
Ciências Biológicas

MARIA CAROLINA CANALI

**PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS: ESTUDO DOS GÊNEROS
AUREOBASIDIUM E *MEYEROZYMA***



Rio Claro
2015

MARIA CAROLINA CANALI

PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA A PRODUÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS: ESTUDO DOS GÊNEROS *AUREOBASIDIUM* E
MEYEROZYMA

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharela em Ciências Biológicas

Rio Claro
2015

604.6 Canali, Maria Carolina
C212p Prospeção de leveduras para a produção de
biocombustíveis : estudo dos gêneros *Aureobasidium* e
Meyerozyma / Maria Carolina Canali. - Rio Claro, 2015
46 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Resíduos. 2. Açúcares redutores. 3. Bioetanol. 4.
Fermentação. 5. Enzimas hidrolíticas. I. Título.

***Aos meus pais, Vanilde e Nelson, grandes
exemplos de caráter, amor e dedicação.
Dedico***

Agradecimentos

*Agradeço especialmente aos meus pais, Vanilde e Nelson, pelos valores a mim passados, pelo amor incondicional, pelas palavras de incentivo e confiança em todos os momentos. Vocês se doaram por inteiro, muitas vezes abdicaram dos seus sonhos para realizar os meus. Essa conquista é **nossa**!*

Ao meu amor, João Gabriel, por todos os momentos nesses tantos anos de convivência, por tornar minha vida mais leve em todas as etapas e sempre cuidar de mim. Nenhuma palavra será capaz de descrever a felicidade que você me proporciona.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela valiosa orientação, dedicação e disponibilidade que permitiram a realização deste trabalho. Muito obrigada pela oportunidade!

A todos os meus familiares, em especial ao meu tio amado, José Donizeti e a minha praticamente irmã Camila, que sempre torceram por mim e se orgulharam em cada conquista.

À minha amiga querida e inseparável, Daiane, com ela dividi todas as angústias e felicidades desde o primeiro dia de aula. Você é o verdadeiro significado da palavra amizade. Espero dividir muitos outros desafios e realizações com você.

À Dra. Weilan Paixão, sempre disponível para me ajudar nas dúvidas acadêmicas ou não, e pela sincera amizade. Você é um exemplo de dedicação e amor ao próximo, sua presença foi imprescindível durante esses anos. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia: Daniela, Virgínia, Ana Paula e Caio pela colaboração e companheirismo. Vocês tornaram todos os momentos de trabalho mais agradáveis.

A todos do C.E.I.S. e do Departamento de Bioquímica e Microbiologia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A professora Dra Eleni Gomes e toda a sua equipe do IBILCE – Câmpus São José do Rio Preto, pelas análises de fermentação e produção de etanol.

A todos do CBI 2011, por dividir esses anos comigo. Agradeço em especial aos integrantes do meu eterno grupo de trabalho Mariana Barcoto e Gabriela, além do Eric, que não participou de todos os trabalhos, mas com certeza do mais trabalhoso: o de Embriologia. Ainda, gostaria de agradecer ao Granola e ao Blue por esses anos de amizade. Vocês estarão sempre em minhas melhores lembranças por mais que os anos passem e os quilômetros nos distanciem.

Às “velhas amizades” que fazem a minha vida mais agradável em todas as etapas. Eu amo muito vocês: Bruna, Thábita, Delso e os meus queridos carnavalescos Dinâmicos.

Ao Programa PIBIC - CNPQ pelo financiamento deste trabalho.

Por fim, agradeço a Deus por todas as conquistas, por me encorajar frente a cada obstáculo e acima de tudo, pela oportunidade de conviver com pessoas tão especiais.

O importante é não parar de questionar.

ALBERT EINSTEIN

RESUMO

A produção de etanol, assim como outros processos baseados na utilização de matérias-primas renováveis, ganhou destaque nas últimas décadas. Neste cenário, os resíduos agroindustriais tornam-se promissores à produção de etanol de segunda geração. Entretanto, nos resíduos lignocelulósicos a celulose encontra-se bastante protegida, sendo a degradação da fibra vegetal o maior empecilho à produção em escala industrial do etanol de segunda geração. Com o intuito de viabilizar o pré- tratamento enzimático, o estudo de micro-organismos que compõem o jardim de fungos das formigas cortadeiras, como os gêneros *Aureobasidium* e *Meyerozyma*, é uma fonte promissora, uma vez que estes são naturalmente adaptados à degradação da matéria vegetal. Sendo assim, o presente trabalho objetivou ampliar o conhecimento da diversidade funcional e capacidade metabólica destes micro-organismos, a fim de obter linhagens com potencial para a produção de biocombustível. A metodologia utilizada baseou-se no cultivo das linhagens em diferentes resíduos da agroindústria com posterior quantificação dos açúcares redutores (monossacarídeos fermentescíveis) liberados, assim como a quantificação da produção de enzimas hidrolíticas, tais como amilases, endoglucanases, pectinases e xilanases. Os experimentos foram realizados em quintuplicata tendo como controle o resíduo lignocelulósico sem inóculo. Ainda, a capacidade do gênero *Meyerozyma* em fermentar pentoses e produzir etanol foi averiguada. Através destes métodos foi observado que três linhagens pertencentes à espécie *Meyerozyma caribbica*, podem ser úteis em processos industriais. Com relação ao gênero *Aureobasidium*, o seu frequente isolamento associado às formigas cortadeiras e a produção enzimática revelada no presente estudo, indicaram seu potencial na degradação de resíduos vegetais. Entre as linhagens testadas, as mais promissoras em processos biotecnológicos são três isolados da espécie *Aureobasidium leucospermi* e um isolado de *Aureobasidium pullulans*, as quais conseguiram aumentar significativamente ($p < 0,05$) a concentração de monossacarídeos no meio de cultivo. Os maiores valores em Unidades de enzima. mL^{-1} foram obtidos na atividade pectinolítica. Isto indica que essas leveduras representam uma fonte potencial desta enzima.

Palavras-chave: Açúcares redutores. Bioetanol. Enzimas hidrolíticas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVO.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Micro-organismos utilizados.....	11
3.2 Meio para a indução de enzimas lignocelulolíticas e condições de cultivo das leveduras.....	11
3.3 Determinação do crescimento e viabilidade celular.....	12
3.4 Análise de açúcares redutores.....	12
3.5 Determinação das atividades enzimáticas.....	12
3.5.1 <i>Endoglucanase (CMCase) e endoglucanase (CMase).....</i>	<i>13</i>
3.5.2 <i>Xilanase.....</i>	<i>13</i>
3.5.3 <i>Pectinase.....</i>	<i>13</i>
3.5.4 <i>Amilolítica (endoamilase e exoamilase).....</i>	<i>14</i>
3.6 <i>Concentração de sólidos solúveis totais – Grau BRIX.....</i>	<i>14</i>
3.7 Hidrólise ácida e enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	15
3.8 Análise estatística dos dados.....	15
3.9 Teste de assimilação de pentoses.....	15
3.10 Teste de fermentação.....	15
3.11 Teste de produção de etanol.....	16
3.11.1 <i>Teste qualitativo em placa.....</i>	<i>16</i>
3.11.2 <i>Fermentação alcoólica para análises quantitativas.....</i>	<i>16</i>
3.11.3 <i>Quantificação de etanol.....</i>	<i>16</i>
3.11.4 <i>Quantificação de açúcares.....</i>	<i>17</i>
4 RESULTADOS.....	18
4.1 Gênero <i>Aureobasidium</i>.....	18
4.1.1 <i>Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar.....</i>	<i>18</i>
4.1.2 <i>Meio suplementado com sabugo de milho triturado.....</i>	<i>19</i>
4.1.3 <i>Meio suplementado com casca de arroz.....</i>	<i>21</i>

<i>4.1.4 Meio suplementado com casca de café.....</i>	<i>21</i>
<i>4.1.5 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado.....</i>	<i>23</i>
4.2 Gênero <i>Meyerozyma</i>.....	24
<i>4.2.1 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar.....</i>	<i>24</i>
<i>4.2.2 Meio suplementado com sabugo de milho triturado.....</i>	<i>25</i>
<i>4.2.3 Meio suplementado com casca de arroz.....</i>	<i>26</i>
<i>4.2.4 Meio suplementado com casca de café.....</i>	<i>28</i>
<i>4.2.5 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado.....</i>	<i>29</i>
<i>4.2.6 Assimilação, fermentação e produção de etanol.....</i>	<i>30</i>
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	41
APÊNDICE A - ASSIMILAÇÃO, FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE ETANOL PELO GÊNERO <i>MEYEROZYMA</i>.....	43

1 INTRODUÇÃO

A demanda por combustíveis automotores é crescente, o que faz aumentar o interesse por fontes produtoras alternativas. Ainda, o crescente problema das emissões de CO₂ e as preocupações com a segurança energética reforçam a procura por fontes energéticas não petrolíferas (ALVIRA et al., 2010). Neste contexto, o etanol ocupa o primeiro lugar dentre as fontes energéticas renováveis e o Brasil possui posição de destaque mundial na produção desse biocombustível (CANILHA et al., 2009), sendo também o país com maior potencial de expansão da produtividade devido ao clima privilegiado e a disponibilidade de solo para o plantio em larga escala de matéria-prima (BARROS et al., 2014).

O etanol lignocelulósico, produzido a partir de resíduos agroindustriais, conhecido também como etanol de segunda geração, revela-se uma alternativa promissora para incrementar a produção de biocombustíveis. O bioetanol apresenta vantagens energéticas, econômicas e ambientais (ALVIRA et al., 2010), isto porque os resíduos da agroindústria, tais como bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz e casca de café, são fontes abundantes de material lignocelulósico e possuem um baixo custo, além de não competirem pelo uso da terra com culturas alimentares (BARROS et al., 2014).

A conversão de matérias-primas lignocelulósicas, como resíduos agrícolas, à etanol, oferece inúmeros benefícios, mas o seu desenvolvimento é dificultado por obstáculos econômicos e técnicos (ALVIRA et al., 2010). O pré-tratamento do substrato, constitui o principal entrave a produção em larga escala, sendo responsável por 60-70% do custo de produção do etanol de segunda geração (BARROS et al., 2014). Segundo Bornscheuer et al. (2014), algumas estimativas sugerem que o custo de produção do etanol lignocelulósico é cerca de US \$ 0,5 por litro, sendo quase duas vezes maior que o custo de produção do etanol de primeira geração.

O alto custo do pré-tratamento se deve à natureza altamente resistente da biomassa vegetal. Em geral, os resíduos lignocelulósicos, são compostos por celulose (33-51%), hemicelulose (19-34%) e lignina (21-32%), sendo o restante de sua composição representado por cinzas (0-2%) e extrativos (1-5%) (ALMEIDA, 2007; BORNSCHEUER et al., 2014). A celulose e a hemicelulose são componentes propensos à hidrólise química e enzimática mas o problema maior reside na lignina

(SOARES, 2012) cuja natureza recalcitrante dificulta o metabolismo enzimático e, consequentemente, a obtenção de monossacarídeos fermentescíveis a partir das enzimas atualmente disponíveis. Desta maneira, o custo da conversão de celulose em glicose livre e posteriormente em biocombustível torna o processo desvantajoso (CORTEZ, 2010).

Portanto, estudos nesse campo são necessários visando vencer essas dificuldades, uma vez que a hidrólise enzimática aplicada à conversão da celulose em monossacarídeos é uma etapa crucial na produção do etanol de segunda geração (CORRÊA et al., 2014). Há um interesse geral na obtenção de enzimas hidrolíticas específicas e estáveis, capazes de degradar eficientemente a fibra vegetal.

Com o intuito de viabilizar o pré-tratamento enzimático, o estudo dos micro-organismos naturalmente adaptados ao uso da celulose, como os fungos associados às formigas cortadeiras, mostra-se promissor para a obtenção de linhagens com potencial para degradar polímeros vegetais (MENDES et al., 2012), possibilitando a produção em escala industrial do etanol de segunda geração.

No presente trabalho foram prospectadas leveduras pertencentes aos gêneros *Meyerozyma* e *Aureobasidium* depositadas na Central de Recursos Microbianos da UNESP, Rio Claro. De acordo com Mendes et al. (2012), já foi constatada a produção de enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases por *Meyerozyma guilliermondii*, bem como de celulasas por linhagens de *Meyerozyma caribbica* e de *Aureobasidium* isolados de ninhos das formigas cortadeiras *Atta texana* e *Acromyrmex*. Além disso, segundo Leathers, (2003) o gênero *Aureobasidium* apresenta-se como uma fonte promissora de enzimas xilanolíticas.

Ainda, segundo Kurtzman et al. (2011), o gênero *Meyerozyma* é capaz de fermentar açúcares como glicose, sacarose e rafinose, sendo esta característica também explorada no presente trabalho. Além disso, foi averiguada a produção de etanol a partir de determinadas pentoses.

2 OBJETIVO

Ampliar o conhecimento da diversidade funcional e capacidade metabólica de micro-organismos pertencentes ao gênero *Meyerozyma* e *Aureobasidium*, os quais

compõem o jardim de fungos das formigas cortadeiras, objetivando a obtenção de linhagens com potencial para a produção de biocombustível.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos utilizados

Os micro-organismos são provenientes da Central de Recursos Microbianos da UNESP (<http://www.rc.unesp.br/estirpes/php>) e foram previamente selecionados como produtores de polissacaridases vegetais (MELO et al., 2012; ARCURI et al., 2012).

3.2 Meio para indução de enzimas lignocelulolíticas e condições de cultivo das leveduras

Os resíduos agroindustriais *in natura*, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz e casca de café, foram previamente lavados, secos a temperatura ambiente e triturados por cisalhamento em peneira de 0,4 mm. (CHANDEL et al., 2013).

As leveduras (48 linhagens; 40 *Meyerozyma* e oito *Aureobasidium*) foram inicialmente semeadas em meio YNB 0,67%, e então foi preparada uma suspensão celular de 10^6 células. mL⁻¹ (adaptado de SANHUEZA et al., 2007). As células foram semeadas em 2,5 g do resíduo lignocelulósico com adição de 25 mL de meio mínimo mineral adaptado de Hou-Rui et al. (2009). As 48 linhagens foram inicialmente semeadas em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar; posteriormente, apenas as linhagens que apresentaram melhor desempenho, aumentando a concentração de açúcares redutores ou a concentração de sólidos solúveis totais (grau BRIX) foram testadas nos demais resíduos.

A incubação foi realizada de maneira estática, no escuro, a 25 °C, por 96 horas. Após este período, obteve-se o extrato enzimático (adaptado de RODRIGUES, 2009). Os ensaios foram realizados em quintuplicata tendo meio mineral mais resíduo lignocelulósico sem inóculo como controle.

3.3 Determinação do crescimento e viabilidade celular

O controle da viabilidade celular foi realizado por contagem das células em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de metileno (ANTONINI, 2004).

3.4 Análise de açúcares redutores

Os açúcares redutores (AR) foram quantificados para determinar a quantidade de açúcar liberado na degradação de polímeros complexos como celulose, xilana, pectina e amido. A quantificação foi realizada utilizando-se o reagente ácido 3,5-dinitro-salicílico (MILLER, 1959). Em tubos de ensaio foram colocados 0,1 mL das amostras e 0,1 mL de DNS. A solução foi colocada em banho fervente por 10 minutos e ao término foi adicionado 1,0 mL de água destilada gelada. A leitura da absorbância foi efetuada em espectrofotômetro BEL – SP 1105 (SF 325NM) a 575 nm. A quantificação foi obtida através de uma curva de calibração, construída com intervalos de 0,0 – 5,0 mg/mL (com incremento de 0,625) de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1,0 g/L de glicose.

3.5 Determinação das atividades enzimáticas

Foi realizada a atividade das seguintes enzimas: endoglucanase (CMCase), endoglucanase (CMase), xilanase, pectinase, endoamilase e exoamilase, conduzida de acordo com a metodologia adaptada de Ghose, (1987). Para todas as enzimas os resultados obtidos através dos ensaios enzimáticos foram realizados em cinco réplicas das quais foi obtida uma média e o desvio padrão (DP).

3.5.1 Endoglucanase (CMCase) e endoglucanase (CMase)

A determinação quantitativa da atividade de endoglucanase (CMCase e CMase) foi determinada a partir da reação de 20 µL do extrato enzimático e 80 µL da solução do substrato carboximetilcelulose (CMCase) e celulose microcristalina (CMase), ambos em solução 0,625 % (m/v) de tampão citrato, pH 6. A reação foi incubada a 25 °C, no escuro, durante 60 minutos e interrompida com a adição de 100 µL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) (MILLER, 1959). Após 10

minutos em banho fervente, foi adicionado 1,0 mL de água destilada gelada; em seguida as amostras foram homogeneizadas e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro BEL – SP 1105 (SF 325NM) a 575 nm. Como branco da reação utilizou-se uma amostra contendo 20 µL do extrato enzimático e 80 µL da solução do substrato em tempo reacional zero. A unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose por minuto de reação e por mL de extrato bruto, sob as condições de ensaio citadas. O cálculo da atividade enzimática foi realizado através de uma curva de calibração, construída com intervalos de 0,0 – 5,0 micromol/mL (com incremento de 0,625) de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1,0 g/L de glicose.

3.5.2 *Xilanase*

Para a determinação da atividade de xilanase, foram adicionados 20 µL do extrato enzimático a 80 µL de solução de xilana (2,0 mg/mL de xilana diluída em tampão fosfato 0,1M; pH 6,0). A reação foi mantida a 25 °C, no escuro, durante 120 minutos e interrompida com a adição de 100 µL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Após 10 minutos em banho fervente, foi adicionado 1,0 mL de água destilada gelada; em seguida as amostras foram homogeneizadas e a leitura da absorbância efetuada em espectrofotômetro BEL – SP 1105 (SF 325NM) a 575 nm. O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro corresponde às mesmas quantidades do extrato enzimático e da solução do substrato, mas em tempo reacional zero. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de xilose por minuto de reação e por mL de extrato bruto. O cálculo da atividade enzimática foi realizado através de uma curva de calibração, construída com intervalos de 0,0 – 5,0 micromol/mL (com incremento de 0,625) de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1,0 g/L de xilose.

3.5.3 *Pectinase*

A atividade de pectinase foi determinada de acordo com o procedimento descrito para a atividade da endoglucanase (*item 3.5.1.*). No entanto, para a dosagem dessa enzima foi utilizado como substrato o ácido poligalacturônico

(Sigma, P-3889) (2,0 mg/mL de substrato em 0,2 mol L⁻¹ de solução tampão acetato; pH 5,0). A curva analítica utilizada foi de ácido galacturônico. Uma unidade dessa enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de ácido D-galacturônico por minuto de reação e por mL de extrato bruto.

3.5.4 Amiolítica (*endoamilase e exoamilase*)

A atividade de amilase foi determinada utilizando com substrato uma solução de amido (0,5% para endoamilase e 1,0% para exoamilase) diluída em tampão acetato, pH 5,0. A mistura contendo 80 µL de solução de amido e 20 µL do extrato enzimático foi mantida a 25 °C, no escuro, durante 30 minutos e interrompida com a adição de 100 µL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) (MILLER, 1959). Após 10 minutos em banho fervente, adicionou-se 1,0 mL de água destilada gelada, seguindo homogeneização das amostras. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro BEL – SP 1105 (SF 325NM) a 575 nm, sendo o branco utilizado para zerar o espectrofotômetro composto por 80 µL de solução de amido e 20 µL do extrato enzimático em tempo reacional zero. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose por minuto de reação e por mL de extrato bruto. O cálculo da atividade enzimática foi realizado através de uma curva de calibração, construída com intervalos de 0,0 – 5,0 micromol/mL (com incremento de 0,625) de açúcar redutor a partir de uma solução padrão de 1,0 g/L de glicose.

3.6 Concentração de sólidos solúveis totais (Grau BRIX)

Para averiguar a porcentagem de sólidos solúveis totais liberados após a inoculação das linhagens foi utilizado refratômetro manual portátil (BBL-614).

3.7 Hidrólise ácida e enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em reator de hidrólise de 40L, sendo o bagaço percolado com H₂SO₄ em uma razão de 100 mg de H₂SO₄/g de matéria seca durante 20 minutos. Após este procedimento, o

hidrolisado foi concentrado em concentrador a vácuo. A celulignina remanescente foi lavada e seca ao sol.

Na hidrólise enzimática foram utilizados 2,5g do resíduo remanescente da hidrólise ácida, em adição a 25 mL de meio mínimo mineral e uma suspensão celular contendo 10^6 células como descrito no *item* 3.2. Foram testadas seis linhagens, duas pertencentes ao gênero *Meyerozyma* (TO 687 e TO 389) e quatro ao gênero *Aureobasidium* (TO 021, TO 290, TO 995 e LB 34.1), as quais aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a concentração de açúcares redutores nos resíduos *in natura*. A quantificação dos açúcares redutores e a determinação das atividades enzimáticas foram realizadas de acordo com os *itens* 3.4 e 3.5, respectivamente.

3.8 Análise estatística dos dados

A análise dos dados foi conduzida utilizando o *software* PAST v. 2.17c. A normalidade e a variância dos dados foram analisadas com objetivo de escolher o teste mais adequado, sendo o teste de Kruskal-Wallis (= 5%) utilizado em todas as análises. Trata-se de uma análise de variância não-paramétrica, não assumindo distribuição normal, mas assumindo distribuição em forma igual para todos os grupos. Os dados foram avaliados separadamente, mas sempre entre dois grupos distintos, um sendo o controle (sem inóculo) e o outro sendo uma das amostras.

3.9 Teste de assimilação de pentoses

A capacidade assimilatória do gênero *Meyerozyma* foi testada em meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) contendo 0,5% (p/v) do açúcar a ser testado (D-xilose e L-arabinose), tendo como controle positivo meio contendo 0,5% de glicose. A incubação foi realizada por 21 dias a 25°C.

3.10 Teste de fermentação em meio líquido

A capacidade fermentativa das linhagens pertencentes ao gênero *Meyerozyma* foi averiguada em meio líquido contendo 4% de glicose e xilose, utilizando tubos de Durhan (KURTZMAN; FELL, 1998) para observar a produção de

gás. Os tubos foram incubados por até 14 dias à 25° C. O meio de cultivo é composto por 5,0 g/L de extrato de levedura, 7,5 g/L de peptona e 40 g/L do açúcar em teste em 1000 mL. O teste foi realizado em triplicata.

3.11 Teste de produção de etanol

3.11.1 Teste qualitativo em placa

Para verificar qualitativamente a capacidade de produzir de etanol, as leveduras do gênero *Meyerozyma* foram previamente cultivadas em meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) líquido contendo 0,1% de glicose, durante três dias a 25° C, com a finalidade de diminuir as reservas nutricionais. Após este período, as linhagens foram semeadas na superfície do meio YNB sólido contendo 2% do açúcar a ser testado (D-xilose ou L-arabinose). Este meio foi adicionado na placa pelo método “pour plate” contendo a levedura *Candida silvae* (BR3-3BY), a qual é incapaz de crescer utilizando esses açúcares, mas é capaz de crescer utilizando etanol, como fonte de carbono, caso este venha a ser produzido pelas linhagens em teste.

O período de incubação foi de 21 dias a 25° C. Como controle positivo foi utilizado a linhagem *Candida shehateae* var. *insectosa* (CG8-8BY) e como controle negativo um isolado de *Candida chickasaworum* (DC4M). O teste foi realizado em duplicata.

3.11.2 Fermentação alcoólica para análises quantitativas

As linhagens que obtiveram resultado positivo no teste qualitativo de produção de etanol em placa (*item 3.11.1*) foram pré-cultivadas em meio YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*), a 30°C e agitação de 150 rpm, por 48 horas. Após este período, as alíquotas foram centrifugadas a 10000x g por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de células foi inoculado para uma concentração celular de 10^6 células.mL⁻¹ em meio nutriente basal composto por KH₂PO₄ (2,0 g/L), (NH₄)₂SO₄ (2,0 g/L), MgSO₄ · 7H₂O (1,0 g/L), uréia (0,3 g/L), CaCl₂ (0,3 g/L), solução de sais (1,0 g/L), extrato de levedura (10 g/L) e xilose (60 g/L) com pH inicial 4.

Foram utilizados Erlenmeyers de 125 mL fechados com válvula própria para fermentação, a válvula foi preenchida com solução de metabissulfito de sódio a 1,0 mg/mL. A fermentação foi realizada durante 96 horas sob agitação de 100 rpm e a cada amostragem de 24 horas um Erlenmeyer foi retirado para análise do consumo de açúcar e produção de etanol.

3.11.3 Quantificação de etanol

A quantificação do etanol produzido foi realizada por cromatografia em fase gasosa com injeção por head-space utilizando-se 6,0 mL do fermentado acondicionado em tubos de penicilina com septo de borracha, lacrados e mantidos a 40°C por 10 minutos. Com uma seringa do tipo gas-tight de 500 µL foram coletados 200 µL da fase vapor e injetados no cromatógrafo. O cromatógrafo gasoso (Perkin Elmer - Clarus 480) foi equipado com uma coluna Carbowax 20M (30m, 0.32mm, 0.25µm). O gás de arraste foi o nitrogênio com fluxo de 30 mL/min. As temperaturas dos blocos de injeção e detecção foram de 200°C. A quantificação foi realizada com curva de calibração construída a partir de análises de soluções etanol/água em diferentes proporções (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0% de etanol).

3.11.4 Quantificação de açúcares

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada utilizando o reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico), como proposto por Miller (1959). Em um tubo de ensaio, foram misturados 1,0 mL da amostra e 1,0 mL de DNS. A mistura foi levada a banho em ebulição por 10 minutos e, em seguida, a banho de gelo. A esta mistura foram adicionados 8,0 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi feita a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em mg de açúcar redutor/ mL pelas curvas padrão do açúcar utilizado.

Obs: os ensaios referentes aos *itens* 3.11.2, 3.11.3 e 3.11.4 foram realizados no lab. da prof. Dra. Eleni Gomes do IBILCE, câmpus de S.J. do Rio Preto.

4 RESULTADOS

4.1 Gênero *Aureobasidium*

4.1.1 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar

A produção de açúcares redutores pela linhagem de *Aureobasidium leucospermi* - LB 34.1, foi 66% maior em relação ao controle, sem, no entanto, alterar o grau BRIX. Com relação à atividade enzimática, a linhagem LB 34.1 apresentou atividade de todas as enzimas hidrolíticas testadas, destacando-se a atividade de pectinase ($0,26 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,07$) e exoamilase ($0,24 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,05$). Além disso, a concentração celular passou de 1.10^6 células. mL^{-1} para $4,5. 10^7$ células. mL^{-1} .

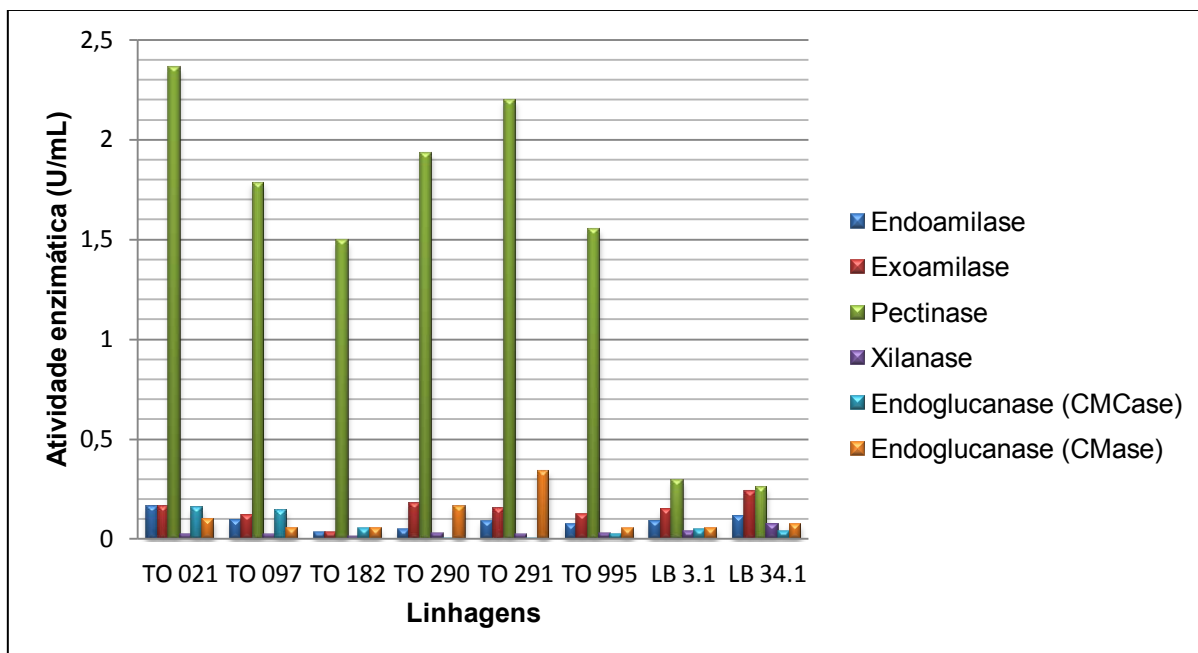
A linhagem LB 3.1 não diferiu estatisticamente do controle em relação às concentrações de açúcar redutor e sólidos solúveis totais, apesar de produzir todas as enzimas em teste, com os maiores valores em Unidades de enzima. mL^{-1} para a pectinase ($0,29 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,08$) e a exoamilase ($0,15 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,05$). Isto sugere que a linhagem conseguiu degradar o resíduo pelo menos para sua nutrição, pois passou de 1.10^6 células. mL^{-1} para $1,9. 10^7$ células. mL^{-1} após incubação de 96 horas).

Ainda, as linhagens TO 021, 097, 182, 290, 291 e 995 aumentaram o grau BRIX, sugerindo que pode ter ocorrido a degradação parcial do substrato lignocelulósico com provável liberação de monossacarídeos, os quais foram assimilados e utilizados para o crescimento celular. A linhagem que apresentou melhor crescimento foi a TO 290, que passou de 1.10^6 células. mL^{-1} para $6,7. 10^7$ células. mL^{-1} após incubação de 96 horas).

A atividade enzimática com maior valor em Unidades de enzima. mL^{-1} para as oito linhagens de *Aureobasidium* foi a pectinolítica, com valor máximo de $2,36 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,24$ (TO 021). Por outro lado, a atividade xilanolítica foi a menos relevante, com valor máximo de $0,07 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,01$ (LB 34.1). Com relação às outras enzimas, houve destaque para linhagem TO 290 com $0,18 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,03$ de exoamilase e também em relação à endoglucanase (CMase) com $0,16 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,03$; e TO 021 com $0,15 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,03$ de endoglucanase (CMCase). Na figura 1 é possível

observar a atividade enzimática obtida para cada linhagem em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 1: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Aureobasidium* em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: Elaborado pelo autor

Com base nestes dados notamos que, com exceção do isolado de *Aureobasidium leucospermi* LB 3.1, todos os outros isolados de *Aureobasidium leucospermi* (TO 021, 097, 290, 291 e LB 34.1), de *Aureobasidium pullulans* (TO 995) e de *Aureobasidium* sp. (TO 182) apresentaram resultados satisfatórios e por isso foram testados nos demais resíduos agroindustriais.

4.1.2 Meio suplementado com sabugo de milho triturado

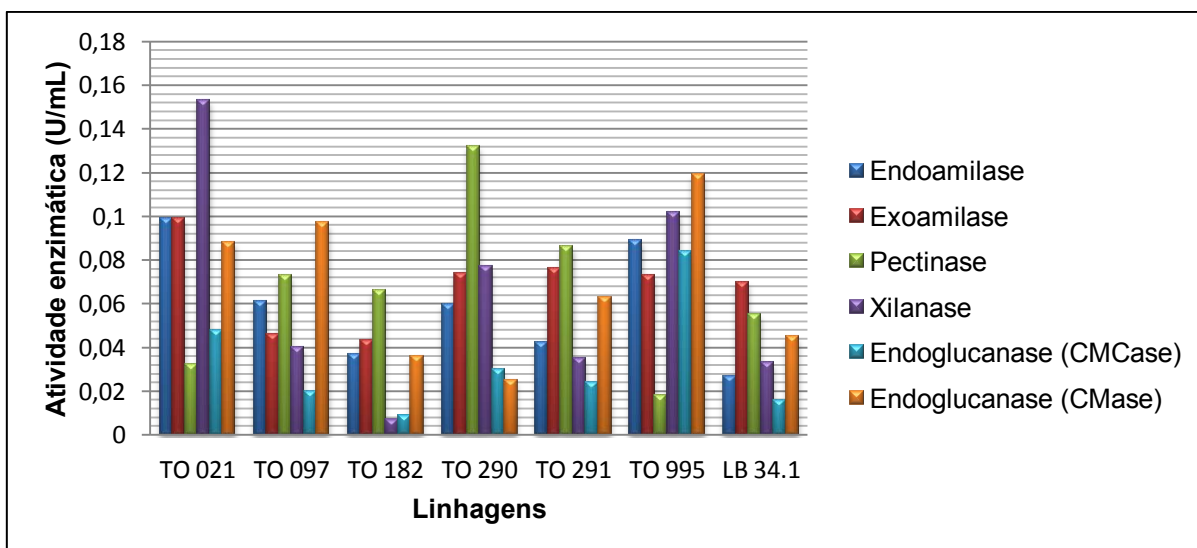
Em meio suplementado com sabugo de milho triturado, três linhagens (TO 290, TO 995 e TO 021) aumentaram significativamente a concentração de açúcares redutores. O maior aumento na concentração de monossacarídeos, 0,354 g/L, foi alcançado pela linhagem TO 021, seguida da TO 290 com aumento de 0,334 g/L e da TO 995, com aumento de 0,231 g/L. Ainda, tais linhagens se multiplicaram nesse substrato, passando de 1.10^6 células. mL⁻¹ para $1,4. 10^7$ células. mL⁻¹, 1.10^7 células. mL⁻¹ e $1,5. 10^7$ células. mL⁻¹, respectivamente.

Os maiores valores em Unidades de enzima. mL^{-1} para a linhagem TO 290 ocorreram na atividade pectinolítica com $0,13 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,06$, seguida da atividade xilanolítica $0,08 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,01$. Em relação à linhagem TO 021, a atividade enzimática com maior valor foi a xilanolítica com $0,15 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,04$, seguida das atividades de endoamilase e exoamilase, ambas com $0,10 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,02$. A linhagem TO 995 apresentou maior produção enzimática de endoglucanase (CMase) com $0,12 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,04$, seguida da atividade xilanolítica com $0,10 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,01$ e de endoamilase com $0,09 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,005$.

As demais linhagens (TO 097, TO 182, TO 291 e LB 34.1) não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do controle sem inóculo, sugerindo que elas conseguiram degradar o resíduo pelo menos para sua nutrição. Esta hipótese é suportada pelo grande crescimento celular observado após a inoculação, com valor máximo de $2,3 \cdot 10^7$ células. mL^{-1} (TO 097) e mínimo de $1 \cdot 10^7$ células. mL^{-1} (TO 291). Assim, como em relação aos açúcares redutores, nenhuma das linhagens aumentou a concentração de sólidos solúveis totais.

De maneira geral, a produção das seis enzimas hidrolíticas (endoamilase, exoamilase, pectinase, xilanase, endoglucanase (CMCase) e endoglucanase (CMase)) foi constatada em 100% das linhagens. Na figura 2 é possível observar a produção de enzimas por cada linhagem em meio suplementado com sabugo de milho.

Figura 2: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Aureobasidium* em meio suplementado com sabugo de milho triturado.

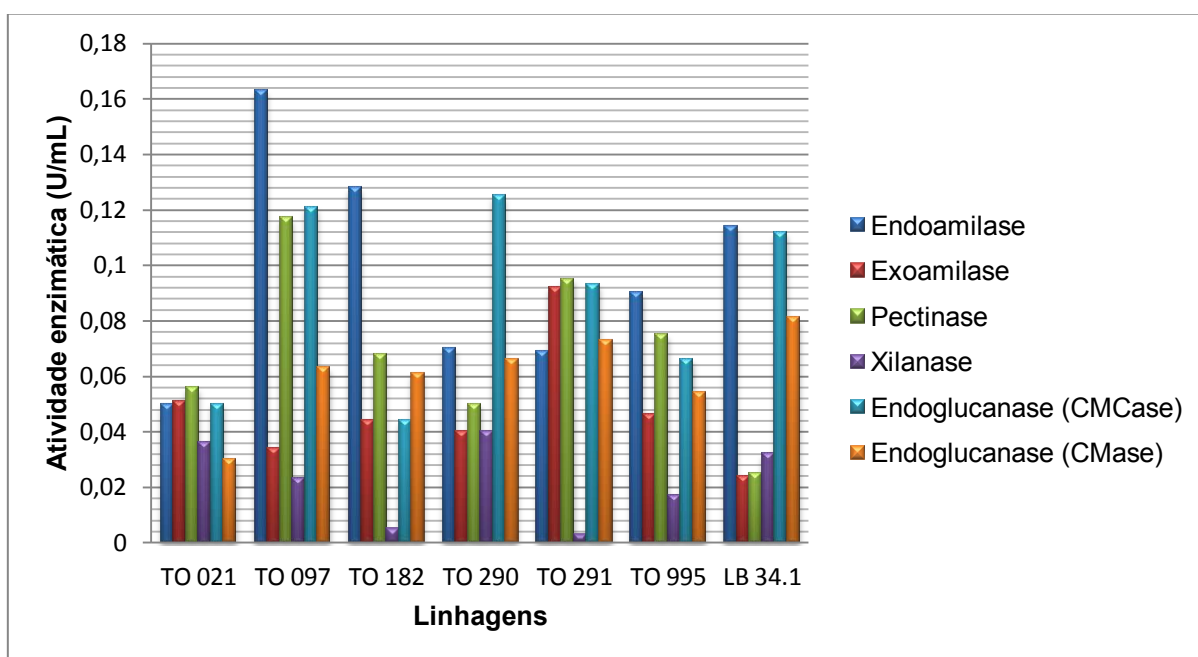


Fonte: Elaborado pelo autor

4.1.3 Meio suplementado com casca de arroz

Com relação ao meio suplementado com casca de arroz, apenas a linhagem TO 021 aumentou significativamente ($p < 0,05$) a concentração de monossacarídeos. No entanto, os outros seis isolados não diferiram estatisticamente do controle e o mesmo ocorreu com relação ao grau BRIX. Desta maneira, os isolados conseguiram degradar o resíduo lignocelulósico obtendo monossacarídeos apenas para sua nutrição. Na figura 3 é possível observar a atividade enzimática obtida para cada linhagem em meio suplementado com palha de arroz, atentando para a maior atividade da enzima endoamilase.

Figura 3: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Aureobasidium* em meio suplementado com casca de arroz.



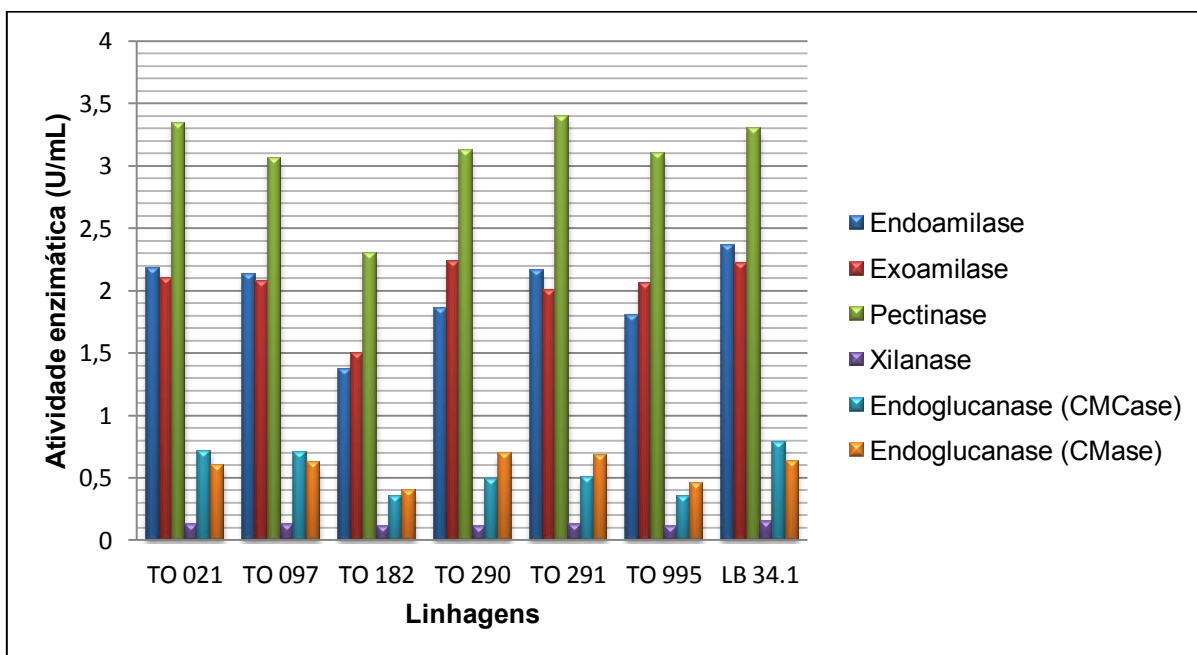
Fonte: Elaborado pelo autor

4.1.4 Meio suplementado com casca de café

Nenhuma das linhagens pertencentes ao gênero *Aureobasidium* alterou significativamente ($p < 0,05$) a concentração de monossacarídeos ou o grau BRIX. Entretanto, foi constatada uma grande produção de enzimas hidrolíticas, sendo os maiores valores de produção novamente observados na atividade pectinolítica com $3,40 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,14$ (TO 291), seguida pela endoamilase com $2,36 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,21$

(LB 34.1), exoamilase com $2,24 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,10$ (TO 290), endoglucanase (CMCase) com $0,780 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,08$ (LB 34.1), endoglucanase (CMase) com $0,70 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,03$ (TO 290) e xilanase com $0,15 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,02$ (LB 34.1). Na figura 4 é possível observar a atividade enzimática obtida para cada linhagem em meio suplementado com casca de café.

Figura 4: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Aureobasidium* em meio suplementado com casca de café



Fonte: Elaborado pelo autor

Considerando os elevados valores de atividade enzimática obtidos na casca de café, era esperado que a presença de açúcares redutores também fosse detectada em concentrações relativamente elevadas. No entanto, a explicação mais plausível para a ausência de açúcares redutores no substrato após a incubação é de que as leveduras tenham metabolizado os açúcares a uma taxa elevada, logo que eles foram liberados. Essa hipótese é suportada pela elevada concentração celular observada, sendo que o maior valor encontrado passou de 1.10^6 células.mL⁻¹ para 4.10^7 células.mL⁻¹ (TO 021), e o menor para 2.10^7 células.mL⁻¹ (TO 182).

Além disso, ao final do período de incubação foi observado um espesso biofilme, apresentado na Figura 5.

Figura 5. Meio de cultivo suplementado com casca de café (A); Meio de cultivo inoculado com linhagens do gênero *Aureobasidium*, após o período de incubação (B); Detalhe do biofilme formado após a incubação(C).

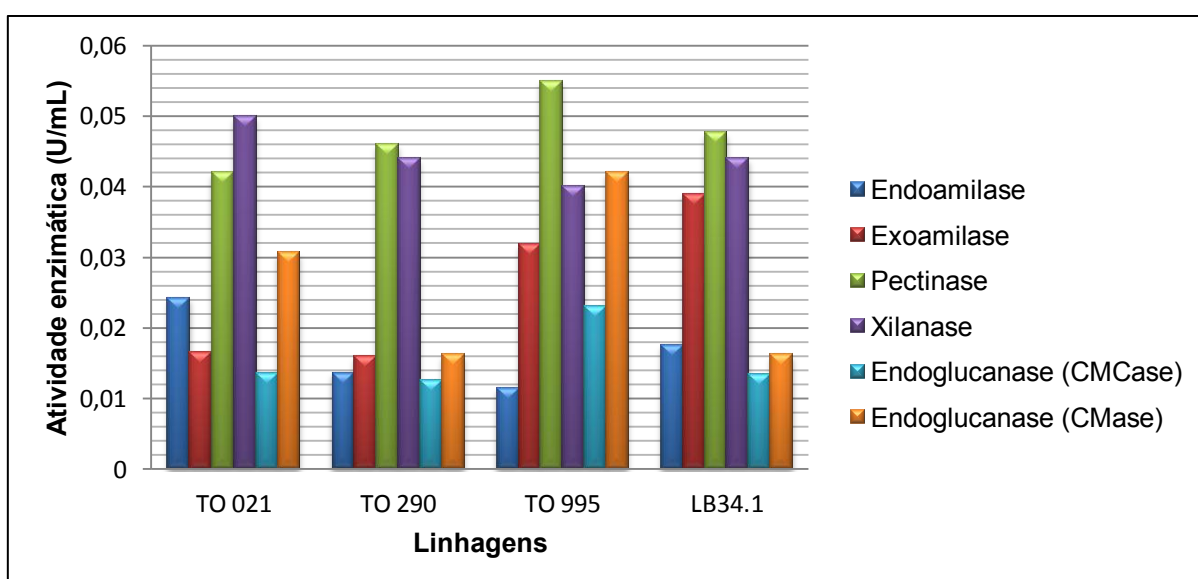


Fonte: Dados da pesquisa

4.1.5 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado

Assim como ocorreu em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (item 4.1.1), apenas a linhagem LB 34.1 aumentou significativamente ($p < 0,05$) a concentração de açúcares redutores. Após o período de incubação foi verificado um aumento de 0,08 g/L de açúcar redutor no meio de cultivo. Os demais isolados não diferiram estatisticamente do controle. Na figura 6 é possível observar os valores enzimáticos obtidos para as quatro linhagens testadas.

Figura 6: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Aureobasidium* em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Gênero *Meyerozyma*

4.2.1 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar

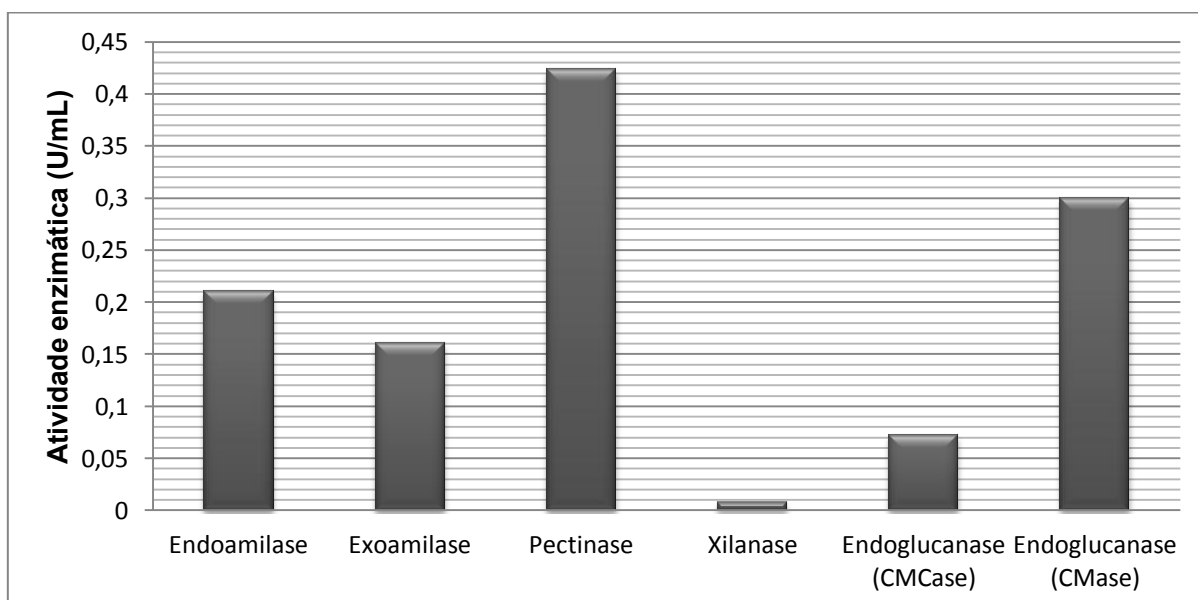
Nenhuma das 40 linhagens pertencentes a este gênero aumentou significativamente ($p < 0,05$) a concentração de açúcares redutores no meio de cultivo. Ainda, 97% das linhagens apenas consumiram os eventuais monossacarídeos resultantes da preparação (esterilização), o que nos permite concluir que essas linhagens não conseguiram liberar monossacarídeos a partir do substrato lignocelulósico. Ao observar os valores de crescimento após o período de incubação, ainda é possível inferir que uma vez consumido os açúcares residuais disponíveis ou mesmo suas próprias reservas endógenas, 32% das linhagens (13 isolados) perderam a viabilidade. Apenas o isolado TO 547, identificada como *Meyerozyma caribbica*, não diferiu estatisticamente do controle, indicando que a mesma conseguiu liberar açúcares redutores, mesmo que em quantidade suficiente apenas para sua própria sobrevivência e não para a produção de etanol ou outro metabólito de interesse.

Com relação ao grau BRIX, duas linhagens, TO 687 e TO 389, ambas da espécie *Meyerozyma caribbica*, aumentaram a concentração de sólidos solúveis totais, embora sem alteração da concentração dos açúcares redutores, sugerindo que podem ter atacado o substrato lignocelulósico e utilizado os produtos gerados. Esta hipótese é suportada pela elevada concentração celular observada, tendo passado de $1 \cdot 10^6$ células. mL^{-1} para $3,7 \cdot 10^7$ células. mL^{-1} e $1,9 \cdot 10^7$ células. mL^{-1} , respectivamente. Ainda com base na capacidade de fermentar pentoses do gênero *Meyerozyma* (KURTZMAN; FELL, 1998), pode ser que os monossacarídeos liberados tenham sido fermentados e possivelmente convertidos em etanol, explicando o resultado negativo na dosagem dos açúcares redutores.

A linhagem TO 687 apresentou maiores valores em Unidades de enzima. mL^{-1} para a atividade de endoamilase ($0,09 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,04$), seguida de exoamilase ($0,14 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,03$) e de endoglucanase (CMase) ($0,08 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,01$). Já a linhagem TO 389 exibiu valores mais relevantes para a atividade de endoamilase ($0,07 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,02$), pectinase ($0,14 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,04$) e endoglucanase (CMase) ($0,06 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,006$).

A atividade enzimática foi detectada em todas as 40 linhagens testadas; a atividade de endoglucanase (CMase) foi encontrada em 100% dos isolados; endoamilase, exoamilase, pectinase e endoglucanase (CMCase) em 95%; e xilanase em apenas 5% das amostras. Os maiores valores em Unidades de enzima. mL⁻¹ encontrados para o gênero *Meyerozyma* ocorreram na degradação pela pectinase, com atividade máxima de 1,09 U. mL⁻¹ ± 0,08 (TO 211), seguido da atividade de endoglucanase (CMase) com atividade máxima de 0,36 U.mL⁻¹ ± 0,02 (TO 805 e TO 809). Tais resultados em relação à produção de pectinase e celulase já eram esperados de acordo com Mendes et al. (2012). Na Figura 7 é possível observar os valores médios de produção de enzimas pelo gênero *Meyerozyma*.

Figura 7: Valores enzimáticos médios obtidos por linhagens do gênero *Meyerozyma*



Fonte: Elaborado pelo autor

Com base nestes dados, é possível inferir que duas linhagens pertencentes à espécie *Meyerozyma caribbica*, TO 687 e TO 389, podem ser úteis na degradação de resíduos da agroindústria. Dessa forma, estas linhagens foram testadas nos demais resíduos, tais como o sabugo de milho, a palha de arroz e a casca de café.

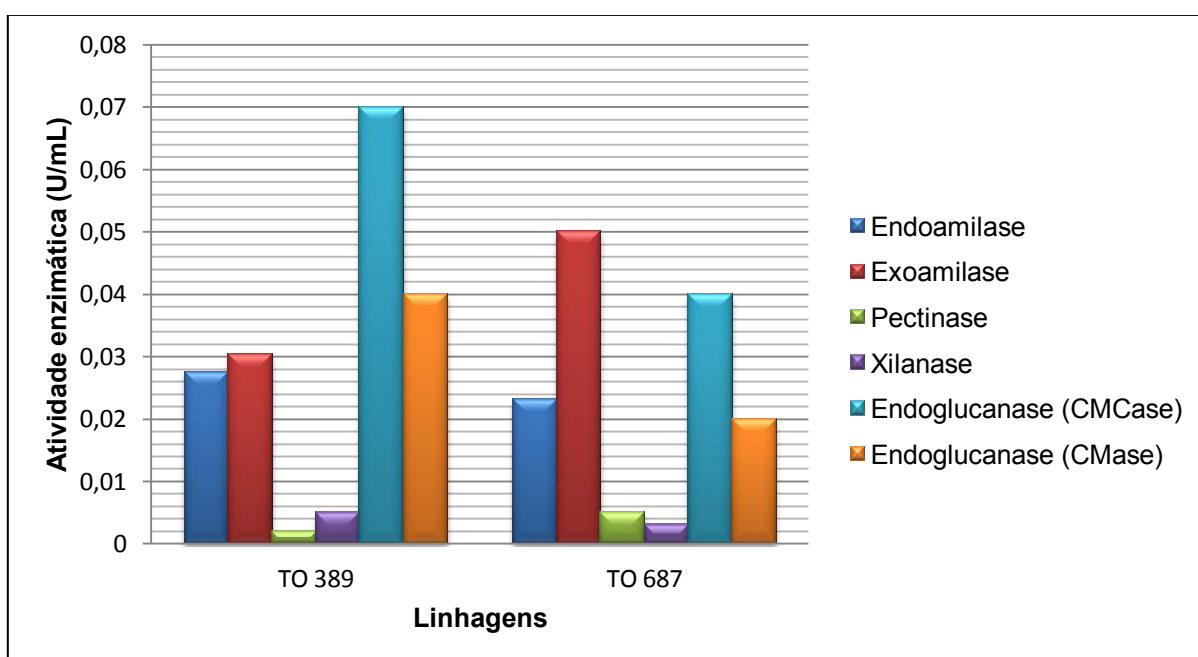
4.2.2 Meio suplementado com sabugo de milho

Com relação à concentração de açúcares redutores, nenhuma das linhagens (TO 687 e TO 389) diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do controle (resíduo sem

inóculo), e o mesmo ocorreu com relação ao grau BRIX. Isto sugere que os isolados conseguiram liberar monossacarídeos em quantidade suficiente apenas para sua própria nutrição, hipótese suportada pelo aumento observado na concentração celular, passando de 1.10^6 células. mL^{-1} para 2.10^7 células. mL^{-1} (TO 687) e 4.10^7 células. mL^{-1} (TO 389) após o período de incubação.

A atividade enzimática com maior valor em Unidades de enzima. mL^{-1} foi a atividade de endoglucanase (CMCase), com valor máximo de $0,07 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,01$ (TO 389), seguida pela atividade de exoamilase com $0,05 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,02$ (TO 687), sendo os valores de atividade xilanólítica, pectinolítica e de endoglucanase (CMase) pouco relevantes. Na figura 8 é possível observar a atividade enzimática de cada linhagem em meio suplementado com sabugo de milho.

Figura 8: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Meyerozyma* em meio suplementado com sabugo de milho triturado



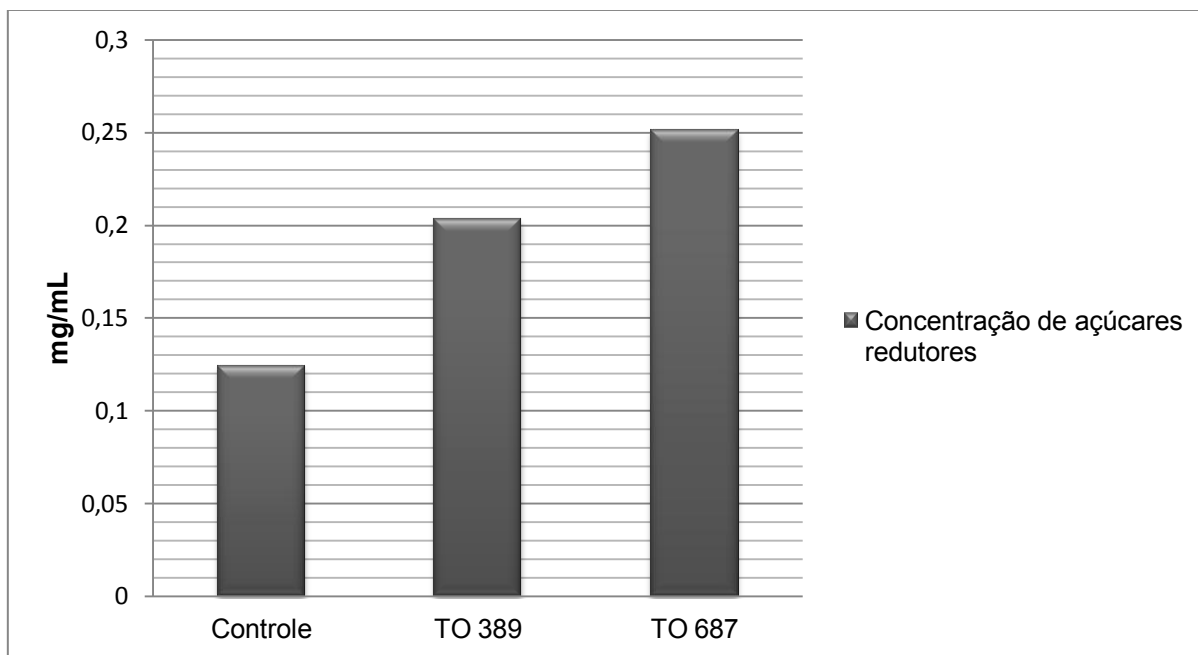
Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.3 Meio suplementado com casca de arroz

Em meio suplementado com palha de arroz ambas as linhagens, TO 687 e TO 389, aumentaram significativamente ($p < 0,005$) a concentração de açúcares redutores. A linhagem TO 389 aumentou a concentração em $0,078 \text{ mg/mL}$ em relação ao controle. Já linhagem TO 687, dobrou a concentração de açúcares

disponíveis no meio de cultivo. Na figura 9 é possível observar a concentração de monossacarídeos liberados pelas linhagens em relação ao controle sem inóculo.

Figura 9: Concentração de açúcares redutores em meio suplementado com casca de arroz



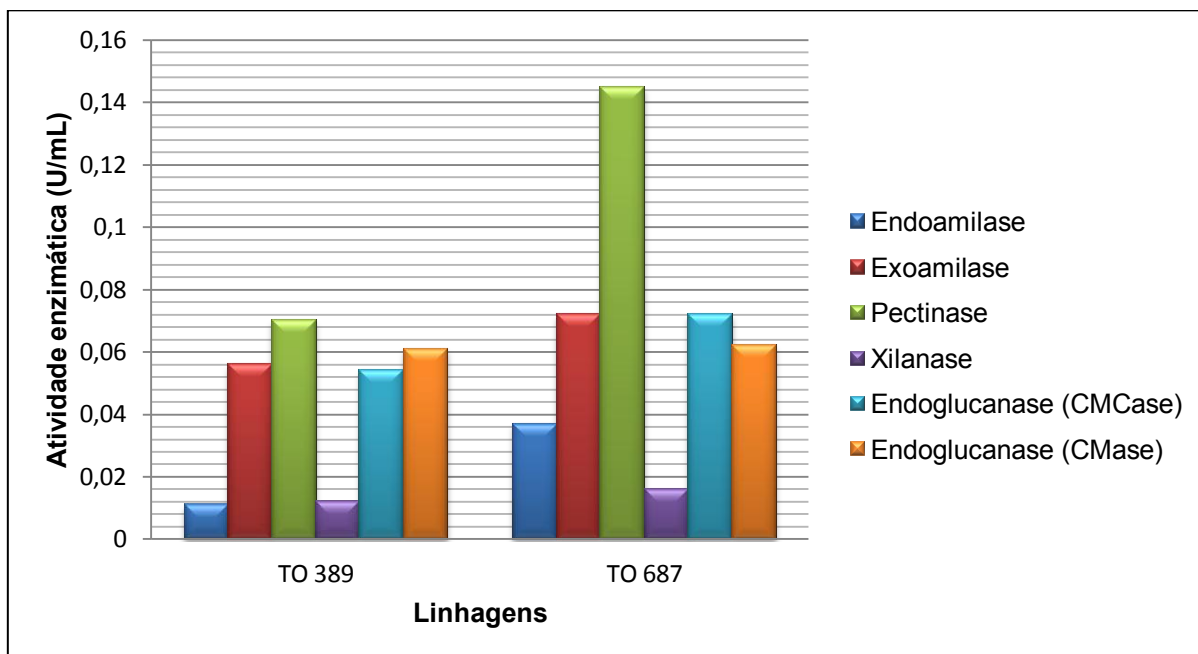
Fonte: Elaborado pelo autor

Com relação à concentração de sólidos solúveis totais (grau BRIX), a mesma não foi alterada significativamente ($p < 0,05$) por nenhuma das linhagens. Ainda, houve crescimento nesta condição, pois ao final do período de incubação, a concentração celular passou de $1 \cdot 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ para $1,5 \cdot 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ (TO 687) e $3 \cdot 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ (TO 389).

A linhagem TO 687 produziu todas as enzimas, sendo o maior valor de $0,14 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0,05$ verificado com a pectinase, seguido da exoamilase e da endoglucanase (CMCase), ambas com $0,07 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0,02$.

Assim como a linhagem TO 687, a TO 389 também produziu todas as enzimas hidrolíticas, sendo que o maior de enzima foi para a pectinase ($0,07 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0,03$). Os menores valores referem-se às enzimas endoamilase e xilanase, ambas com aproximadamente $0,01 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0,004$. Na figura 10 é possível observar a produção das enzimas pelas leveduras em meio suplementado com palha de arroz.

Figura 10: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Meyerozyma* em meio suplementado com casca de arroz



Fonte: Elaborado pelo autor

Desta maneira, é possível inferir que os valores em Unidades de enzima. mL⁻¹ apresentados em meio suplementado com palha de arroz, não foram muito relevantes; no entanto, a combinação das diversas enzimas foi capaz de degradar o resíduo lignocelulósico liberando monossacarídeos em quantidades significativas.

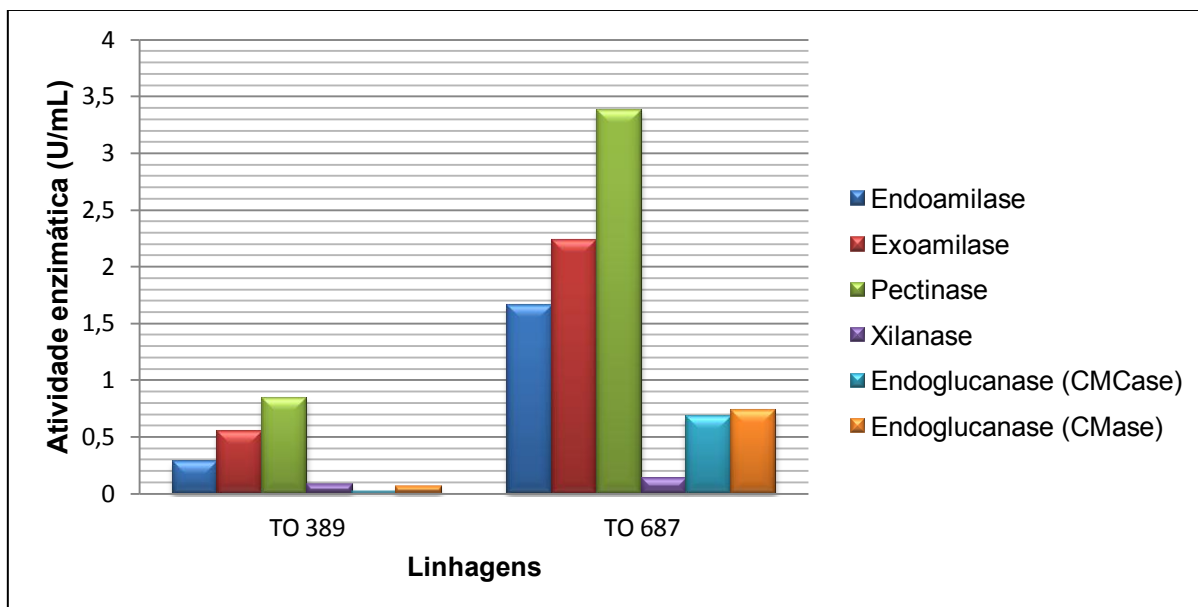
4.2.4 Meio suplementado com casca de café

Assim como o gênero *Aureobasidium*, em meio suplementado com casca de café, nenhuma das linhagens pertencentes ao gênero *Meyerozyma* alterou significativamente ($p < 0,05$) a concentração de monossacarídeos ou o grau BRIX. Sendo assim, estes isolados podem ter atacado o resíduo lignocelulósico e utilizado os produtos gerados para a produção de biomassa celular. Também, como já verificado em relação ao gênero *Aureobasidium*, as duas linhagens de *Meyerozyma caribbica* apresentaram grande produção de enzimas hidrolíticas.

Ambas as linhagens apresentaram maiores valores em Unidades de enzima. mL⁻¹ para a enzima pectinase com $3,40 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,28$ (TO 687) e $0,84 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,06$ (TO 389), seguida pela enzima exoamilase $2,23 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,13$ (TO 687) e $0,53 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,06$ (TO 389).

$\text{mL}^{-1} \pm 0,14$ (TO 389). Na figura 11 é possível observar a atividade enzimática obtida para cada linhagem em meio suplementado com casca de café.

Figura 11: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Meyerozyma* em meio suplementado com casca de café



Fonte: Elaborado pelo autor

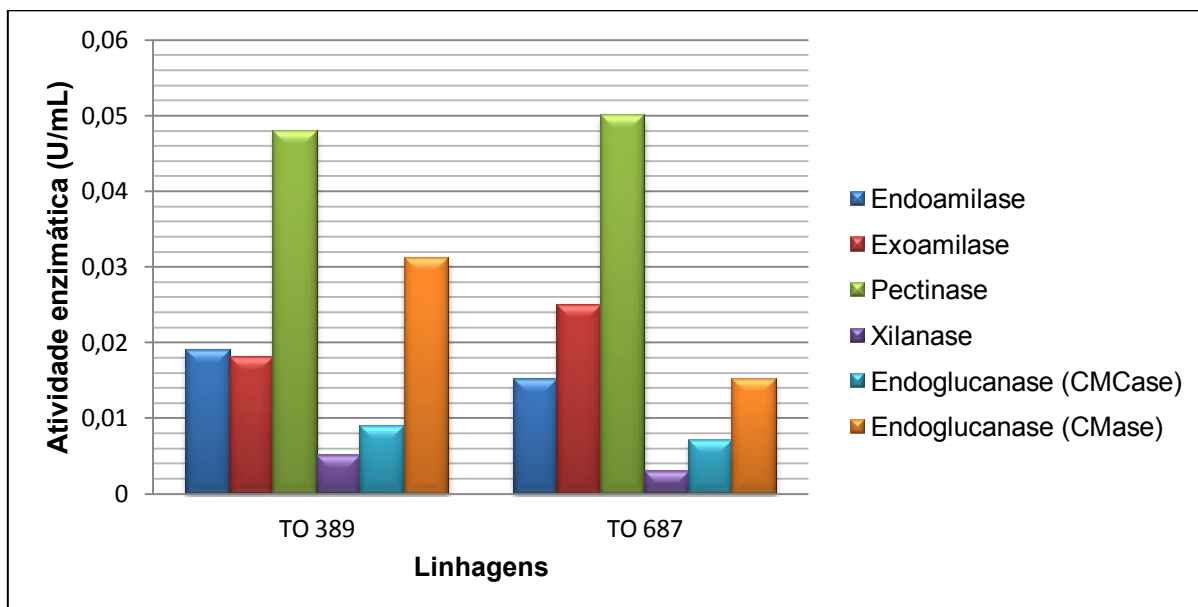
4.2.5 Meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado

Assim como observado no gênero *Aureobasidium*, os resultados em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado não diferiram daqueles obtidos em bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (item 4.2.1).

A concentração de açúcares redutores não foi alterada estatisticamente por nenhuma das linhagens (TO 389 e TO 687). No entanto, o crescimento celular apresentou valores expressivos, $1 \cdot 10^7$ células. mL^{-1} e $1,2 \cdot 10^7$ células. mL^{-1} respectivamente, o que nos permite concluir que as linhagens foram capazes de degradar a celulignina, liberando monossacarídeos apenas para a sua própria nutrição.

Ainda, ambas as linhagens (TO 389 e TO 687) produziram as seis enzimas hidrolíticas averiguadas. A atividade enzimática de maior valor foi pectinase com $0,052 \text{ U. mL}^{-1}$ (TO 687). Na figura 12 é apresentada a atividade enzimática obtida em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado.

Figura 12: Atividade enzimática (U/mL) do gênero *Meyerozyma* em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.6 Assimilação, fermentação e produção de etanol

A habilidade de assimilar fontes de carbono como glicose, D-xilose e L-arabinose, produtos da degradação de polímeros mais complexos como celulose, xilana e pectina, respectivamente, foi averiguada nas 40 linhagens de leveduras do gênero *Meyerozyma*. Como já era esperado, todas as linhagens assimilaram glicose; trinta e oito isolados foram capazes de crescer utilizando D-xilose como fonte de carbono; a assimilação de L-arabinose foi detectada em 97% das linhagens. Em seguida, aquelas com resultado positivo nos testes de assimilação de fonte de carbono foram analisadas quanto à capacidade fermentativa em meio líquido e quanto à capacidade de produzir etanol. Todos os resultados estão apresentados no Anexo 1.

Com relação à fermentação de glicose em meio líquido, apenas a linhagem TO 686, pertencente à espécie *Meyerozyma caribbica*, apresentou resultado negativo. Os demais isolados preencheram completamente o tubo de Durham com gás após 14 dias de incubação a 25° C. Ainda, aparentemente nenhuma das linhagens fermentou D-xilose, utilizando os testes de produção de gás como referência.

No entanto, dois isolados da espécie *Meyerozyma caribica* (TO 687 e TO 795), apresentaram resultados positivos no teste qualitativo de produção de etanol a partir de D-xilose utilizando a metodologia em placa (GRABEK-LEJKO et al, 2006), apesar de não terem produzido gás em meio líquido. Nesse teste é possível observar a produção de etanol indiretamente, através do crescimento da levedura *Candida silvae* (BR3-3BY), formando halos ao redor da linhagem em teste. Para confirmar esses resultados qualitativos foram realizadas análises mais precisas como descrito nos itens 3.11.2, 3.11.3 e 3.11.4.

Em relação à L-arabinose, não foi evidenciada produção de etanol por nenhuma das linhagens.

Após análises utilizando cromatografia gasosa, a produção de etanol a partir de D-xilose foi confirmada para a linhagem TO 795. No entanto, o mesmo não ocorreu para a linhagem TO 687, apesar da mesma ter consumido 49% da xilose disponível no meio após 72 horas. Talvez a quantidade de etanol produzido tenha sido muito pequena, tornando-se imperceptível no pico do cromatógrafo gasoso. Na Tabela 1 é possível observar todos os resultados referentes ao consumo de xilose disponível no meio e a produção de etanol por tempo de cultivo. Ainda, na Figura 13 está disponível o perfil de produção de etanol e consumo de xilose, onde os símbolos abertos correspondem ao etanol e os símbolos fechados correspondem à xilose.

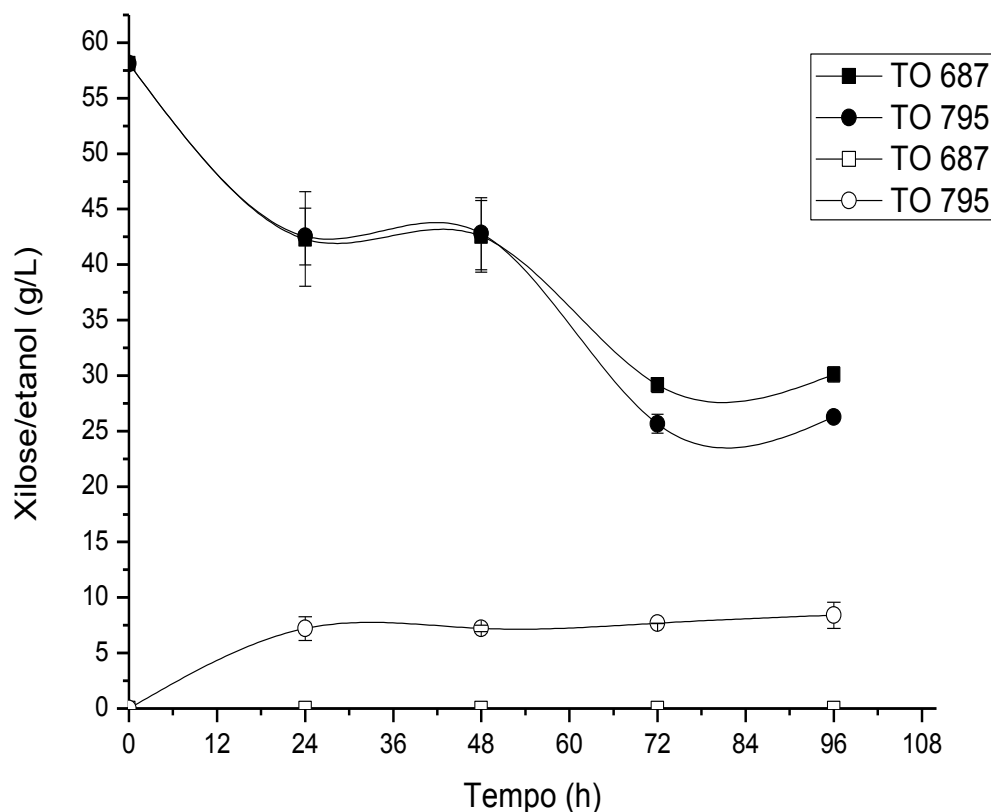
Tabela 1: Consumo de xilose produção de etanol

Levedura	Tempo (h)	Xilose no meio (g/L)	Desvio xilose	Consumo (%)	Etanol (g/L)	Desvio etanol	Rendimento etanol (g _p /g _s)*
Controle	0	58,1	0	0	0	0	0
TO 687	24	42,3	4,26	27	0	0	0
TO 687	48	42,5	3,24	27	0	0	0
TO 687	72	29,1	0,68	49	0	0	0
TO 687	96	30,1	0,68	48	0	0	0
TO 795	24	42,5	2,55	26	7,2	1,1	0,46
TO 795	48	42,8	3,24	26	7,2	0,3	0,47
TO 795	72	25,6	0,85	55	7,7	0,0	0,24
TO 795	96	26,2	0,34	54	8,4	1,2	0,26

*rendimento de etanol = g de etanol por g de xilose consumida

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 13: Perfil de produção de etanol e consumo de xilose



*os símbolos abertos correspondem ao etanol e os símbolos fechados correspondem à xilose
 Fonte: Elaborado pelo autor

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos confirmam que o jardim de fungos presente nos ninhos das formigas cortadeiras representa uma rica fonte de enzimas hidrolíticas, como já havia sido constatado por Carreiro (2000). Todos os isolados apresentaram atividade pectinolítica, amiolítica, celulolítica e xilanolítica, mesmo que em concentrações pouco relevantes.

Esta diversidade enzimática sugere que os gêneros *Aureobasidium* e *Meyerozyma* são capazes de degradar polissacarídeos vegetais, podendo ser úteis na produção de biocombustíveis. No entanto, assim como observado por Mendes et al. (2012), esses micro-organismos são capazes de assimilar os açúcares derivados da quebra de biopolímeros. Desta maneira, torna-se relevante o isolamento das

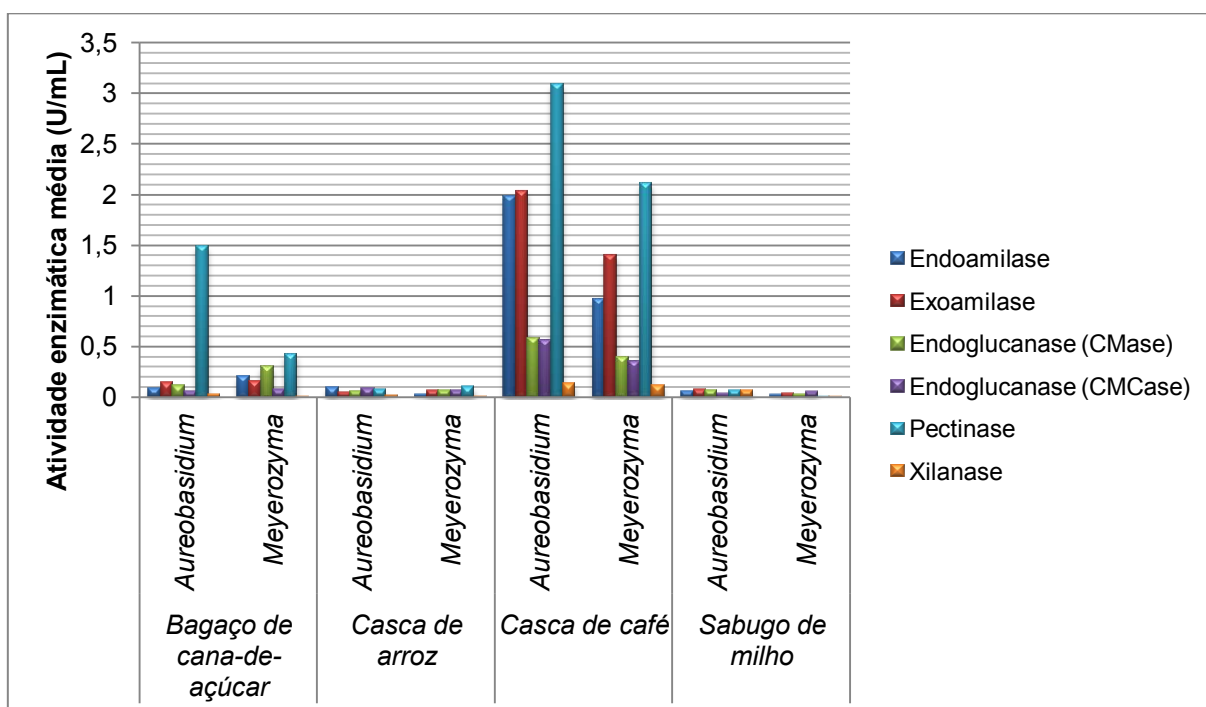
enzimas hidrolíticas, para que uma vez liberados os produtos de interesse biotecnológico, os mesmos não sejam consumidos pelos micro-organismos concomitantemente.

Dentre as 40 linhagens do gênero *Meyerozyma*, dois isolados pertencentes à espécie *Meyerozyma caribbica*, TO 687 e TO 389, são promissores na degradação de resíduos da agroindústria, uma vez que foram capazes de liberar açúcares redutores a partir de resíduos *in natura*. Além do mais, a linhagem TO 795 (*Meyerozyma caribbica*), é capaz de produzir etanol a partir da fermentação de D-xilose, sendo esta uma característica de grande relevância, uma vez que existe um grande número de leveduras capazes de fermentar pentoses, mas apenas algumas espécies podem produzir etanol a partir de D-xilose (MATOS et al., 2013).

Com relação ao gênero *Aureobasidium*, o seu frequente isolamento associado às formigas cortadeiras e a produção enzimática revelada no presente estudo, indicam seu potencial na degradação de resíduos vegetais. Entre as linhagens testadas, as mais promissoras em processos biotecnológicos são três isolados da espécie *Aureobasidium leucospermi* (TO 021, TO 290 e LB 34.1) e um isolado de *Aureobasidium pullulans* (TO 995), as quais conseguiram aumentar significativamente ($p < 0,05$) a concentração de monossacarídeos no meio de cultivo.

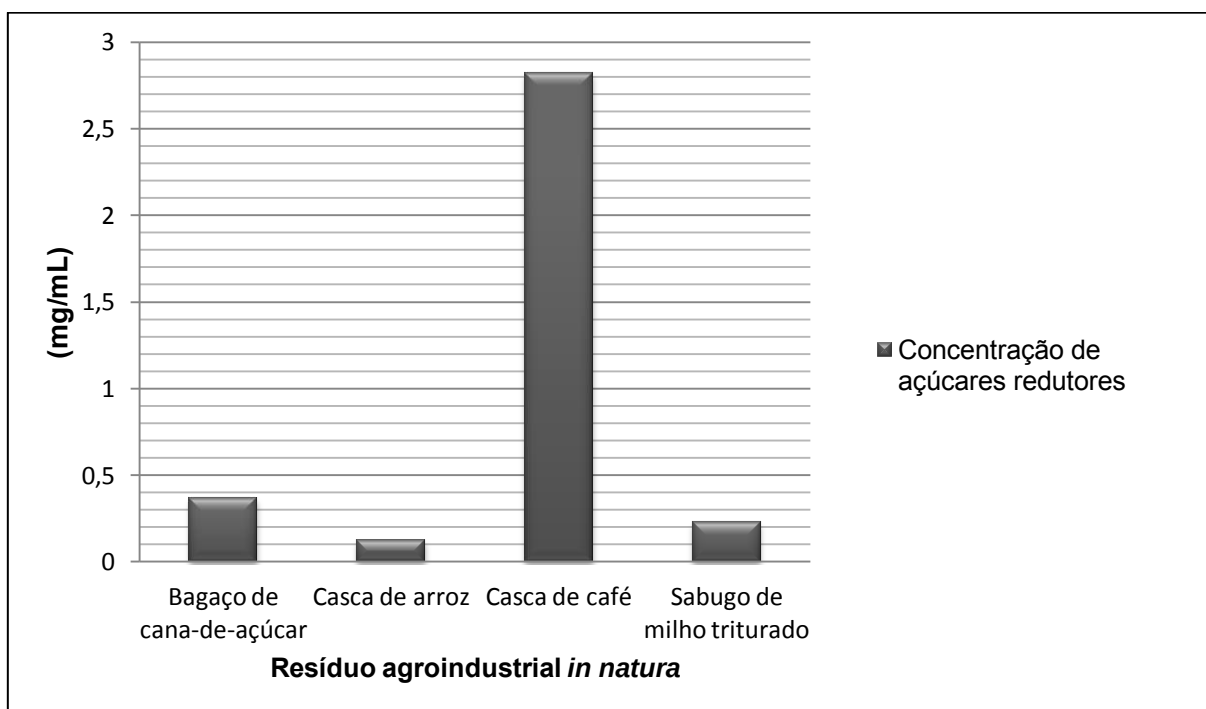
Ao observar a figura 13, nota-se que os maiores valores enzimáticos foram obtidos no meio suplementado com casca de café *in natura*, seguido pelo bagaço de cana-de-açúcar, com valores menos expressivos. Ainda, ao comparar a figura 13 com a figura 14, na qual é apresentada a concentração de açúcar redutor presente no resíduo sem inóculo, constatou-se que a casca de café possui grande quantidade de monossacarídeos disponíveis (2,82 mg/mL), quando comparado aos demais substratos, seguido do bagaço de cana-de-açúcar com 0,370 mg/mL.

Figura 14: Valores enzimáticos médios obtidos nos quatro resíduos agroindustriais *in natura*



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15: Concentração de açúcares redutores presente no resíduo agroindustrial sem inóculo (controle)



Fonte: Elaborado pelo autor

Estes resultados demonstram que a maior concentração de monossacarídeos influencia positivamente a produção enzimática. Tal resultado está de acordo com estudo de Blanco et al. (1999), no qual foi observado que quando a levedura cresce em concentrações maiores de açúcar a produção enzimática é maior. Além disso, os menores valores enzimáticos obtidos podem ser devido às condições de cultivo utilizadas, além de outros fatores relevantes como temperatura, pH, concentração do substrato e presença de outros compostos que podem influenciar os resultados. A obtenção de maiores valores enzimáticos pode ser alcançada se estas condições forem otimizadas.

Com relação ao bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado, o principal objectivo do pré-tratamento ácido foi solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose acessível às enzimas hidrolíticas (ALVIRA et al., 2010). Como já mencionado, nos resíduos lignocelulósicos, o acesso das enzimas à celulose é impedido pela alta resistência da parede celular à desconstrução (BORNSCHEUER et al., 2014), assim após a hidrólise ácida era esperado um maior acesso aos monossacarídeos. No entanto, os resultados obtidos não diferiram daqueles obtidos no bagaço de cana-de-açúcar.

Esse resultado contraditório provavelmente deve-se as condições empregadas no experimento, assim como outros fatores como temperatura, pH e concentração do substrato. Ainda, a escolha da tecnologia de pré-tratamento deve ser compatível com a etapa de hidrólise enzimática, tais como padrões de liberação de açúcar e enzimas empregadas, sendo que a combinação entre composição do substrato, tipo de pré-tratamento, e dosagem da eficiência enzimática tem grande influência sobre a digestibilidade da biomassa (ALVIRA et al., 2010).

Em todos os resíduos, os valores enzimáticos mais expressivos foram obtidos na atividade pectinolítica, principalmente no meio suplementado com casca de café ($3,40 \text{ U. mL}^{-1} \pm 0,18$). Isto indica que essas leveduras, representam uma fonte potencial desta enzima para fins biotecnológicos, tais como aplicações na indústria de alimentos, principalmente na clarificação de sucos de frutas (SANDRI et al., 2011) e degomagem de fibras (SHARMA et al., 2011). Ainda, de acordo com SHARMA et al. (2012) existem poucos relatos de produção de pectinases por leveduras, a maior parte dos registros literários relata a produção pectinolítica por fungos filamentosos e bactérias.

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que algumas linhagens de leveduras pertencentes aos gêneros *Aureobasidium* e *Meyerozyma* podem ser boas produtoras de enzimas hidrolíticas, podendo gerar açúcares fermentescíveis a partir de resíduos agroindustriais de baixo custo. Desta maneira, também é possível inferir que os ninhos de formigas cortadeiras representam um ambiente propício à prospecção de leveduras produtoras de enzimas hidrolíticas importantes em processos biotecnológicos, como a produção de etanol lignocelulósico. No entanto são necessários estudos complementares, utilizando condições otimizadas de cultivo e obtenção de enzimas, além de estudos em maior escala para confirmar e aprimorar os resultados obtidos.

Ainda, pode-se perceber claramente que a concentração mais elevada de monossacarídeos atua positivamente na produção de enzimas hidrolíticas. Devido a esta maior concentração de açúcares redutores, a casca de café foi o melhor indutor da atividade enzimática, devendo ser mais bem explorado em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. M., et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.340-349, 2007.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004.

ARCURI, S. L. et al. Produção de enzimas por leveduras isoladas de bitus de *Atta sexdens rubropilosa*. In: XXI - ALAM Congresso Latino Americano de Microbiologia, 2012, Santos. **Anais...**, 2012.

BARROS, E. M. et al. A Yeast Isolated from Cashew Apple Juice and Its Ability to Produce First-and Second-Generation Ethanol. **Applied biochemistry and biotechnology**, p. 1-15, 2014.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 1-9, 1999.

BORNSCHEUER, U.; BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Enzymatic Degradation of (Ligno) cellulose. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 41, p. 10876-10893, 2014.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-54, 2009.

CARREIRO, S. C. **Pesquisa de fator *Killer* e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens***. 2000. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

CHANDEL, A. K. et al. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 4, 2013.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. Blucher, 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GRABEK-LEJKO, D. et al. Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Vol. 33, p. 934-940, 2006.

HOU-RUI, Z. et al. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 152, n. 2, p. 199-212, 2009.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts – a taxonomic study**. 4. Ed. Amsterdam: Elsevier. 1998. 1055 p.

KURTZMAN, C. P., et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds) **The yeasts: a taxonomic study**, 5th edn. San Diego: Elsevier, 2011. p. 88-110.

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi1. **FEMS yeast research**, v. 3, n. 2, p. 133-140, 2003.

MATOS, I. T. S. R. et al. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with amazonian termites able to ferment D-xylose= Isolamento, identificação taxonômica e investigação. 2013. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 260-266, 2014.

MELO, W. G. P., et al. Degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae). In: XV – ALAM Congresso Latino Americano de Microbiologia, 2012, Santos. **Anais...**, 2012.

MENDES, T. D., et al. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, Postfach, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the production of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washignton, v. 31, n. 3, p. 426-620, 1959.

RODRIGUES, R. S. **Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol**. 2009. 81 p. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa, para obtenção do título de *Magister Scientiae*. Viçosa, Minas Gerais, 2009.

SANDRI, I. G. et al. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2217-2222, 2011.

SANHUEZA, R. M.V.; MELO, I. S (Ed.). **Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. p. 109-115.

SHARMA, A. et al. **Microbial Pectinases and Their Applications**. In: KUHAD, R. C.; SINGH, A. *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*. Springer, India, 2013, p. 107-124.

SOARES, L. C. S. R. **Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ANDERSON, W. F.; AKIN, D. E. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35, n. 5, p.355 - 366, 2008. DOI 10.1007/s10295 -007-0291-8.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 56, n. 3 – 4, p. 326 – 340, 2001.

BIELY, P.; KREMnický, L. Yeasts and their enzyme systems degrading cellulose, hemicellulose and pectin. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v.36, n. 4, p. 305-312, 1998.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, WD d; SOUZA, AP d. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. **Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, p. 365-380, 2010.

BUZZINI, P., MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

CARREIRO, S. C et al. A. Yeast associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 243-248, 1997.

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?

Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, Berlín, v. 108: 67–93, 2007.

GUPTA J.K. et al. Degradation of synthetic lignins and some lignin monomers by the yeast *Rhodotorula glutinis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 53-58, 1990.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

KUDANGA, T.; MWENJE, E. Extracellular cellulase production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans* **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 9, p. 773-776, 2005.

MOLLER, I.E. et al. The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf-cutting ant fungus gardens. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2011.

SANCHÉZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnological advances**, Netherlands, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SENA, A. R. et al. Seleção de fungos do semiárido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. 2006. **Sitientibus**, 35: 91-98.

PEDROLI, D. B. et al. Studies on productivity and characterisation of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton v. 144, n. 2, p. 191-200, 2008.

APÊNDICE A – Assimilação, fermentação e produção de etanol pelo gênero *Meyerozyma*

Tabela 1: Tabela de fermentação e produção de etanol das linhagens com capacidade assimilatória de D-xilose e L-arabinose

Código da linhagem	Espécie	Assimilação		Fermentação		Produção de etanol	
		D-xilose	L-arabinose	Glicose	D-xilose	D-xilose	L-arabinose
TO 187	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 210	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 211	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 212	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 213	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 389	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 461	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 500	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 502	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 569	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 686	<i>M.caribbica</i>	+	+	-	-	-	-
TO 687	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	+	-
TO 753	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 777	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 780	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 787	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 794	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 795	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	+	-

Continuação

Código da linhagem	Espécie	Assimilação		Fermentação		Produção de etanol	
		D-xilose	L-arabinose	Glicose	D-xilose	D-xilose	L-arabinose
TO 796	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 800	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 805	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 809	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 810	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 812	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 813	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1089	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1091	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1094	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1102	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1103	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1106	<i>M. guilliermondii</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1107	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1108	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1109	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1110	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1111	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-
TO 1112	<i>M.caribbica</i>	+	+	+	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor