

PROSPECÇÃO E MELHORAMENTO DE MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO

Paula F. Franco¹, Larissa M. Lima², Carolina M. Poletto², Thais D. Mendes², Thais F. C. Salum³, Léia C. L. Fávaro³, **João Ricardo M. Almeida³**

¹ Analista Embrapa Agroenergia, paula.franco@embrapa.br, carolina.poletto@embrapa.br, thais.mendes@embrapa.br

² Estagiária Embrapa Agroenergia, larissaml.uc@gmail.com

³ Pesquisador(a) Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br, leia.favaro@embrapa.br, joao.almeida@embrapa.br

Resumo: Biomassa lignocelulósica e glicerol bruto resíduo da indústria do biodiesel são dois substratos de baixo custo e abundantes que podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis e químicos. Várias linhagens microbianas capazes de converter estes substratos a produtos químicos de interesse biotecnológico tem sido obtidas pela prospecção da biodiversidade e/ou estratégias de engenharia genética. Neste trabalho, prospectamos leveduras de dendê (*Elaeis guineensis*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), e do solo em torno destas culturas para selecionar linhagens capazes de produzir biocombustíveis e químicos a partir de pentoses e glicerol bruto da indústria do biodiesel. Inicialmente, cerca de 400 linhagens de leveduras foram prospectadas para crescimento em microplacas contendo xilose ou glicerol como única fonte de carbono. Posteriormente, o crescimento destas também foi avaliado em hidrolisado de bagaço de cana contendo xilose e glicerol bruto oriundo de uma indústria de biodiesel. Comparações da capacidade de fermentação de xilose das melhores linhagens isoladas demonstraram que algumas destas podem consumir xilose mais eficientemente que *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y7124. Resultados semelhantes foram encontrados para a conversão de glicerol. A Identificação taxonômica de linhagens mostrou que elas pertencem a diferentes gêneros, incluindo *Pichia*. Além disso, foi realizada a caracterização de atividades enzimáticas responsáveis pelo metabolismo inicial de xilose nessas leveduras. A preferência da enzima xilose redutase das novas linhagens pelos cofatores NADH e NADPH foi determinada. Novas linhagens de leveduras e enzimas identificadas neste trabalho poderão ser utilizadas em programas de melhoramento genético de microrganismos. Nossos resultados demonstram claramente o potencial de bioprospecção na obtenção de novas linhagens microbianas e suas enzimas para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: biocombustíveis, glicerol bruto, lignocelulose, leveduras

Introdução

A alta demanda mundial de energia, a incerteza na oferta das fontes de petróleo e as evidências sobre os efeitos causados pelas mudanças climáticas tem direcionado, cada vez mais, a necessidade do desenvolvimento de fontes alternativas para produção de combustíveis e químicos (GUPTA et al., 2009). A produção de etanol de segunda geração (2G), ou seja, a partir de biomassa lignocelulósica, que é rica em pentoses e hexoses, apresenta uma grande oportunidade econômica e ambiental. As biomassas são abundantes nos mais variados ambientes, especialmente nas áreas tropicais, são renováveis e de baixo custo, e não competem com o abastecimento alimentar.

Por outro lado, a produção de biodiesel aumentou consideravelmente nos últimos anos. O Brasil mostrou o maior aumento na taxa de produção nos últimos anos, quando comparado com os Estados Unidos e Europa, i. e. de 736 m³ em 2005 para 2.400.000 m³ em 2010. Como a produção de glicerina bruta segue o aumento da produção de biodiesel, já que a estequiometria da reação dita que para cada 10 toneladas de biodiesel 1 tonelada de glicerina bruta é formada, a glicerina bruta tem se mostrado como atraente substrato para produção de biocombustíveis e químicos (ALMEIDA 2012).

Atualmente, várias linhagens microbianas capazes de converter os açúcares derivados da lignocelulose (pentoses e hexoses) e glicerina bruta a produtos químicos de interesse biotecnológico tem sido obtidas pela prospecção da biodiversidade e /ou estratégias de engenharia genética (ALMEIDA, 2011; ALMEIDA 2012).

O presente trabalho teve como objetivo principal obter linhagens microbianas para a produção de biocombustíveis e químicos a partir de xilose e da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel.

Material e Métodos

Prospecção de banco de microrganismos para selecionar microrganismos capazes de utilizar xilose e glicerina como única fonte de carbono: Inicialmente, aproximadamente 400 linhagens de bactérias e leveduras previamente isoladas de diferentes biomas/ambientes já presentes em banco de germoplasma microbiano da Embrapa Agroenergia foram avaliados quanto à capacidade de crescer em xilose e glicerina P.A. Em seguida, aqueles que apresentaram o melhor crescimento em glicerina P.A foram avaliados quanto à capacidade de consumir e crescer em hidrolisados de biomassa e glicerina

bruta proveniente da indústria do biodiesel. A seleção das melhores linhagens microbianas seguiu o protocolo de seleção estabelecido por ALMEIDA (2009) com adaptações. Resumidamente, as linhagens foram inoculadas em 200 µL de LB (bactérias) ou YPD (leveduras) em microplacas, as quais foram posteriormente incubadas a 28°C ou 37°C sem agitação por aproximadamente 16h. Essas pré-culturas foram utilizadas para inocular 200 µL de meio mínimo M9 (para bactérias) ou YNB (para leveduras) suplementado com xilose ou glicerina (única fonte de carbono) em microplacas de 96 poços. A transferência foi feita com o auxílio de repicadores de 96 pinos (Boekel, USA). As placas foram incubadas como anteriormente e o crescimento monitorado medindo-se a absorbância (OD₆₀₀) com o auxílio de um espectrofotômetro (SpectraMax M3, Molecular Devices).

Identificação taxonômica: as melhores linhagens de bactérias e leveduras foram selecionadas para identificação tanto pela capacidade de metabolizar (crescer) xilose e glicerina. As linhagens foram identificadas pelo sequenciamento dos genes de RNAr 16S para bactérias e 26S (região D1/D2) para leveduras. Para tanto, a extração do DNA genômico foi realizada com Wizard DNA extraction kit (Promega, Madison, USA) seguindo as recomendações do fabricante. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 uL utilizando os iniciadores universais para a região 16S de bactérias, e os iniciadores NL1 e NL4 para a região 26S (domínio D1/D2) de leveduras. Os produtos de amplificação foram purificados com UltraClean™ PCR Clean-up™ Kit (MO BIO Laboratories, Inc) de acordo com as recomendações do fabricante e sequenciados, em ambas as direções, usando BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit v.1.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Identificação e quantificação de compostos produzidos pelas linhagens selecionadas: os metabólicos produzidos por linhagens de bactérias e leveduras durante o crescimento em xilose e glicerina foram identificados e quantificados utilizando um sistema de HPLC. Em resumo, as amostras foram analisadas em sistema HPLC (Waters Milford, USA) equipado com coluna Aminex HPX-87 H (Bio-Rad, USA). Ácido sulfúrico a 5 mM foi utilizado como fase móvel a velocidade de 0,6 ml/min com a coluna a temperatura de 42°C. Os resultados de HPLC foram utilizados para definir o tipo de metabólico produzido, calcular o rendimento (g de produto formado/ g de glicerina consumido) e a produtividade (g/l produto/tempo) das linhagens.

Avaliação da capacidade fermentativa e da produção dos compostos desejados pelas linhagens selecionadas: Para fermentações em volumes pequenos, fermentações em frascos Erlenmeyer ou tipo

serum foram utilizados. A densidade celular no início da fermentação foi de pelo menos 0,2 g/L. Amostras foram coletadas a intervalos de tempo regulares para análise de crescimento celular, consumo de xilose ou glicerina e produção de metabólitos. A biomassa celular foi medida utilizando-se variação de absorbância e peso seco.

Resultados e Discussão

Neste trabalho, prospectamos leveduras de dendê (*Elaeis guineensis*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), e do solo em torno destas culturas para selecionar linhagens capazes de produzir biocombustíveis e químicos a partir de xilose e glicerol bruto da indústria do biodiesel. Inicialmente, cerca de 400 linhagens de leveduras foram prospectadas para crescimento em microplacas contendo xilose ou glicerol como única fonte de carbono. Para avaliar a tolerância das linhagens a compostos inibitórios presentes nos substratos, o crescimento destas também foi avaliado em hidrolisado de bagaço de cana e glicerol bruto oriundo de uma indústria de biodiesel. Com base nos resultados obtidos, fomos capazes de isolar novas linhagens de leveduras para avaliação sob condições fermentativas. Comparações da capacidade de fermentação de xilose demonstraram que algumas das linhagens podem consumir xilose mais eficientemente que *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y7124. Esta espécie de levedura é conhecida por sua capacidade de crescer em xilose. Resultados semelhantes foram encontrados para a conversão de glicerol. Identificação taxonômica de linhagens mostrou que elas pertencem a diferentes gêneros, incluindo *Pichia*. Além disso, foi realizada a caracterização de atividades enzimáticas responsáveis pelo metabolismo inicial de xilose nessas leveduras. A preferência da enzima xilose redutase das novas linhagens pelos cofatores NADH e NADPH foi determinada.

Conclusão

Neste trabalho, exploramos a biodiversidade brasileira para isolar novas linhagens microbianas capazes de utilizar xilose, principal pentose componente da lignocelulose, e glicerina bruta. As linhagens isoladas foram selecionadas quanto à capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono e avaliadas em processos fermentativos. As novas linhagens de leveduras e enzimas identificadas neste trabalho poderão ser utilizadas em programas de melhoramento genético de microrganismos. Nossos resultados demonstram claramente o potencial de bioprospecção na obtenção de novas linhagens microbianas e suas enzimas para aplicações biotecnológicas.

Agradecimentos

CNPq, Embrapa e Finep pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J.R.M.; RUNQUIST, D.; NOGUE, V.S.I.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Journal**, v 6(3):286-299, 2011

ALMEIDA, J.R.M.; FAVARO, L.C.L.; QUIRINO, B.F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, 5:48, 2012.

ALMEIDA, J.R.M.; KARHUMAA, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains with respect to anaerobic growth in non-detoxified lignocellulose hydrolysate. **Bioresource Technology**, 100(14):3674-3677, 2009.

GUPTA, R.; SHARMA, K. K.; KUHAD, R. C. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipites*-NCIM 3298. **Bioresource Technology**, 100, 1214-1220, 2009.