

Seleção e caracterização de leveduras capazes de crescer em compostos aromáticos derivados da lignina

Julia Mourão Fernandes¹, Livia Teixeira Duarte-Brandão², João Ricardo Moreira de Almeida³

Resumo

A utilização da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias para a produção de biocombustíveis e bioprodutos gera grandes quantidades de lignina, tornando necessária a valorização dessa matéria-prima. Tal valorização pode ser obtida pela conversão de compostos aromáticos derivados da lignina (CADLs) por linhagens microbianas capazes de metabolizá-los em biomassa celular e em outros produtos de alto valor agregado. Nesse cenário, este trabalho buscou selecionar entre 76 linhagens de leveduras de diferentes espécies aquelas capazes de crescer em meios cuja única fonte de carbono fossem CADLs catecol, vanilina, ácido protocatecuico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido 4-hidroxibenzoico. Para tanto, foram realizados inicialmente ensaios de crescimento em microplaca para determinar o potencial de cada linhagem. De forma geral, as linhagens cresceram nos compostos ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, catecol, ácido p-cumárico e ácido ferúlico, e nenhuma linhagem foi capaz de crescer em vanilina e ácido siríngico. A partir dos resultados obtidos, foi possível selecionar 11 linhagens para análise da cinética de crescimento nos compostos catecol, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico com concentração de 20 mM. Em conclusão, foi possível selecionar três linhagens com capacidade de crescimento elevado (OD600) em até 20 mM de ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido vanílico.

Termos para indexação: biomassa lignocelulósica, lignina, CADLs, bioprospecção.

Introdução

No contexto da bioeconomia, a substituição de combustíveis fósseis por alternativas de energia limpa e sustentável tem se tornado cada vez mais relevante, em especial no que tange à utilização de biomassa oriunda de processos agroindustriais para a produção de biocombustíveis, mas que não se resume a isso (Claassen et al., 1999; Nanda et al., 2015). A biomassa lignocelulósica é extremamente abundante, possuindo um grande potencial de aplicação em biorrefinarias, tanto para a produção de biocombustíveis como para a produção de coprodutos de alto valor agregado (Ashokkumar et al., 2022).

A biomassa lignocelulósica é formada majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Enquanto a celulose e a hemicelulose são de interesse em biorrefinarias para a produção de bioetanol e diversos outros produtos, a lignina é considerada um subproduto de baixo valor, em razão da sua estrutura complexa e heterogênea. Todavia, por ser o segundo polímero mais abundante no planeta, torna-se imprescindível um melhor aproveitamento em processos bioquímicos, em especial na geração de produtos de alto valor agregado, como aqueles derivados de compostos

¹ Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, julia.fernandes@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas Embrapa Agroenergia, livia.duarte@embrapa.br

³ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

aromáticos, uma vez que a lignina é a maior fonte renovável desses compostos (Abdelaziz et al., 2016; Iram et al., 2021; Weng et al., 2021).

Os compostos aromáticos derivados de lignina (CADLs) são formados a partir do bioprocessamento da lignina, que ocorre por meio de sua despolimerização por microrganismos em monômeros mais simples, formando diversos compostos aromáticos, que podem sofrer bioconversão em outros produtos, como lipídios microbianos, vanilina e poli-hidroxicarboxilatos (PHAs) (Abdelaziz et al., 2016; Iram et al., 2021; Weng et al., 2021). É neste cenário que a bioprospecção pode atuar em dois momentos distintos do processo: durante a despolimerização, com a utilização de microrganismos capazes de produzir enzimas modificadoras de lignina (LMEs); e durante a bioconversão, por meio de microrganismos capazes de catabolizar aromáticos e realizar a clivagem do anel, desse modo gerando produtos de interesse para o mercado (Weng et al., 2021).

Já são descritas na literatura diversas espécies de bactérias, fungos e leveduras que utilizam CADLs como fonte de carbono em seus processos metabólicos (Chen; Wan, 2017; Weng et al., 2021). Alguns estudos mostram o potencial de certas espécies de leveduras para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como ácido mucônico, lipídios e terpenos (Almqvist et al., 2021; Yaegashi et al., 2017; Yaguchi et al., 2020). Todavia, ainda existe um número muito limitado de linhagens capazes de metabolizar tais compostos, especialmente em concentrações acima de 10 mM, o que pode ser contornado pela bioprospecção de novas linhagens microbianas (Chen et al., 2009). Desse modo, o objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade de crescimento em CADLs de 76 linhagens de leveduras. Para tanto, foram escolhidos oito CADLs como únicas fontes de carbono no meio de cultura: catecol, vanilina, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido protocatecuico e ácido 4-hidroxibenzoico.

Materiais e métodos

Pré-inóculo. Foram analisadas ao total 76 linhagens de leveduras. Setenta e três delas fazem parte da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia e três são linhagens de *Komagataella phaffii* engenheiradas pelo grupo de pesquisa. Todas as leveduras foram pré-cultivadas durante a noite em 5 mL do meio de cultura YNB (*Yeast Nitrogen Base*) suplementado com 20 g/L de glicose, com agitação de 200 rpm e temperatura de 28 °C. Para início dos experimentos, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com YNB com aminoácidos. O processo foi repetido duas vezes.

Meios de cultivo. Foi analisado o crescimento das leveduras em oito meios distintos, cada um contendo uma diferente fonte de carbono, que incluem os oito CADLs: ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido protocatecuico, vanilina, catecol. Como controle negativo, também foi feita análise de crescimento em um meio sem fonte de carbono. Como controle positivo, glicose 20 g/L foi utilizada como fonte de carbono. Os meios consistiram de YNB, tampão de ftalato de potássio monobásico com pH tamponado para 5,5, e a sua respectiva fonte de carbono em concentração de 10 mM e 20 mM.

Avaliação do crescimento. Foi feita a avaliação da capacidade de crescimento das leveduras nos meios preparados no tópico acima. Para tanto, as leveduras foram inoculadas em triplicata em 250 µL de cada meio com concentração de CADLs 10 mM em microplacas de 24 poços. Após o inóculo, as placas foram seladas com filme adesivo e então incubadas em temperatura ambiente por 120 horas. Foram feitas as medições de absorbância a 600 nm nos tempos 0h e 120h, no espectrofotômetro SpectraMax M2. No caso das placas contendo glicose, foram feitas as leituras da OD nos tempos 0h e 24h. Além das medições de OD, também foi feita análise visual das placas no tempo 120h.

Avaliação da cinética de crescimento. As leveduras foram inoculadas em triplicata em 500 μ L de cada meio com concentração de CADLs 20 mM em microplacas de 48 poços. Após o inóculo, elas foram incubadas a 30 °C no espectrofotômetro de microplaca EPOCH 2 por 92 horas e 120 horas, com leituras de absorbância a 600 nm programadas a cada 2 horas.

Resultados e discussão

Para a análise do crescimento das linhagens estudadas, foi feito o cálculo da diferença de OD final em relação à OD inicial. Para a maioria dos compostos, o tempo final foi de 120 horas, com exceção do meio de glicose (controle positivo), no qual o tempo final foi 24 horas. Visto que o experimento foi realizado em triplicata, foi feita a média dos valores obtidos. Para criação de um *heatmap* e visualização dos resultados, foram adotados os parâmetros demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros analisados.

OD final - OD inicial			
Resultado igual ou menor que 0	Resultado entre 0 e 0,05	Resultado entre 0,05 e 0,1	Resultado maior ou igual a 0,1
Crescimento negativo	Crescimento mínimo	Crescimento médio	Crescimento positivo

Das 76 linhagens de leveduras analisadas, quarenta e uma tiveram crescimento positivo em pelo menos um CADL, o que representa 53,9% das linhagens estudadas. Entre os oito meios analisados, o ácido protocatecuico foi o que obteve maior porcentagem (40,8%) de crescimento de leveduras. Nenhuma das linhagens estudadas obteve crescimento positivo em vanilina ou em ácido siríngico. Na Tabela 2, estão descritas a quantidade e a porcentagem de leveduras com crescimento positivo para cada um dos CADLs analisados no estudo em questão.

Tabela 2. Resultado do screening inicial em CADLs.

Compostos							
Ácido protocatecuico	Catecol	Ácido vanílico	Ácido 4-hidroxibenzóico	Ácido p-cumárico	Ácido ferúlico	Ácido siríngico	Vanilina
31 (40,8%)	12 (15,8%)	11 (14,5%)	11 (14,5%)	9 (11,8%)	6 (7,9%)	0 (0%)	0 (0%)

Dentre os meios contendo CADLs, vinte e duas linhagens de leveduras foram capazes de crescer em pelo menos dois compostos, sendo que 14 conseguiram crescer em ao menos três compostos e somente três linhagens conseguiram crescer em quatro compostos, que foi o máximo observado no experimento. Nenhuma linhagem estudada foi capaz de crescer em todos os CADLs. Foram identificadas três espécies distintas (dados não mostrados), que apresentaram pelo menos três linhagens com capacidade de crescer em CADLs, como mostra a Figura 1.

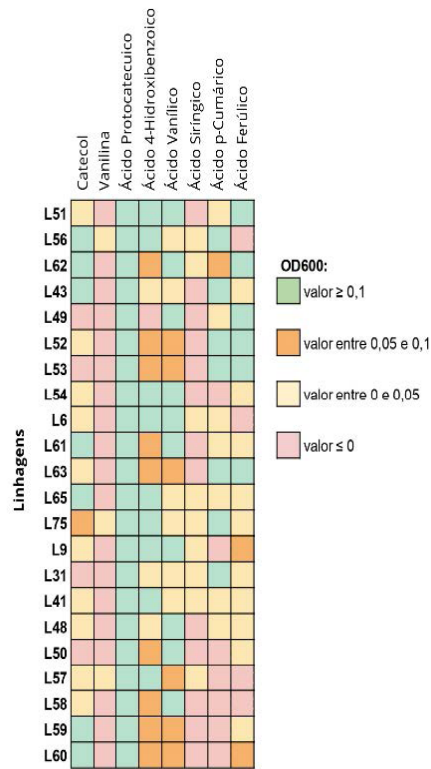


Figura 1. Principais linhagens identificadas com capacidade de crescimento em CADLs.

Entre as 22 linhagens citadas, foram selecionadas 11 que podem ter potencial na conversão de CADLs, sendo elas L6, L9, L41, L48, L49, L50, L52, L53, L56, L62 e L75. A cinética de crescimento de tais linhagens foi realizada em microplacas de 48 poços em concentração de CADLs 20 mM por 92 horas e 120 horas. Foi feita a média das replicatas realizadas. O desempenho das leveduras nas respectivas fontes de carbono em 120h é demonstrado na Figura 2. Com base nessa análise, foram selecionadas três linhagens de leveduras, L48, L50 e L62, com potencial de crescimento nos meios ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico e ácido vanílico em uma concentração maior que 20 mM.

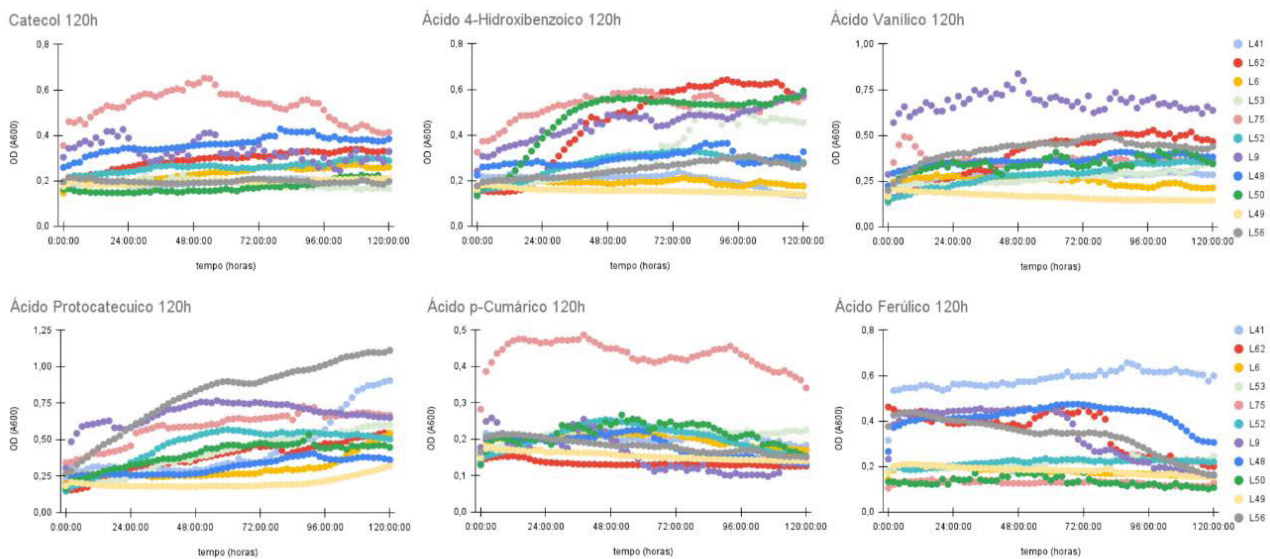


Figura 2. Cinética de crescimento das linhagens em 120h.

A predominância do crescimento das leveduras em determinados meios contendo CADLs, especialmente ácido protocatecuico, está em concordância com o descrito na literatura (Sampaio, 1995). Foi observado durante a realização dos experimentos que diferentes linhagens de uma mesma espécie apresentaram diferentes comportamentos de crescimento, o que pode demonstrar que elas apresentam diferentes fenótipos, o que, por sua vez, pode afetar seu metabolismo.

No estudo, somente foi analisada a capacidade de crescimento das linhagens em CADLs, nas concentrações de 10 mM e 20 mM em microplaca, sendo então de interesse para experimentos posteriores o teste de diferentes concentrações e em maiores volumes, de modo a determinar a concentração ótima, limite e inibitória para o metabolismo das linhagens selecionadas.

Conclusão

Foi possível selecionar três linhagens de leveduras com alto potencial de crescimento nos compostos aromáticos derivados da lignina: ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido vanílico. As linhagens selecionadas pertencem a espécies distintas, ressaltando a importância da diversidade genética em estudos de prospecção.

Referências bibliográficas

- ABDELAZIZ, O. Y.; BRINK, D. P.; PROTHMANN, J.; RAVI, K.; SUN, M.; GARCÍA-HIDALGO, J.; SANDAHL, M.; HULTEBERG, C. P.; TURNER, C.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Biological valorization of low molecular weight lignin. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1318–1346, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.001>
- ALMQVIST, H.; VERAS, H.; LI, K.; HIDALGO, J. G.; HULTEBERG, C.; GORWA-GRAUSLUND, M.; PARACHIN, N. S.; CARLQUIST, M. Muconic acid production using engineered *pseudomonas putida* kt2440 and a guaiacol-rich fraction derived from kraft lignin. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 24, p. 8097–8106, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00933>
- ASHOKKUMAR, V.; VENKATKARTHICK, R.; JAYASHREE, S.; CHUETOR, S.; DHARMARAJ, S.; KUMAR, G.; CHEN, W.; NGAMCHARUSSRIVICHAI, C. Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126195–126195, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195>
- CHEN, X.; LI, Z.; ZHANG, X.; HU, F.; RYU, D. D. Y.; BAO, J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 3, p. 591–604, 2009. DOI: [10.1007/s12010-008-8491-x](https://doi.org/10.1007/s12010-008-8491-x)
- CHEN, Z.; WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 610–621, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.166>
- CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B.; CONTRERAS, A. M. L.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 741–755, 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051586>. Acesso em: 19 set. 2023.
- IRAM, A.; BERENJIAN, A.; DEMIRCI, A. A review on the utilization of lignin as a fermentation substrate to produce lignin-modifying enzymes and other value-added products. **Molecules**, v. 26, n. 10, 2960, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26102960>
- NANDA, S.; AZARGOHAR, R.; DALAI, A. K.; KOZINSKI, J. A. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 925–941, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.058>
- SAMPAIO, J. P. Utilization of low molecular weight lignin-related aromatic compounds for the selective isolation of yeasts: *Rhodotorula vanillii*, a new Basidiomycetous yeast species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 613–619, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80083-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80083-4)
- WENG, C.; PENG, X.; HAN, Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. artigo 84, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01934-w>
- YAEHASHI, J.; KIRBY, J.; ITO, M.; SUN, J.; DUTTA, T.; MIRSIAGHI, M.; SUNDSTROM, E. R.; RODRIGUEZ, A.; BAIDOO, E.; TANJORE, D.; PRAY, T.; SALE, K.; SINGH, S.; KEASLING, J. D.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W.; MAGNUSON, J. K.; ARKIN, A. P.; SKERKER, J. M.; GLADDEN, J. M. *Rhodospiridium torulooides*: a new platform organism for conversion of lignocellulose into terpene biofuels and bioproducts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 241, 2017. DOI: [10.1186/s13068-017-0927-5](https://doi.org/10.1186/s13068-017-0927-5)
- YAGUCHI, A.; FRANASZEK, N.; O'NEILL, K.; LEE, S.; SITEPU, I.; BOUNDY-MILLS, K.; BLENNER, M. Identification of oleaginous yeasts that metabolize aromatic compounds. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 47, n. 9-10, p. 801–813, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02269-5>