

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

C. A. G. SUAREZ<sup>1</sup>, I. D. CAVALCANTI-MONTANO<sup>1</sup>, A. C. L. HORTA<sup>2</sup>, R. C. GIORDANO<sup>1</sup>, R. SOUSA Jr.<sup>1</sup>, E. C. FERREIRA<sup>3</sup>, I. ROCHA<sup>3</sup> e T. C. ZANGIROLAMI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química.

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

E-mail para contato: [carlogalen21@gmail.com](mailto: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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 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  $68^{\circ}\text{C}$ , com uma concentração inicial de xilose de 700 g/L e 3mM de  $\text{Mg}^{2+}$ . O xarope foi produzido por precipitação seletiva da xilose com etanol a  $4^{\circ}\text{C}$ , 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.

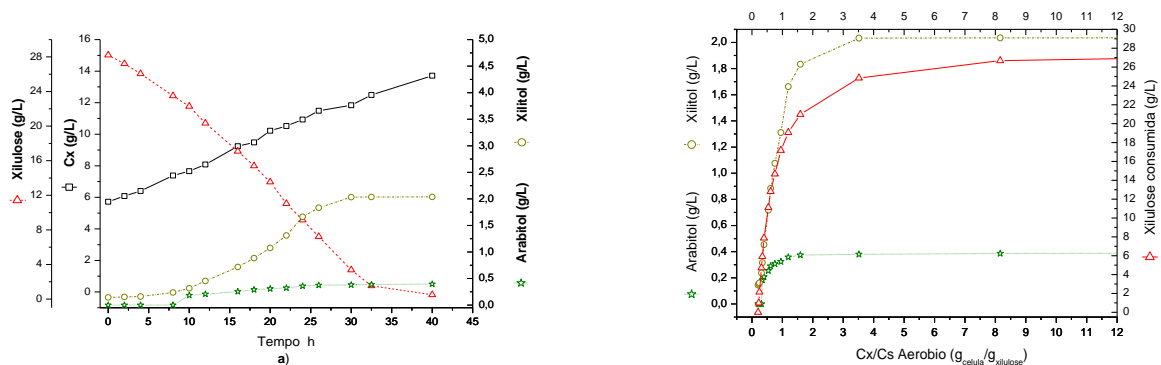
### 2.4. Cultivos em biorreator

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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  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  $\text{O}_2$  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  $\text{N}_2$  ultrapuro ( $\text{O}_2$  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  $31^{\circ}\text{C}$  e o pH foi fixado em 5,0, o qual foi controlado pela adição de soluções de NaOH 5M ou de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  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 ( $\mu$ ) de  $0,023\text{ h}^{-1}$ , valor este que é baixo se comparado com  $\mu_{\text{max}} = 0,45\text{ h}^{-1}$  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).

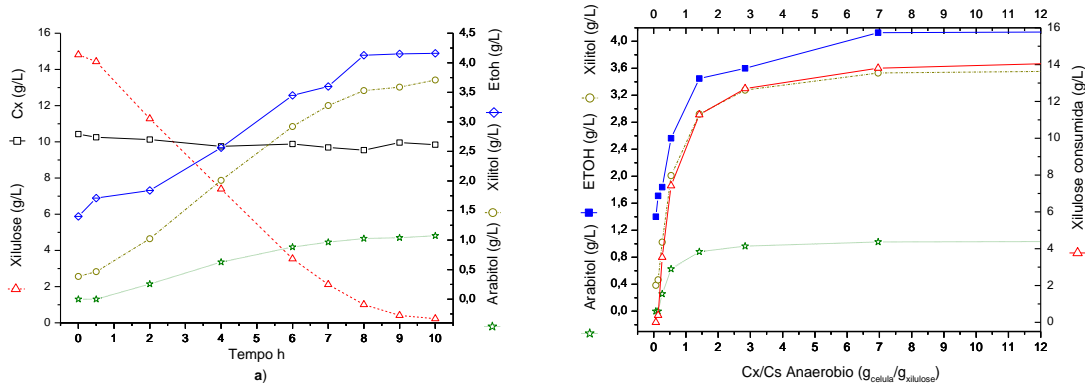


**Figura 1 (a) - Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições aeróbias. Temperatura de 31 °C e pH 5,0. Figura 1 (b) - Variação na produção de xilitol, arabitól e consumo de xilulose como função da razão Cx/Cs.**

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, arabitól 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<sup>+</sup>,

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.