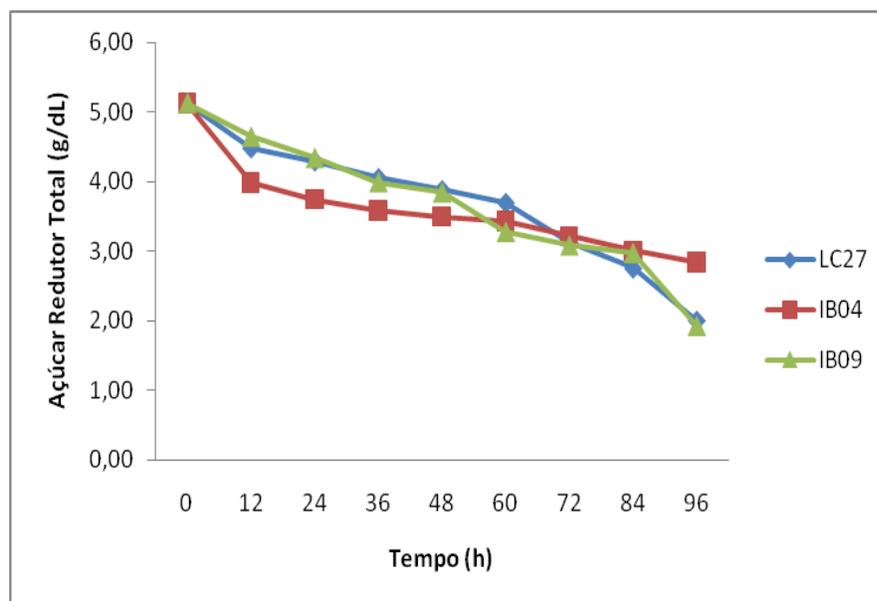


Figura 10: Consumo de açúcar redutor total em 96 horas de cultivo (meio YUKX).

A despeito de apresentar maior viabilidade entre as linhagens testadas, LC27 apresentou redução na OD_{600} nas últimas 12 horas de cultivo em ambas as réplicas do teste. As curvas de crescimento em HACA são apresentadas integralmente na figura 11.

O tipo de tratamento aplicado neste experimento promoveria a hidrólise quase completa dos polissacarídeos hemicelulósicos, com a liberação de monossacarídeos fermentescíveis (WHITE et al. 2008). Apesar desta expectativa, a dosagem de ART durante as primeiras horas de cultivo demonstrou aumento na concentração de açúcar redutor (sacarificação) do hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, provavelmente pela conversão de oligossacarídeos formados durante a hidrólise ácida em unidades monoméricas. Trabalhando com resíduos de cevada da indústria cervejeira, White et al. (2008), obtiveram aumento na concentração de ART de 12,1 para 29,2 g/L aplicando hidrólise enzimática posteriormente ao tratamento com ácido sulfúrico. Hernández-Salas et al. (2009) aplicaram misturas de enzimas comerciais (xilanases, celulases, celobiasas e glucanases) para obter maior sacarificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço

de cana-de-açúcar (produzido por hidrólise ácida), com melhor resultado aumentando em 20% a concentração de açúcar redutor total. Proporcionalmente, a concentração inicial de ART (42,5 g/L) em HACA foi elevada pela atividade microbiana em 43,76; 33,18 e 33,41 por cento (%) por LC27, IB04 e IB09 respectivamente, segundo o que pode ser observado na figura 12.

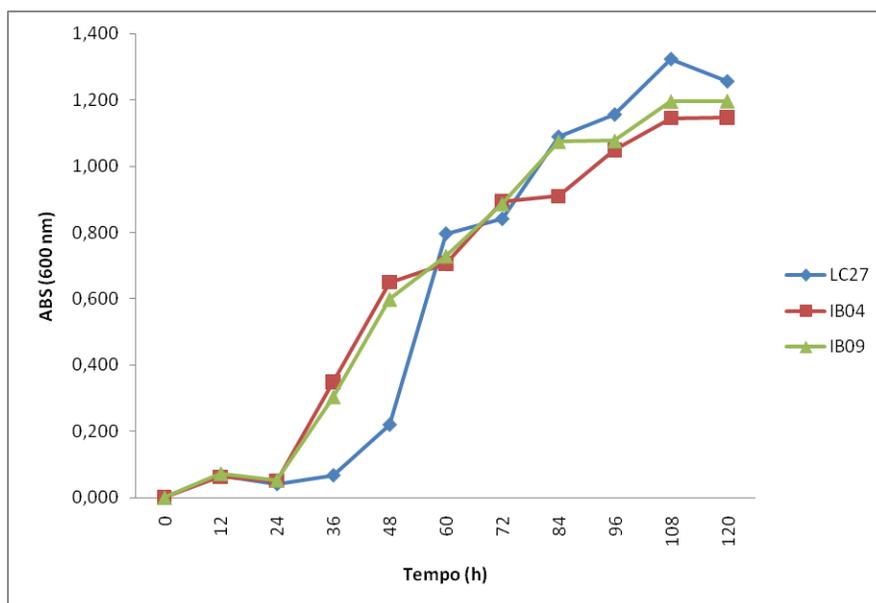


Figura 11: Curva de crescimento em HACA.

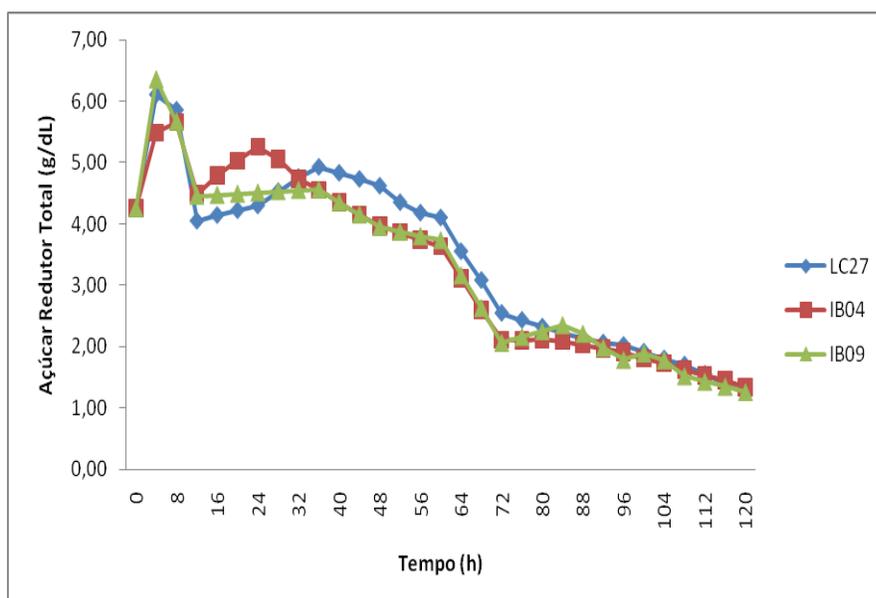


Figura 12: Sacarificação e posterior consumo de açúcar redutor em hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar.

A alteração do pH em HACA seguiu o mesmo padrão para as três linhagens, ocorrendo elevação do pH (de 5,5 inicial nos três casos) para 7,12 ($\pm 0,01$) por LC27 e para 7,56 ($\pm 0,03$) por IB04 e

IB09. Este resultado mostra que as linhagens avaliadas são capazes de assimilar o ácido acético e outros ácidos alifáticos presentes no hidrolisado, os quais teriam, a princípio, papel inibidor do crescimento microbiano (DUARTE et al., 2008). Resultado semelhante foi obtido por A. Pessoa et al. (1996) cultivando *Candida tropicalis* em hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar para produção de proteína microbiana, obtendo consumo total do ácido acético presente no meio (3,7 g/L) em até 25 horas de consumo, elevando o pH do meio de 6,0 para 6,7.

Considerando o notável acréscimo à concentração de ART (superior ao obtido pela aplicação de kits enzimáticos comerciais) e a neutralização do pH promovidos por LC27, IB04 e IB09, é possível afirmar o potencial biotecnológico destas linhagens na sacarificação e biodetoxificação de hidrolisados hemicelulósicos. Estes resultados indicam ainda potencial na aplicação destas linhagens em processos de sacarificação e fermentação simultâneos (BANAT et al., 1998)

Os valores de μ_{MAX} em HACA foram consideravelmente maiores dos que os obtidos em YUKX, com maior crescimento específico por LC27. Considerando a ocorrência de sacarificação, o consumo relativo de açúcar redutor e a produtividade celular foram calculados em função da maior concentração de ART observada. A maior proporção de biomassa produzida por quantidade de ART consumido foi observada nos isolados IB04 e IB09 (35% maior que por LC27), com análise estatística indicando diferença não significativa entre estes (Kruskall-Wallis, $p=0,882$, $\alpha=0,05$). Os valores encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Taxa de Crescimento Específico, Consumo Relativo de Açúcar e Produtividade Celular dos cultivos em HACA (valores máximos).

Linhagem	μ_{MAX} (h⁻¹)	CRA (%)	PC (g/g)
LC27	0,29	79,54	0,516
IB04	0,17	75,05	0,697
IB09	0,20	80,16	0,701

Quando cultivado em meio sintético (D-xilose, 30 g/L), *Pachysolen tannophilus* apresentou consumo em taxa semelhante, consumindo 85% do açúcar após 72 horas de cultivo (ZHAO et al.,

2008). Converte et al. (1999) obtiveram consumo de 73,3% do ART por *P. tannophilus* cultivado a pH 6,0 em hidrolisado hemicelulósico desintoxicado por adição de carvão ativado, com maior taxa de consumo de açúcar (78,6%) a pH 10,5.

A taxa de assimilação de açúcar presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana observada para LC27, IB04 e IB09 é semelhante à obtida por Dien et al. (2000) quando na construção de uma linhagem recombinante de *Escherichia coli* capaz de produzir etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de fibra de milho.

Tabela 6: Taxa de açúcar consumido por hora ao longo do cultivo em HACA

Intervalo (h)	Açúcar Consumido (g/h)		
	LC27	IB04	IB09
0-12	-	-	-
12-24	-	-	-
24-36	0,057	0,039	0,058
36-48	0,026	0,049	0,051
48-60	0,043	0,028	0,018
60-72	0,130	0,127	0,139
72-84	0,028	0,002	- 0,024
84-96	0,016	0,014	0,047
96-108	0,027	0,024	0,022
108-120	0,023	0,023	0,022

A taxa de açúcar consumido por hora (g/h) foi determinada pela diferença entre a maior e menor concentração de ART nas primeiras 36 horas, sendo a partir de então calculada em turnos de 12 horas. Os valores obtidos são apresentados na tabela 6.

Todas as linhagens consumiram maior quantidade de açúcar entre 60 e 72 horas de cultivo, não havendo diferença significativa no padrão de consumo de açúcar.

Ensaio em Fermentômetro

A evolução de CO₂ dos cultivos em meio YUKX é apresentada na figura 13. Não houve diferença significativa de desprendimento de CO₂ entre as linhagens testadas. Nas condições testadas, a produtividade de etanol estimada apresenta valores baixos e pouco interessantes para aplicação industrial. A produção de biomassa foi mensurada somente ao final do processo, com

resultados apresentados na tabela 7. As alterações de pH do meio promovidas no ensaio em fermentômetro foram diferentes das observadas na construção da curva de crescimento, sendo que IB04 e IB09 elevaram o pH para 6,31 e 6,53 respectivamente, enquanto LC27 não alterou o pH do meio.

Tabela 7: Biomassa produzida durante o ensaio em fermentômetro.

	Linhagem		
	LC27	IB04	IB09
Biomassa (g/L)	20,1	24,0	19,2

Observado o aumento da biomassa e os baixos valores de evolução de CO₂, é possível estimar que o tamanho do inóculo tenha sido um fator limitante ao processo fermentativo, com utilização das fontes de carbono do meio para construção de biomassa. Considerando que a única condição distinta entre o ensaio em fermentômetro e o cultivo para curva de crescimento foi a vedação do sistema, é possível que a diferença na aeração tenha sido o fator responsável pela alteração de pH em padrões também distintos. Este deve ter sido o mesmo fator limitante para a evolução de CO₂ (produção de etanol), já que as leveduras que produzem etanol a partir de D-xilose o fazem em condições aeróbias (CONVERTI et al., 1999).

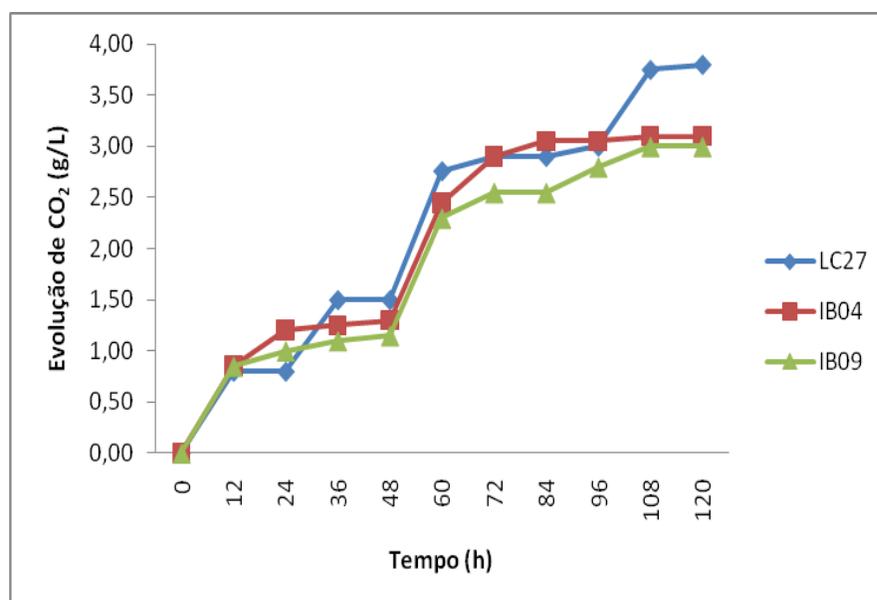


Figura 13: Evolução de CO₂.

A maior atividade fermentativa foi observada em LC27 (3,8 g/L). IB04 atingiu valor máximo após 84 horas de fermentação. LC 27 e IB09 atingiram máximo de evolução de CO₂ após 108 horas de cultivo. Os resultados apontam potencial fermentativo, mas com baixa produtividade, como apresentado por *S. cerevisiae* recombinante, produzida por Matsushika et al. (2008). A quantidade de álcool produzida é estimada em 3,97, 3,24 e 3,14 g/L por LC27, IB04 e IB09, respectivamente. A baixa produtividade está provavelmente associada a capacidade reduzida de crescimento em condições anaeróbias usando D-xilose como fonte de carbono.

Termotolerância e Tolerância ao Etanol

A tolerância a temperaturas elevadas é apontada como uma das características necessárias a qualquer microrganismo usado em bioprocessos fermentativos, pois o calor é um fator limitante do crescimento microbiano e um dos maiores gastos da indústria de fermentação está relacionado ao uso de água para resfriamento e manutenção das temperaturas viáveis ao metabolismo microbiano (GOLDEMBERG, 2008). Entre as três linhagens testadas, a menor viabilidade celular após o choque térmico de 9 minutos foi observada em LC27. IB04 e IB09 apresentaram valores semelhantes, sem diferença significativa (figura 13).

Vianna et al. (2008) mencionam dois tipos de choques térmicos. O choque térmico não letal consiste na incubação dos frascos com as culturas em banho-maria a 52 °C com aclimação prévia a 40 °C por 60 minutos. A incubação a 52 °C sem a aclimação é definida pelo autor como choque térmico letal, teste aplicado neste experimento. A taxa de sobrevivência de IB04 e IB09 ao choque térmico letal foi semelhante ao de linhagens selvagens de *S. cerevisiae* (UFMG-A905, UFMG-A1003 e UFMG-A1007), empregadas na fermentação para produção de cachaça, quando submetidas ao choque térmico não letal. As referidas linhagens de *S. cerevisiae*, quando submetidas ao choque térmico letal, apresentaram taxa de sobrevivência inferior a IB04 e IB09.

As colônias foram contadas após 24 horas de incubação, sendo que t_1 , t_2 e t_3 correspondem respectivamente a sementeira após 3, 6 e 9 minutos de incubação a 52 °C. O número de colônias tornou-se incontável a partir das 48 horas. Observou-se redução gradual no número de unidades formadoras de colônia em LC27, fato não observado para IB04 e IB09 (tabela 8).

Aplicando-se os conceitos cunhados por Vianna et al. (2008) e Ogawa et al. (2000), IB04 e IB09 são termotolerantes, mantendo a viabilidade celular após choque térmico em valores equiparáveis aos observados em linhagens tradicionalmente aplicadas na indústria da fermentação. Esta característica reduz os custos industriais, principalmente a utilização de água, no resfriamento dos reatores, além de permitir o uso do choque térmico como ferramenta seletiva, eliminando microrganismos contaminantes presentes no reator (NIGAM, 2000).

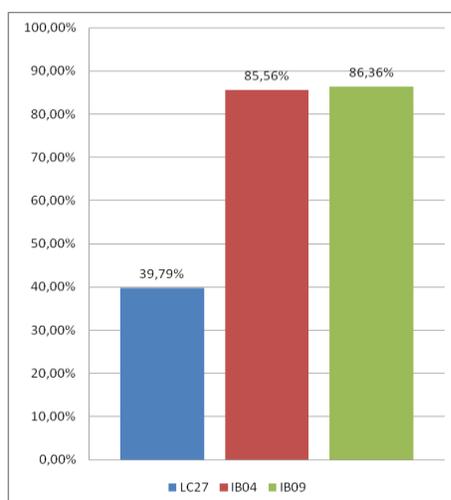


Figura 13: Comparação da proporção de células viáveis de cada linhagem após choque térmico.

Tabela 8: Contagem de colônias formadas em 24 horas após 3 (t_1), 6 (t_2) e 9 (t_3) minutos de choque térmico (52°C).

Tempo	Linhagem		
	LC27	IB04	IB09
t_1	87	48	51
t_2	64	44	46
t_3	33	43	45

A contagem do número de unidades formadoras de colônias após cultivo estacionário em YPD (adicionado de 20% de etanol) apresentou resultados semelhantes para as três linhagens e, assim

como o cultivo subsequente ao choque térmico, o número de UFC tornou-se incontável a partir das 48 horas de incubação (figura 14). Os números de UFC's de cada linhagem obtidos em 24 horas estão expressos na tabela 9.

Tabela 9: Contagem de colônias formadas em 24 horas após 7 dias de incubação em YPD + etanol (20% v/v).

	Linhagem		
	LC27	IB04	IB09
UFC	71	89	74

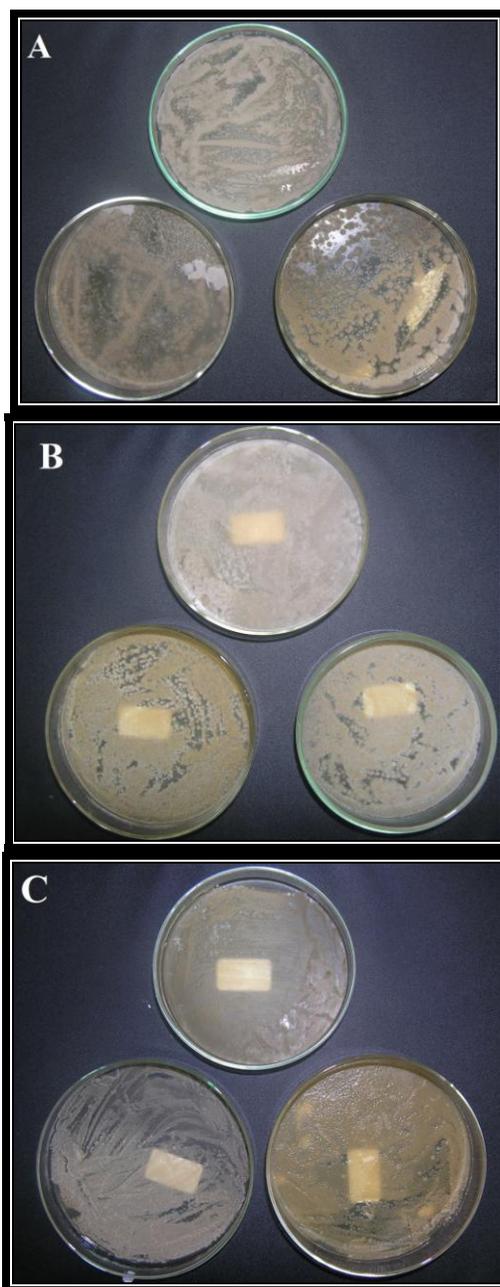


Figura 14: Semeadura em placas de Petri contendo YNBX (20 g/L de Agar) após 7 dias de cultivo estacionário em YPD + 20% de Etanol (v/v). A: LC27, B: IB04 e C: IB09.

Conclusões

As linhagens selecionadas apresentam bom desempenho na produção de biomassa, superando algumas linhagens industriais de *K. marxianus*, *P. tannophilus* e *S. cerevisiae* quando cultivadas em condições semelhantes.

Todas apresentam tolerância ao etanol e elevada tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, fato evidenciado pela elevação do pH, indicando a assimilação de ácidos orgânicos, podendo ser aplicadas para biodetoxificação deste tipo de substrato.

A elevação da concentração de açúcar redutor total nas primeiras horas de cultivo evidencia potencial sacarificante, aumentando a dosagem de ART em valores até duas vezes maiores que os propiciados por kits enzimáticos comerciais.

Entre as três linhagens analisadas, LC27 apresenta maior tolerância frente ao hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, mantendo maior taxa de viabilidade celular (90,34%) após 120 horas de cultivo. Apesar disso, esta é a que apresenta menor termotolerância, podendo apresentar limitações quanto a aplicabilidade industrial.

A evolução de CO₂ revela potencial fermentador, todavia com produtividade muito reduzida quando comparada a outras espécies tradicionalmente usadas na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos, com a clara necessidade de novas pesquisas afim de se definir as condições ideais para exploração do potencial biotecnológico destas leveduras com máxima rentabilidade.

Referências Bibliográficas

- A. PESSOA, Jr.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. **Journal of Biotechnology**. 51: 83-88. 1996.
- BRASIL. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Junho – 2006**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 23 de novembro de 2009.
- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, A.P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 14: 809-821. 1998.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** DOI 10.1007/s12010-009-8792-8. 2009.
- COCKERILL, S. e MARTIN, C. Are biofuels sustainable? The EU perspective. **Biotechnology for Biofuels**. 1: 9-14. 2008. DOI:10.1186/1754-6834-1-9
- CONVERTI, A.; PEREGO, P. e DOMÍNGUEZ, J.M. Microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus* at different pH values. **Biotechnology Letters**. 21: 719–723, 1999.
- DIEN, B.S.; NICHOLS, N.N.; O'BRYAN, P.J.; BOTHAST, R.J. Development of New Ethanologenic *Escherichia coli* Strains for Fermentation of Lignocellulosic Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 84: 181-196, 2000.
- DUARTE, L.C.; CARVALHEIRO, F.; LOPES, S.; NEVES, I. e GÍRIO, F.M. Yeast Biomass Production in Brewery's Spent Grains Hemicellulosic Hydrolyzate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 148:119–129. 2008. DOI 10.1007/s12010-007-8046-6
- GOLDEMBERG, J. e LUCON, O. Energy and Environment in Brazil. **Estudos avançados**. 21: 7-20. 2007.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**. 1:6-13. 2008. DOI:10.1186/1754-6834-1-6
- HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A. e TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology** 100: 1238–1245. 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.062

- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology**. 74:937–953. 2007. DOI 10.1007/s00253-006-0827-2
- HEER, D. e SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. **Microbial Biotechnology**. 1(6): 497–506. 2008. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2008.00050.x
- HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S.S.; SARROUH, B.F.; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J. e QIU, X. Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology**. 152:199–212. 2009. DOI 10.1007/s12010-008-8249-5
- IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**. Brasília: SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 de novembro de 2009.
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. 2008. DOI:10.1016/j.biortech.2008.11.047
- NIGAM, J.N. Cultivation of *Candida lusitana* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 16: 367–372, 2000.
- OGAWA, Yoshiaki; NITTA, Asako; UCHIYAMA, Hirofumi; HIMAMURA, Takeshi; SHIMOL, Hitoshi; ITO, Kiyoshi. Tolerance Mechanism of the Ethanol-Tolerant Mutant of Sake Yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Nº. 3, v. 90, p. 313-320, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. e SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. 74: 69–80. 2000.
- PEDROSO, A.F. Aditivos na Ensilagem de Cana-de-açúcar. **Circular Técnica – MAPA**. 2004.
- RÍPOLI, T.C.C.; MOLINA JR., W.F.; RÍPOLI, M.L.C. Energy potential of sugar cane biomass in Brazil. **Scientia Agricola**. v.57, n.4: 677-681. 2000.
- RODRIGUES, E.G.; LIRIO, V.S.; LACAZ, C.S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse medico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. 34(2): 159-165. 1992.
- SAHA, Badal C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial and Microbiology and Biotechnology**. Nº 30, p. 279–291, 2003.

- SANCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A.J. e CAMACHO, F. Comparative study of the fermentation of D-glucose/D-xylose mixtures with *Pachysolen tannophilus* and *Candida shehatae*. **Bioprocess Engineering**. 21: 525-532. 1999.
- TAKAHASHI, Caroline Maki; LIMA, Katia Gianni de Carvalho; TAKAHASHI, Debora Fumie; ALTERTHUM, Flavio. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Nº 16: 829-834, 2000.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.D. Produção de Carotenóides: Microrganismos como Fonte de Pigmentos Naturais. **Química Nova**. X: 1-8. 2009.
- VIANNA, C.R.; SILVA, C.L.C.; NEVES, M.J. e ROSA, C.A. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaca: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. **Antonie van Leeuwenhoek**. 93:205–217. 2008. DOI 10.1007/s10482-007-9194-y
- WHITE, J.S.; YOHANNAN, B.K. e WALKER, G.M. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. **FEMS Yeast Research**. 8: 1175–1184. 2008. DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00390.x
- WILKINS, M.R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT, I.M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**. 43: 346–350. 2008.
- XU, C.P.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. **Process Biochemistry**. 38: 1025-1030. 2003.
- ZHAO, L.; YU, J.; ZHANG, X. e TAN, T. The Ethanol Tolerance of *Pachysolen tannophilus* in Fermentation on Xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2008. DOI: [10.1007/s12010-008-8308-y](https://doi.org/10.1007/s12010-008-8308-y)

CONCLUSÃO GERAL

A necessidade de selecionar novas linhagens, ou mesmo espécies ainda não descritas, no intuito de possibilitar a fermentação de pentoses faz-se cada vez mais evidente. Sendo esta uma característica não tão disseminada quanto a capacidade fermentativa de hexoses, evidenciado pelo baixo número de fermentadores (somente três) encontrados entre as 76 colônias isoladas. Os esforços devem ser concentrados tanto na seleção de novos fermentadores como na otimização dos bioprocessos efetuados pelas cepas fermentadoras.

Conforme predito por Breznak (1982) e Blackwell (2004), cupins e besouros são *habitat* natural de diversos microrganismos capazes de assimilar e fermentar pentoses. A realidade amazônica, no tocante aos *habitat* avaliados, condiz com o que fora postulado por estes dois autores.

Embora as três linhagens selecionadas demonstrem capacidade fermentativa frente a D-xilose, ficou evidente que as condições utilizadas nos ensaios em fermentômetro não são as ideais para que estas fermentassem a referida pentose com produtividade economicamente viável.

As linhagens selecionadas demonstram potencial biotecnológico, já que apresentam tolerância ao etanol, termotolerância (duas das três linhagens) e produzem biomassa em hidrolisado hemicelulósico com elevado teor de inibidores do crescimento microbiano.