



XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS

30 de julho-02 de agosto de 2013
Foz de Iguaçu, PR, Brasil



CULTIVO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ADAPTADA EM D-XILULOSE SOB CONDIÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS

C. A. G. SUAREZ¹, I. D. CAVALCANTI-MONTANO¹, A. C. L. HORTA², R. C. GIORDANO¹, R. SOUSA Jr.¹, E. C. FERREIRA³, I. ROCHA³ e T. C. ZANGIROLAMI¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química.

² Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química.

³ Universidade do Minho (Braga – Portugal), Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia - Centro de Engenharia Biológica

E-mail para contato: carlogalen21@gmail.com

RESUMO – O desenvolvimento de um processo para produção de etanol com uma alta produtividade a partir de D-xilulose é de grande interesse econômico. Esse processo pode agregar maior valor aos resíduos lignocelulósicos, além de promover um aproveitamento completo da biomassa, utilizando-se suas frações celulósica e hemicelulósica para a obtenção de etanol. O objetivo do presente trabalho foi estudar a assimilação de D-xilulose, o crescimento e a produção de etanol e xilitol em cultivo de levedura de panificação de *Saccharomyces cerevisiae* em condições aeróbias e anaeróbias. Os experimentos foram conduzidos em biorreator de bancada de 2L, utilizando meio mínimo contendo a mistura xilose-xilulose. Os cultivos foram realizados com colônia de levedura previamente selecionada a partir de experimentos de *screening* com mais de 20 colônias de isoladas de levedura comercial que apresentaram crescimento em meio mínimo contendo a mistura xilose-xilulose em condições anaeróbias. A fermentação da D-xilulose pela levedura na ausência de oxigênio resultou na produção de 4,2 g/L de etanol e 3,7 de xilitol. Já o crescimento da levedura em condições aeróbias forneceu como produto principal a biomassa, com formação de 8 g/L e como subproduto o xilitol, com concentração máxima de 2,0 g/L.

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica tem um grande potencial para produzir uma nova geração de combustíveis líquidos usando os açúcares que são obtidos na hidrólise da celulose e da hemicelulose presentes na biomassa. *S. cerevisiae* é um candidato promissor para a indústria de produção de biocombustíveis devido à sua robustez, tolerância e produtividade elevada de etanol. O uso desta levedura para uma fermentação eficiente dos açúcares da fração C5 (principalmente xilose obtida da hemicelulose) é necessário para atingir processos economicamente viáveis para a produção de etanol 2G. *S. cerevisiae* pode fermentar xilulose, a qual pode ser obtida a partir da isomerização de xilose pela enzima xilose-isomerase. A fermentação pode gerar etanol e/ou xilitol, dependendo das condições de cultivo e das características da linhagem empregada. Porém, a formação de ambos é de fato determinada pelos fluxos metabólicos na complexa rede de reações intracelulares, em particular aquelas que integram as vias de assimilação de pentoses pela célula. Este trabalho tem como objetivo o estudo, em biorreator, da conversão de D-xilulose em biomassa, etanol e outros subprodutos, sob condições aeróbias e anaeróbias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Organismo

Foi utilizada *S. cerevisiae* na forma de fermento biológico fresco (Itaiquara, Brasil), nas etapas de seleção de leveduras adaptadas à xilulose. Após ativação do fermento por 1 hora em meio YPD líquido, realizou-se crescimento em meio sólido YPD com o intuito de isolar colônias puras, isentas de outros microrganismos presentes no fermento biológico. Vinte colônias isoladas a partir do meio sólido foram transferidas para meio líquido contendo 20 g/L de xilulose e cultivadas em cubetas de 1 mL seladas para seleção da colônia mais adaptada, a qual foi armazenada em glicerol a 20% e - 80 °C.

2.2. Substrato

Estoques de xarope xilose-xilulose foram preparados segundo Chiang *et. al.* (1981), usando a enzima xilose-isomerase. A isomerização foi realizada em pH 7,0 e temperatura de 68 °C, com uma concentração inicial de xilose de 700 g/L e 3mM de Mg²⁺. O xarope foi produzido por precipitação seletiva da xilose com etanol a 4 °C, seguida por concentração em rotoevaporador e liofilizador, obtendo-se um xarope contendo 70% de xilulose-30% de xilose.

2.3. Meios de cultivo

Meio YPD (propagação do fermento biológico, preparo de pré-inóculo e inóculo): 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose. Meio YDP modificado (adaptação da levedura): 20 g/L de xilulose, 20 g/L de xilose e demais componentes nas mesmas concentrações indicadas acima.

2.4. Cultivos em biorreator

Os cultivos em batelada foram realizados em biorreator tipo tanque agitado, encamisado e aerado, com uma capacidade de 2 litros (Applikon, Netherlands), contendo 1 litro de meio mínimo (5,0 g/L de KH₂PO₄, 2,0 g/L de MgSO₄.7H₂O e 1,5 g/L de ureia), acoplado a um sistema de aquisição de dados e a um analisador de gases. No cultivo aeróbio, a agitação e a aeração foram ajustadas ao longo do cultivo para garantir que a concentração de O₂ dissolvido fosse mantida em 30% da saturação. Foi utilizada uma concentração inicial de xilulose de 28 g/L. No cultivo anaeróbio, o biorreator foi equipado com mangueiras de Norprene e borbulhado com N₂ ultrapuro (O₂ 0,9 ppm) por 12 horas antes da inoculação. O meio continha 14 g/L de xilulose e foi suplementado com 10 mg/L de ergosterol e de 420 mg/L de Tween 80. Nos dois experimentos, a temperatura foi mantida em 31 °C e o pH foi fixado em 5,0, o qual foi controlado pela adição de soluções de NaOH 5M ou de H₃PO₄ a 20%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 1 (a) ilustra o crescimento aeróbio, em biorreator, da levedura selecionada, tendo xilulose como substrato. O perfil de crescimento se mostra constante durante todo o experimento, com velocidade específica (μ) de 0,023 h⁻¹, valor este que é baixo se comparado com $\mu_{max} = 0,45$ h⁻¹ da *S. cerevisiae* crescendo em glicose (Flikweert *et al.*, 1995). Esta baixa velocidade de crescimento pode estar relacionada a vários fatores, dentre eles o transporte e a

assimilação de pentoses. *S. cerevisiae* transporta hexoses e outros açúcares por meio de transportadores codificados pela família de genes HXT (Kruckeberg, 1996), que também transportam xilose com baixa eficiência, apresentando valores de $K_{m_{xilose}}$ cerca de 5-200 vezes maiores do que para glicose (Moraes, 2013). Não há estudos sobre o transporte de xilulose em *S. cerevisiae*, mas como a xilulose é isômero da xilose, supõe-se que o transporte seja igualmente deficiente. Outra possível razão para a baixa velocidade de crescimento da levedura em xilulose é o metabolismo desta pentose pela via Pentose Fosfato (VPF). De fato, *S. cerevisiae* apresenta baixa atividade de xiluloquinase e menor capacidade de fosforilação de xilulose do que outras leveduras. Além disso, a VPF desempenha um papel totalmente diferente da glicólise para célula e os fluxos pela VPF são naturalmente menores do que os da glicólise (Moraes, 2013).

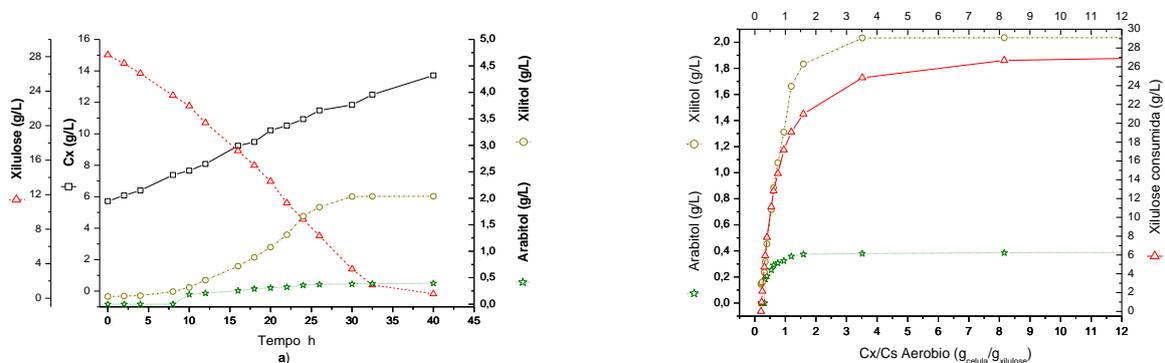


Figura 1 (a) - Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições aeróbias. Temperatura de 31 °C e pH 5,0. Figura 1 (b) - Variação na produção de xilitol, arabitol e consumo de xilulose como função da razão Cx/Cs.

A Figura 1a também indica o consumo de xilulose pela levedura, com esgotamento quase total do substrato. A partir dos dados apresentados na Figura 1a estima-se um fator de conversão de xilulose em células ($Y_{X/S}$) de $0,27 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{xilulose}}$. Durante o cultivo aeróbico, além da formação de biomassa, arabitol e xilitol foram produzidos, sendo este último o principal subproduto formado, com um fator de conversão ($Y_{\text{XOH}/S}$) de $0,1 \text{ g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilulose}}$. A formação de xilitol apresentou um perfil exponencial entre 8 e 24 horas de ensaio, intervalo no qual a relação Cx/Cs está entre 0,3 e $1,2 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{xilulose}}$ (Figura 1b) e ocorre o consumo mais intenso de xilulose. A análise da Figura 1b sugere uma relação entre o valor de Cx/Cs e a velocidade de produção de xilitol que, para o caso do cultivo aeróbico, sofre uma desaceleração quando o valor de Cx_i/Cs_i está acima de $1,2 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{xilulose}}$ e permanece constante para valores de Cx/Cs acima de 3,5, ainda com xilulose presente no meio ($\sim 3,4 \text{ g/L}$), indicando possível ocorrência de metabolismo *overflow* durante o catabolismo da xilulose.

A Figura 2a apresenta os principais resultados do cultivo em condição anaeróbia. Pode-se observar que a levedura não apresentou crescimento durante as 10 horas de cultivo, mas houve consumo quase que total da xilulose, chegando a um valor residual de 0,2 g/L e produção de 4,2 g/L de etanol ($Y_{\text{ETOH}/S}=0,19 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilulose}}$) e 3,7 g/L de xilitol ($Y_{\text{XOH}/S}=0,23 \text{ g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilulose}}$). Para a condição anaeróbia, a velocidade de produção de xilitol sofre uma desaceleração (Figura 2 (b)) quando o valor da relação Cx/Cs está acima de 5 ($[\text{xilulose}] < 2 \text{ g/L}$). Na condição anaeróbia, *S. cerevisiae* necessita da regeneração de co-fatores NAD⁺,

havendo, por outro lado, excesso de NADPH, fato que resulta em acúmulo de xilitol (Meinander *et al.*, 1996).

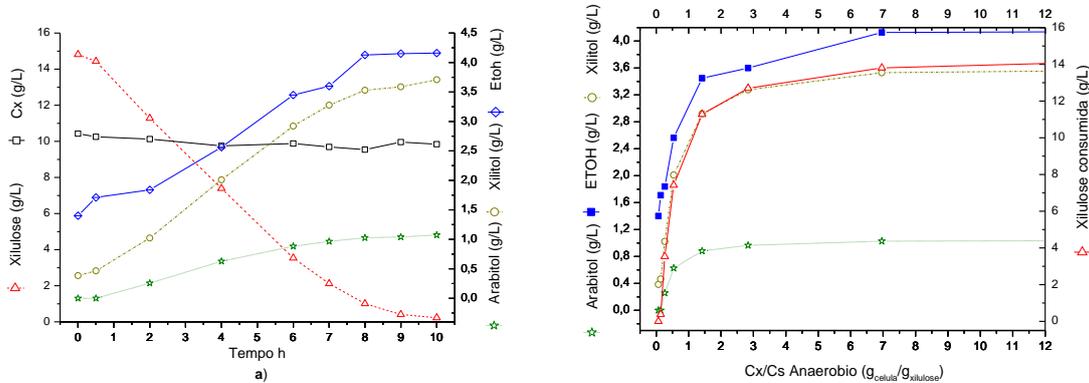


Figura 2 (a) - Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições anaeróbias. Temperatura de 31 °C e pH 5,0. Figura 2 (b) - Variação na produção de etanol, xilitol, arabitol e consumo de xilulose em função da razão Cx/Cs.

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam que para cultivos estritamente anaeróbios, a linhagem utilizada de *S. cerevisiae* apresenta um maior direcionamento da xilulose para a produção de xilitol ($Y_{XOH/S} > Y_{ETOH/S}$), provavelmente pela necessidade de regenerar os co-fatores presentes na cadeia metabólica. Identificar uma condição ótima de operação por limitação do fornecimento de oxigênio que favoreça a produção de etanol é fundamental para o estabelecimento de um processo industrial baseado no aproveitamento da fração hemicelulósica e será investigada em futuros experimentos.

5. REFERÊNCIAS

- CHIANG, L. C. et al. Enzymatic and Microbial Preparation of D-Xylulose from D-Xylose. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 42, p. 66-69, 1981.
- FLIKWEERT, M. T.; VAN DER ZANDENS, L.; JANSSENT, W. TH. M.; STEENSMATI, H.Y.; VAN DIJKENT, J. P.; PRONKT, J. T. Pyruvate Decarboxylase: An Indispensable Enzyme for Growth of *S. cerevisiae* on Glucose. *Yeast*, v.12 p. 247-257, 1995.
- KRUCKEBERG, A. L. The hexose transporter family of *S. cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, v. 166, p. 283-92, 1996.
- MEINANDER, N. et al. A heterologous reductase affects the redox balance of recombinant *S. cerevisiae*. *Microbiology*, p. 142, v. 165-172, 1996.
- MORAES, G.S. Influência da levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação simultâneas da xilose. Dissertação de Mestrado, PPGEQ-UFSCar, 2013.

Os autores agradecem à FCT/Capes, ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro e ao Prof. Dr. Andreas Gombert pelas valiosas sugestões para o desenvolvimento do trabalho.