

YUARÃ MIGNONI

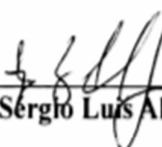
**METABOLIZAÇÃO DA GALACTOSE POR LEVEDURAS ISOLADAS
DE FRUTAS CÍTRICAS EM DECOMPOSIÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como
requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia
Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Sérgio Luis Alves Júnior

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e
aprovado pela banca em: 01/12/2016

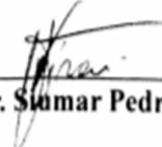
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio Luis Alves Júnior – UFFS



Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS



Prof. Dr. Sumar Pedro Tironi - UFFS

Metabolização da galactose e xilose por leveduras isoladas de frutas cítricas em decomposição.
Galactose and xylose metabolism by isolated yeast from citric fruits in decomposition.

Yuarã Culkyn Mignoni¹ Sérgio Luiz Alves Junior²

RESUMO

O setor mundial de sucos cítricos processa anualmente mais de 40 milhões de toneladas de frutas. Estima-se que metade do peso seco da fruta torne-se um rejeito rico em celulose, hemicelulose e principalmente pectina, que apresenta em sua composição galactose e xilose. Foram isoladas e analisadas quanto ao crescimento, consumo de açúcar e produção de etanol em meios de galactose e xilose, três linhagens de leveduras da microbiota local selecionadas a partir de laranjas em decomposição. Comparou-se seus desempenhos com o da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mais expressivos encontram-se em meios de xilose, sendo produzido 2,87 g.L⁻¹ e 1,81 g.L⁻¹ pelas cepas CHAP-078 e CHAP-047, respectivamente. Entretanto as linhagens estudadas não foram capazes de crescer ou cresceram somente após uma fase lag extensa em meios contendo galactose. Os dados indicam a possibilidade de se encontrar, em laranjas em decomposição, leveduras capazes de metabolizar carboidratos não fermentados por *S. cerevisiae*.

PALAVRAS CHAVE: Etanol 2g; Laranja; Pectina; *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

The citrus juice industry processes more than 40 million tons of fruit annually. It is estimated that half the dry weight of the fruit becomes a subproduct rich in cellulose, hemicellulose and mainly pectin, which has in its composition galactose and xylose. Three strains of yeast from the local microbiota selected from decomposing oranges were isolated and analyzed its growth, sugar consumption and ethanol production in medium of galactose and xylose. Their performances were compared with that of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The most expressive results were found in xylose medium, producing 2.87 g.L⁻¹ and 1.81 g.L⁻¹ by CHAP-078 and CHAP-047 strains, respectively. However, the studied strains were not able to grow or they did it only after a long lag phase in galactose-containing medium. Therefore, the data indicates the possibility to discover, in decomposing biomass, yeasts capable of metabolizing carbohydrates not fermented by *S. cerevisiae*.

KEYWORDS: Ethanol 2g; Orange; Pectin; *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

Com a invenção do motor a combustão interna, o petróleo tornou-se um importante produto de consumo e principal fonte de energia do mundo. Rapidamente os países que não possuíam produção própria de petróleo, dentre eles, o Brasil, tornaram-se dependentes dos exportadores, que em 1960 fundaram a Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP). Em 1973 os países membros, que representavam praticamente toda a produção mundial do novo combustível, optaram por reduzir drasticamente a sua produção enquanto aumentaram o preço, gerando uma desestabilização na economia mundial, o que resultou em uma desaceleração da nossa economia.

Segundo Gordinho (2010), a alta taxa de crescimento econômico do Brasil, no início da ditadura militar, se devia aos baixos preços da energia provida do petróleo e de capital estrangeiro. Com a ação da OPEP e por consequência da crise mundial, o país se viu rapidamente sem ambos os seus fatores de crescimento, portanto o petróleo foi o parâmetro econômico que impulsionou os investimentos em novas fontes de energia e assim foi criado o Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool).

O programa tinha como objetivo impulsionar a produção e o consumo do etanol como combustível, de forma a torná-lo um substituto do petróleo, buscando desta forma, evitar que a economia do país sofresse novamente, como o que outrora havia acontecido durante os períodos conhecidos como “choques do petróleo” nos anos de 1973 e 1978 (PASSOS, 2009). Neste período, as condições para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar eram muito favoráveis, pois em contrapartida à crise que expandia os preços do petróleo mundialmente, no mercado internacional, o açúcar apresentava bastante desvalorização. Neste período, o Brasil

¹ Acadêmico do curso de Engenharia Ambiental, UFFS – *Campus* Chapecó. Chapecó – Santa Catarina
yuamignoni@gmail.com

² Professor Adjunto IV do curso de Engenharia Ambiental, UFFS – *Campus* Chapecó. Chapecó – Santa Catarina
slalvesjr@uffs.edu.br

já possuía um setor açucareiro bastante desenvolvido, contando com experiência na fabricação de álcool industrial para o mercado externo. Além disso, continha terras e condições climáticas propícias ao plantio e colheita da cana-de-açúcar, mão de obra disponível e capacidade ociosa no setor, que, com a produção de álcool combustível, poderia ser reduzida (BERTELLI, 2007).

A produção de etanol no Brasil, segundo dados disponibilizados pela *Renewable Fuels Association* (2016), é de aproximadamente 26,85 bilhões de litros e provém do caldo de cana-de-açúcar e do melaço. Para a produção do combustível conhecido como “etanol de primeira geração”, estes produtos provenientes da cana são fermentados pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com Silva *et al.* (2014), o resíduo produzido pela indústria do etanol de primeira geração a partir da cana-de-açúcar é estimado em 150 milhões de toneladas de bagaço por ano, material bastante rico em carboidratos potencialmente fermentáveis, capazes de produzir o álcool conhecido como “etanol de segunda geração”, isto é, provindo dos subprodutos originados na produção do etanol de primeira geração.

Da mesma forma que se pode utilizar o bagaço da cana-de-açúcar para produção de biocombustível, outras fontes de biomassa também podem ser empregadas com a mesma finalidade. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (2016), a produção de sucos cítricos provindos da laranja é um setor industrial de notável magnitude, processando anualmente cerca de $45,8 \cdot 10^6$ toneladas de frutas ao redor do mundo, sendo o Brasil o líder deste mercado processando $14,4 \cdot 10^6$ toneladas de laranjas por ano. De acordo com Rezzadori e Benedetti (2009), a extração de suco gera o equivalente a 50% do peso da fruta em rejeito, subproduto que, atualmente, tem seu uso limitado a alimentação animal e, como apresentado por Edwards e Doran-Peterson (2012), não possui retorno econômico significativo.

Segundo Rivas *et al.* (2008), o bagaço, subproduto da indústria de sucos cítricos, possui 16,9% de sua composição formada por açúcares solúveis, 9,21% de celulose, 10,5% de hemicelulose e 42,5% de pectina, sendo este o componente mais importante, devido a sua abundância. Segundo Grohmann *et al.* (1995), a pectina é rica em ácido galacturônico, arabinose, galactose e apresenta pequenas quantidades de xilose, ramnose e glicose.

A pectina é a família de polissacarídeos mais complexa estruturalmente da natureza e está presente em inúmeras plantas, constituindo aproximadamente 35% das paredes primárias em dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramináceas, entre 2 e 10 % do capim e outras paredes primárias comelinídeas, e até 5% de paredes em tecido lenhoso (Mohnen, 2008). Biomassas consideradas ricas em pectina possuem entre 12 a 35% de seu peso seco correspondente ao polissacarídeo, em contraste com outras biomassas, como por exemplo as lenhosas, que possuem entre 2 a 10% (EDWARDS, DORAN-PETERSON, 2010; MOHNEN *et al.*, 2008).

A pectina consiste, de modo simplificado, em uma cadeia principal composta por diversas unidades de ácido galacturônico unidas através de ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4) e que podem ser interrompidas por unidades de L-ramnose através de ligações α -(1 \rightarrow 2), onde estão localizadas cadeias laterais, constituídas principalmente de galactose e arabinose, e em menor quantidade glicose e xilose (Figura 1) (MOHNEN *et al.*, 2008; SEYFRIED *et al.* 2016; Zanella, 2013).

Da quebra da pectina provêm vários monossacarídeos, dentre eles a galactose e a xilose, monossacarídeos que, dependendo da levedura, podem ser metabolizados através da fermentação alcoólica para produzir etanol. Sendo assim, utilizando-se de pectinases para quebrar a pectina e promovendo a metabolização dos monossacarídeos resultantes dessa quebra, pode-se produzir etanol (MOHNEN *et al.* 2008; SEYFRIED *et al.* 2016; ZANELLA, 2013).

As pectinases são as enzimas responsáveis pela quebra da pectina, e englobam no mínimo sete diferentes atividades enzimáticas responsáveis pela quebra da pectina em diversas plantas. Elas são produzidas por plantas e alguns microrganismos, porém a sua maior fonte para usos comerciais é a *aspergillus* sp. (FAVELA-TORRES, CONTRERAS-ESQUIVEL, VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2005)

Quando a enzima atua nas extremidades da cadeia de açúcares ela é denominada exoenzimas e libera dímeros ou monômeros. Entretanto quando a enzima é denominada endoenzima, ela atua clivando a molécula de pectina e liberando oligômeros menores. (SANTI, BERGER, SILVA, 2014 *apud* FOGARTY, KELLY, 1983)

As enzimas podem ainda ser classificadas como exoenzimas, atuando nas extremidades da cadeia de açúcares, liberando dímeros ou monômeros, ou endoenzimas, clivando a molécula de pectina e liberando oligômeros menores (FOGARTY; KELLY, 1983).

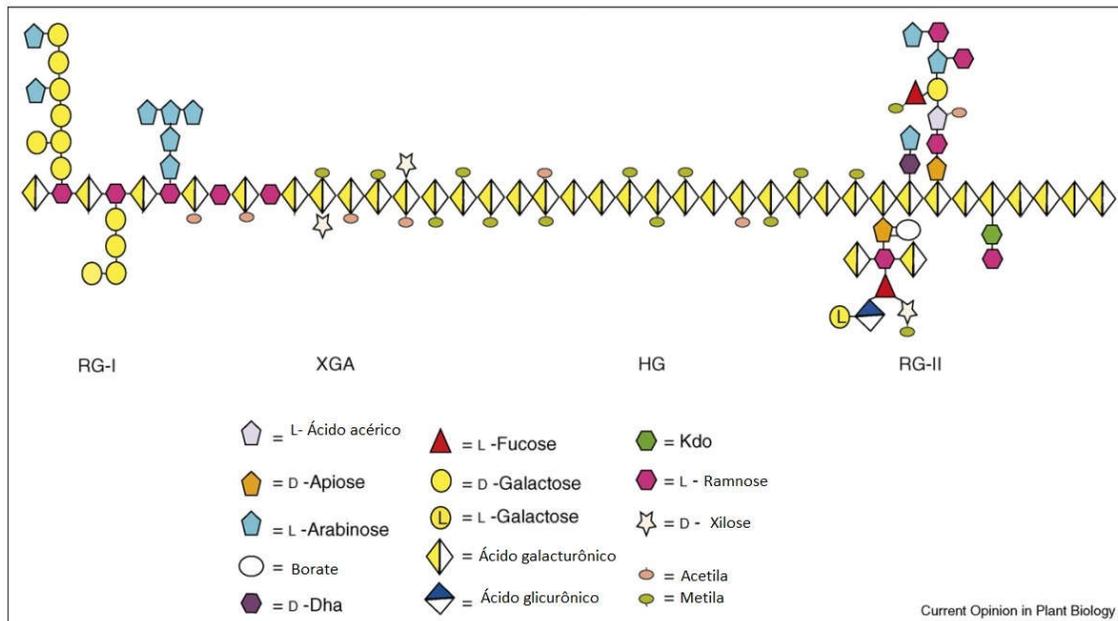


Figura 1 - Esquema estrutural da pectina. Fonte: Adaptado de Mohnen (2008).

Atualmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é empregada na indústria alcooleira por ser capaz de fermentar mesmo em condições adversas, como baixo pH e meios com alta concentração de etanol (STAMBUK *et al.*, 2008). Ela é um eucarioto simples com metabolismo versátil e metaboliza diversas fontes de carbono como a glicose, frutose e galactose. Quando inserida em um meio formado por diversos açúcares, se este possuir glicose, será esta a sua primeira opção de consumo e, somente após sua exaustão, outros carboidratos presentes no meio serão consumidos. Isso se deve ao fenômeno da repressão catabólica, que interfere com o metabolismo de diversos açúcares, entre eles a galactose (SILVEIRA, 2013). Entretanto, sem esse fenômeno, a galactose é facilmente fermentada pela *S. cerevisiae* através da Via de Leloir, todavia os crescimentos em glicose são geralmente maiores que os em galactose (VAN MARIS *et al.* 2006).

A xilose é o segundo açúcar mais abundante nas biomassas vegetais residuais e o mais importante monossacarídeo que a *S. cerevisiae* não é capaz de assimilar. Sendo assim, encontrar uma levedura capaz de realizar sua fermentação é demasiadamente importante para o rendimento do etanol de segunda geração (USHER, 2011; VAN MARIS *et al.* 2006). Muitas bactérias e fungos que metabolizam a xilose já foram encontrados, porém são ineficientes para o uso industrial devido a alguns fatores como a baixa tolerância ao álcool ou a geração de subprodutos indesejados. A *S. cerevisiae* é incapaz de produzir etanol a partir de xilose, portanto faz-se necessário encontrar alternativas de modo a torná-la capaz de fermentar este açúcar, ou encontrar outra levedura que possa assumir seu lugar nas indústrias (STAMBUK *et al.*, 2008).

Devido a pectina estar presente em frutas cítricas e ter em sua constituição os açúcares xilose e galactose, o presente trabalho teve como objetivo isolar leveduras da biota local a fim de identificar novas linhagens capazes de metabolizar e fermentar tanto a xilose quanto a galactose, e selecionar, dentre as leveduras, a melhor cepa, haja vista a possibilidade de abrir um novo mercado economicamente rentável para os resíduos da indústria de sucos cítricos.

METODOLOGIA

ISOLAMENTO DE LEVEDURAS

As leveduras foram isoladas a partir de laranjas em estado de decomposição que foram colhidos em propriedades rurais nos municípios de Chapecó e Xaxim, no Estado de Santa Catarina e posteriormente doadas para a realização deste estudo. Amostras contendo 1,0 g foram retiradas aleatoriamente das laranjas, e inoculadas em frasco *Erlenmeyer* contendo meio composto por 6,7 g·L⁻¹ de base nitrogenada e 2 g·L⁻¹ de xilose. Os frascos então foram incubados à temperatura de 25°C e agitação constante por 145 rpm. Quando observado considerável crescimento celular através da turbidez do meio, retirou-se, de cada amostra, uma alçada de células do meio líquido, e esta, estriada por esgotamento em uma placa de Petri, contendo 6,7 g·L⁻¹ de base nitrogenada,

1 g·L⁻¹ de xilose e 2 g·L⁻¹ de ágar. As placas foram incubadas a 25 °C, e posteriormente foram selecionadas as leveduras com base na morfologia das colônias e na análise microscópica das células.

CRESCIMENTO CELULAR

As leveduras selecionadas foram pré-cultivadas em frascos Erlenmeyer com 1/5 do seu volume preenchido de meio rico, contendo 10 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g·L⁻¹ de peptona e 20 g·L⁻¹ de glicose, durante período de 48 horas. Em seguida, foi realizada a transferência de uma amostra do pré-inóculo, contendo 1% do volume final do inóculo, para um novo frasco Erlenmeyer contendo meios líquidos mínimos compostos por 6,7 g·L⁻¹ de base nitrogenada e 20 g·L⁻¹ dos carboidratos glicose da marca SIGMA com pureza maior que 99,5%, xilose da marca SIGMA com pureza maior que 99% ou galactose da marca SIGMA com pureza maior que 98%. Os meios tiveram o pH ajustado para 5,0 e, posteriormente, essas culturas foram incubadas a temperatura de 25 °C e submetidas a agitação constante de 145 rpm.

Ao decorrer do crescimento foram retiradas amostras de cada meio, sempre nos mesmos intervalos de tempo pré-estabelecidos, totalizando um período de amostragem de 48 horas. A partir das amostras coletadas, foram realizadas as determinações de crescimento celular, através da medição da densidade óptica utilizando um espectrofotômetro marca NOVA, modelo NI 1600UV, com feixe de 570 nm (DO570nm).

Nos mesmos intervalos de tempo pré-estabelecidos, retirou-se também uma alíquota de cada meio, submetendo-a a centrifugação durante o período de 3 minutos na velocidade de 5.000 rpm em uma centrífuga da marca SIGA modelo 3-16KL. O líquido sobrenadante resultante deste processo foi armazenado para posterior determinação do consumo de açúcar e produção de etanol pelas leveduras em cada um dos meios.

DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE AÇÚCARES

A dosagem dos açúcares glicose, xilose e galactose foi realizada através de uma adaptação do método colorimétrico de DNS – descrito por Miller (1959) – para microplacas de 96 poços (de fundo plano), conforme descrito por Deoti e Alves (2014) e Santos e Alves (2014). Em cada poço das microplacas, foram adicionados 25 µL de amostra, diluídas conforme necessidade, de modo que suas leituras estivessem dentro da curva de calibração, e 25 µL de reativo DNS (10 g·L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g·L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio em 0,4 M NaOH). As curvas de calibração foram estabelecidas com seis concentrações, na faixa de 0 a 2,0 g·L⁻¹ dos açúcares glicose, galactose e xilose, e foram realizadas em todas as microplacas submetidas a leitura. Depois de pipetadas as amostras e o reativo, as microplacas foram seladas com filme plástico (T796400, E&K Scientific), incubadas em banho fervente por 5 minutos e, subsequentemente, resfriadas no gelo. Após este processo, retirou-se o filme plástico e adicionou-se 330 µL de água em cada poço. Por fim, as microplacas contendo as amostras e o reativo DNS foram lidas em leitor de microplacas da marca BIOTEK, modelo ELx800, com feixe de luz de 490 nm. As concentrações, em g·L⁻¹ dos carboidratos glicose, galactose e xilose, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorbância obtidas diretamente em planilhas do Microsoft® Excel.

DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL

O etanol, produzido durante os crescimentos celulares, foi quantificado enzimaticamente através da reação com a álcool oxidase (AOD) e com a peroxidase (POD), seguindo metodologias adaptadas dos protocolos descritos por Salgado *et al.* (2000) e Rodionov *et al.* (2002).

Para essa determinação, 10,0 µL de amostra foram incubados em microplacas de 96 poços (de fundo plano) com 200,0 µL do reagente enzimático (0,5 U de AOD/mL, 4,0 U de POD/mL, 14,0 mM de 4-aminoantipirina e 60,0 mM de Fenol em Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M, pH 7,5), pelo período de 2 horas, à temperatura de 37 °C. Após incubação, a absorbância foi medida através do leitor de microplacas da marca BIOTEK, modelo ELx800, com feixe de luz a 490 nm. A concentração de etanol foi determinada através da correlação do valor de absorbância apresentada para cada amostra, com a equação de reta extraída de uma curva de calibração com seis pontos construída com soluções padrão de etanol, dentro da faixa de 1,0 a 10,0 g·L⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades experimentais deste trabalho tiveram início com o isolamento das leveduras a serem estudadas a partir de laranjas que se apresentavam em decomposição. Com isso, foram isoladas 38 cepas. Cada linhagem isolada foi então identificada com a sigla CHAP e um número que varia entre 45 e 82. Para dar início ao crescimento celular, foram escolhidas três linhagens aleatórias e a linhagem CAT-1, da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (BASSO *et al.*, 2008). Desta forma, foram submetidas a testes um total de quatro linhagens, sendo três encontradas na microbiota local, CHAP-047, CHAP-070 e CHAP-78, respectivamente, e uma de origem industrial (CAT-1), de modo a fundamentar a comparação entre as linhagens estudadas.

Após isoladas, cada levedura foi inoculada individualmente em três meios, cada um contendo os açúcares xilose, glicose ou galactose, pelo período de 48 horas (conforme descrito na Metodologia), com intuito de analisar o consumo destes açúcares pelas leveduras e o consequente crescimento celular no meio em questão, especialmente em xilose e galactose.

Nas Figuras 2, 3 e 4, estão apresentados os gráficos que relacionam o período de incubação com o crescimento celular (A), a produção de etanol (B) e o consumo do açúcar (C) pelas linhagens da biota local, CHAP-047, CHAP-070 e CHAP-078, respectivamente.

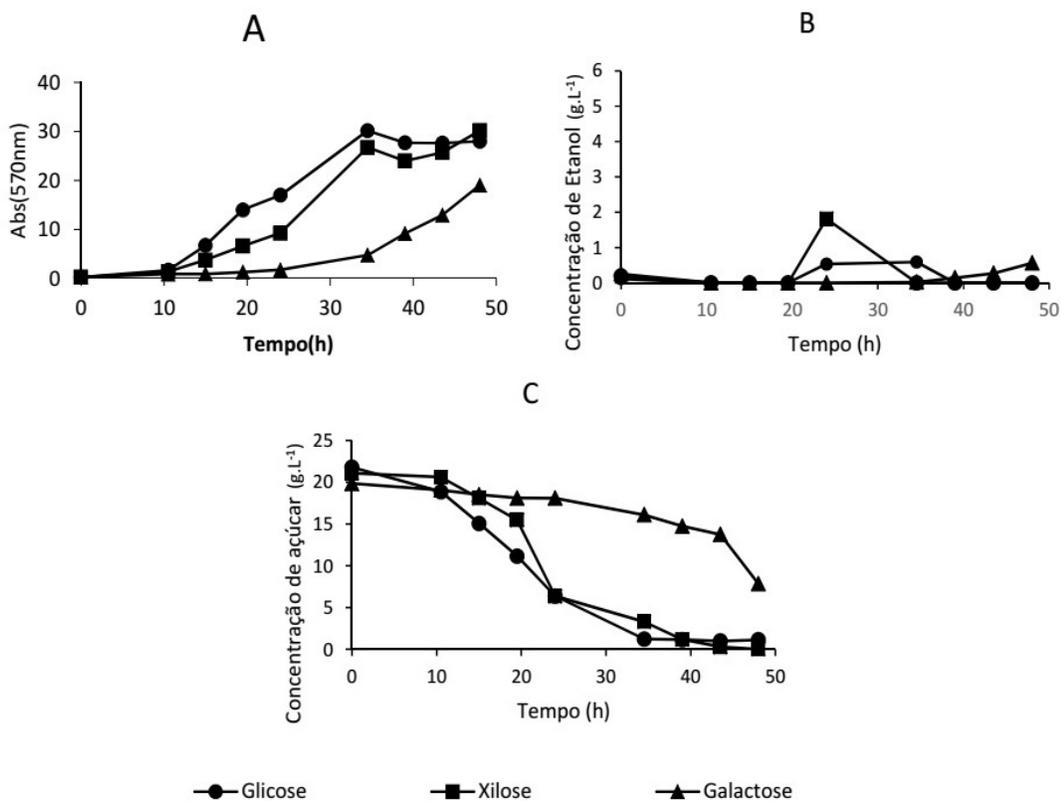


Figura 2 - Crescimento celular (A), produção de etanol (B) e consumo de açúcar (C) da linhagem CHAP-047

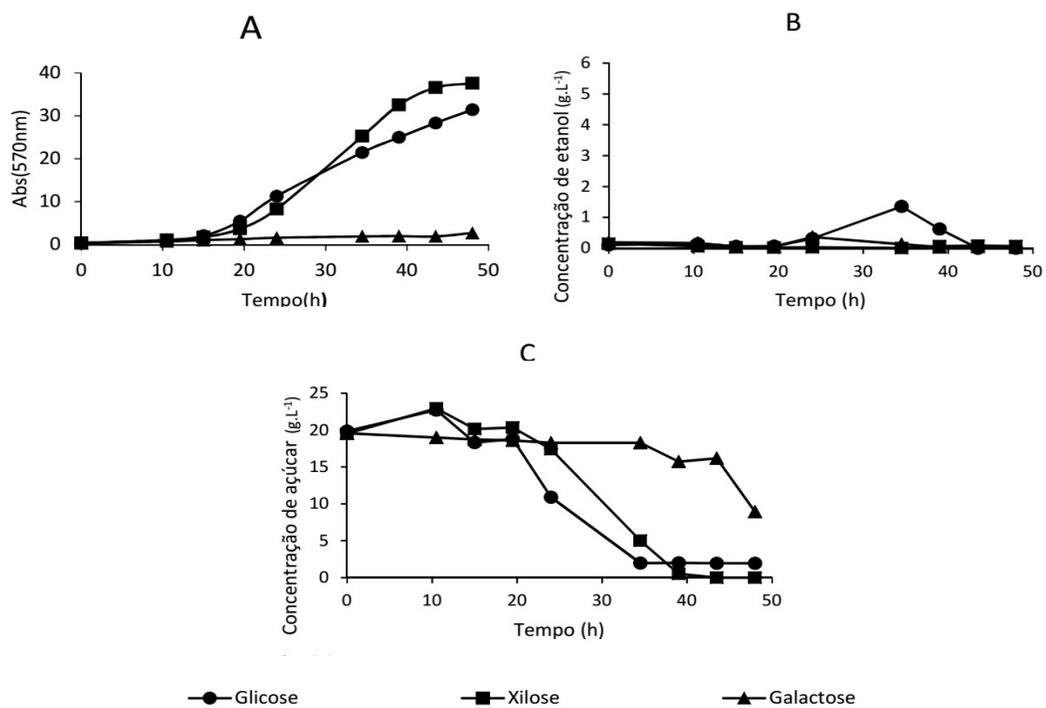


Figura 3 - Crescimento celular (A), produção de etanol (B) e consumo de açúcar (C) da linhagem CHAP-070

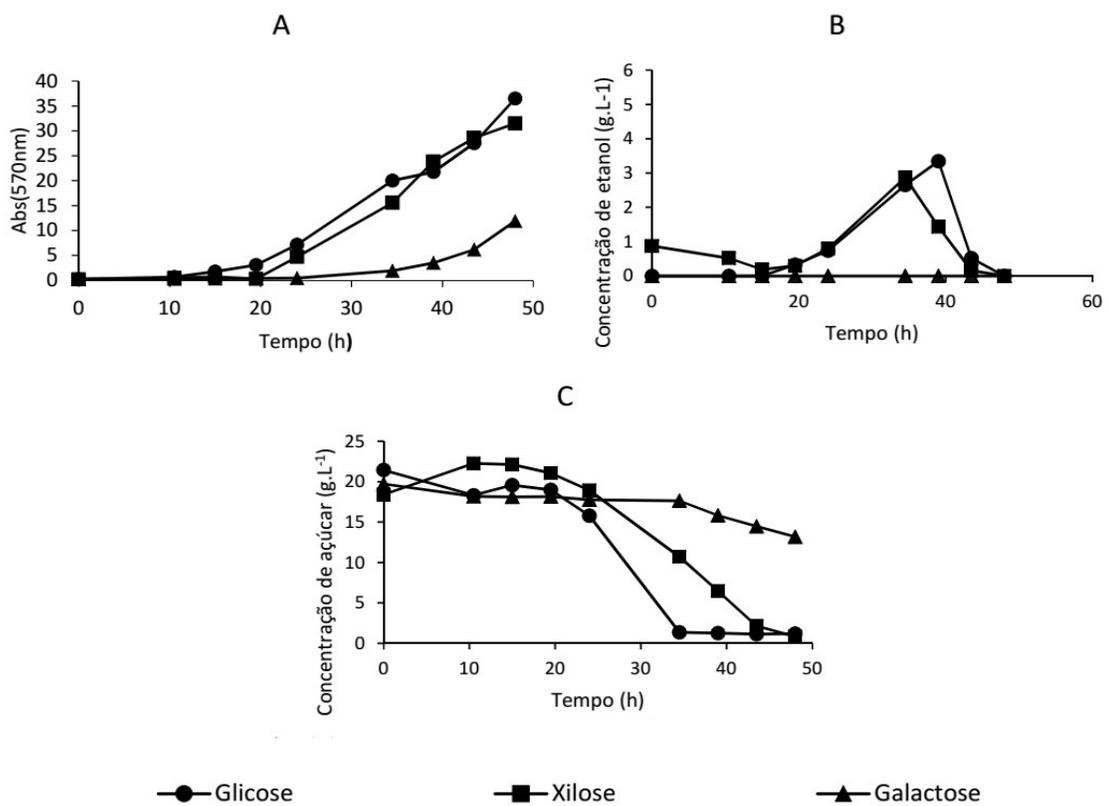


Figura 4 - Crescimento celular (A), produção de etanol (B) e consumo de açúcar (C) da linhagem CHAP-078

Como se pode observar através dos gráficos de crescimento das leveduras isoladas de laranjas em decomposição apresentados nas Figuras 2A, 3A e 4A, somente a CHAP-070, inoculada em meio de galactose, não apresentou crescimento dentro do período de 48 horas. No entanto, ao observar o gráfico que apresenta o consumo de açúcar por esta linhagem (Figura 2C), verifica-se que ao final do período de incubação, a CHAP-070 inicia o processo de metabolização da galactose presente no meio, indicando assim, o que poderia vir a ser o início de sua reprodução.

Verificou-se que todas as linhagens cultivadas em meios com galactose tiveram o início do consumo deste açúcar retardado. Dessa forma, embora não haja dados de crescimento celular e consumo de açúcar após o período de 48 horas, pode-se inferir que em meios contendo galactose, as leveduras prefeririam a respiração do que a fermentação, devido à baixa velocidade de consumo deste açúcar, não sendo, portanto, aplicáveis para a produção de etanol a partir deste carboidrato.

Devido a preferência das leveduras pela glicose, como apresentado por Silveira (2013), todas as linhagens estudadas apresentaram crescimento em meio composto por este carboidrato. Desta forma, mesmo que as leveduras não fossem capazes de se desenvolver nos meios contendo galactose ou xilose, esperou-se que seriam capazes de se reproduzir num meio contendo o carboidrato glicose, e caso isso não ocorresse, indicaria algum erro durante a realização dos experimentos. Com isso, através dos gráficos apresentados nas Figuras 2A, 3A e 4A, observa-se uma tendência de as leveduras crescerem em glicose mais rapidamente do que nas outras fontes de carbono, já que os crescimentos celulares das três linhagens de leveduras da microbiota local, efetuados em meios contendo xilose, ocorreram em menores velocidades do que nos meios contendo glicose, em consonância com o observado por Deoti e Alves (2014). No entanto, apesar de apresentarem velocidades de crescimento diferentes para os dois meios, os pontos que apresentaram o maior volume de biomassa para os dois açúcares são próximos, confirmando os resultados apresentados por Mouro (2012). No que diz respeito a linhagem CHAP-070, observa-se a maior concentração de biomassa em meio com xilose.

Diferentemente dos resultados obtidos nos estudos realizados por Deoti e Alves (2014) e Mouro (2012), onde a maioria das linhagens de leveduras analisadas apresentaram altas velocidades de consumo dos açúcares xilose e glicose, tendo, em períodos de aproximadamente 24 horas, redução da concentração desses carboidratos a níveis mínimos, observou-se para as três linhagens estudadas, reduzidas velocidades de consumo de xilose e glicose, levando cerca de 40 horas para chegar nos níveis mínimos desses carboidratos.

Em termos de produção de etanol, verificado através das Figuras 2B, 3B e 4B, observa-se que a linhagem CHAP-078 obteve maior destaque, apresentando a maior concentração de etanol produzido no meio contendo glicose, seguido do meio composto de xilose, sendo essas concentrações $3,34 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,87 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Por meio dessas figuras, pode-se verificar também que não houve fermentação efetiva nos meios contendo galactose, sendo a maior concentração observada para este açúcar na linhagem CHAP-047, correspondente a $0,55 \text{ g.L}^{-1}$.

Na Figura 5, estão apresentados os dados de crescimento celular (5A) e produção de etanol (5B) apresentados pela levedura CAT-1, linhagem de *S. cerevisiae* utilizada em algumas usinas sucroalcooleiras do Brasil (BASSO *et al.*, 2008).

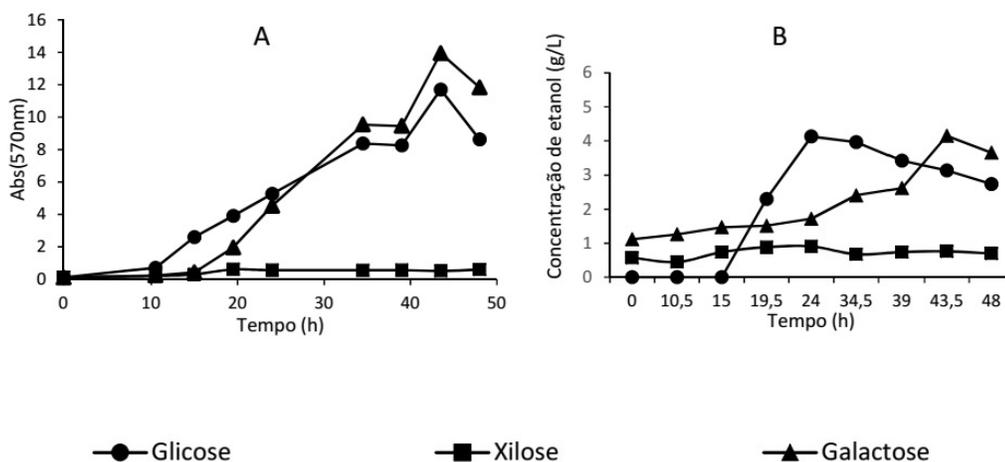


Figura 5 - Crescimento celular (A), produção de etanol (B) da linhagem industrial CAT-01

Através da Figura 5B, podemos observar que quando se submete a levedura *Saccharomyces cerevisiae* às mesmas condições das outras três linhagens estudadas neste trabalho, isoladas de laranjas em decomposição, obtém-se nos meios contendo glicose e galactose a maior produção de etanol entre todas as linhagens analisadas, correspondendo, no valor máximo de produção, a concentração de 4,13 g.L⁻¹ e 4,15 g.L⁻¹, respectivamente. Entretanto, ao submeter a CAT-01 ao meio contendo o carboidrato xilose, verifica-se que não há nenhuma produção de etanol, fato que pode ser melhor compreendido quando observado o gráfico que apresenta o crescimento celular da linhagem CAT-01 na Figura 5A, que se mostra praticamente nulo.

Ao comparar as três linhagens extraídas da microbiota local com a linhagem industrial, pode-se perceber que a *Saccharomyces cerevisiae* é mais eficiente na produção de etanol em meios contendo glicose e galactose. No entanto, destaca-se o fato de identificar, na linhagem CHAP-078 uma levedura capaz de se desenvolver e metabolizar uma quantidade significativa de açúcar em meios contendo xilose, sendo, dessa forma, mais eficiente que a industrial quando analisado este meio em específico.

CONCLUSÃO

O estudo buscou encontrar alternativas para a produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa rica em pectina. Tendo em vista que a quantidade de rejeito da produção de sucos cítricos é bastante expressiva, o estudo propôs encontrar, na microbiota local, leveduras capazes de fermentar os açúcares xilose e galactose, componentes da pectina, estrutura abundante nesse material.

Os resultados indicam que duas das leveduras isoladas a partir de laranjas em decomposição, das linhagens CHAP-047 e CHAP-078, podem ser uma opção viável em termos de produção de etanol, tendo em vista que são capazes de fermentar em meios contendo xilose, feito que a *Saccharomyces cerevisiae*, levedura atualmente utilizada pela indústria, não é capaz de realizar.

Haja vista que esse estudo apresentou três linhagens de leveduras isoladas de laranjas em decomposição e obteve dados expressivos de fermentação em duas cepas nos meios contendo xilose, o método utilizado apresenta potencial para identificação de outras leveduras com potencial fermentativo diante dos açúcares que compõe a pectina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSO LC, AMORIM HV, DE OLIVEIRA AJ, LOPES ML. **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil**. 2008. Disponível em: <<http://www.lcb.esalq.usp.br/publications/articles/2008/2008femsyrv8n7p1155-1163.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 16.

BERTELLI, L. L. **A verdadeira história do Proálcool**. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/proalcool/historia/proalcool-historia-verdadeira.htm>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

DEOTI, Junior Romeo; ALVES JÚNIOR, Sérgio Luiz. **HIDRÓLISE DE XILANA E METABOLIZAÇÃO DE XILOSE POR LEVEDURAS ISOLADAS DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM DECOMPOSIÇÃO**. 2014. 18 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2014.

EDWARDS, Meredith e DORAN-PETERSON, Joy. **Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production**. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396330/>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

FAVELA-TORRES E. et al. Pectinases. In: **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech publisher; p. 273–296. 2005.

FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T. Pectic enzymes. In: **Microbial enzymes in biotechnology**. Applied Science. 1983.

GORDINHO M. C.; **Do álcool ao etanol: Trajetória única**. - São Paulo - SP : Terceiro Nome, 2010.

GROHMANN, K; CAMERON, R.g.; BUSLIG, B.s.. **Fermentation of sugars in orange peel hydrolysates to ethanol by recombinant Escherichia coli KO11**. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7668848>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

MEREDITH, Edwards; JOY, Doran-peterson. **Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production**. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396330/>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31, p.426-429, 1959. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

MOHNEN, Debra. **Pectin structure and biosynthesis**. 2008. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/5363057>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

MOURO, A. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/100622>>. Acesso em: 17 nov. 16.

PASSOS, Daniel Sampaio. **BIOCOMBUSTÍVEIS: ESTRATÉGIA DE LONGO PRAZO DO BRASIL E A BARREIRA DA CONCORRÊNCIA INTERNACIONAL**. 2009. Disponível em: <[https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/9229/1/Monografia versão DEFINITIVA - BIOCOMBUSTÍVEIS.pdf](https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/9229/1/Monografia%20vers%C3%A3o%20DEFINITIVA%20-%20BIOCOMBUST%C3%8EDVEIS.pdf)>. Acesso em: 21 jun. 2016.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **World Fuel Ethanol Production**. Site: <<http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. **Proposições para Valorização de Resíduos do Processamento do Suco de Laranja**. 2009. Disponível em: <[http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/6a/4/K.Rezzadori - Resumo Exp - 6A-4.pdf](http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/6a/4/K.Rezzadori-Resumo%20Exp-6A-4.pdf)>. Acesso em: 21 jun. 2016.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRES, P.; CONVERTI, A.; DOMINGUÉX, J.M., 2008. **Submerged Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate**, Journal of Agricultural and Food Chemistry.56.
RODIONOV, Y.V.; KEPPEN, O.I.; SUKHACHEVA, M.V. A Photometric Assay for Ethanol. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v.38, p.395-396, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1016203710316>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

SALGADO, A.M. et al. Colorimetric method for the determination of ethanol by Flow Injection Analysis. **Biotechnology Letters**. v.22, p.327-330, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1005651205723>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

SANTI, Lucélia; BERGER, Markus; SILVA, Walter Orlando Beys da. **PECTINASES E PECTINA: APLICAÇÃO COMERCIAL E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**. 2014. Disponível em: <<http://www.univates.br/revistas/index.php/cadped/article/viewFile/1012/566>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

SANTOS, Angela Alves dos; ALVES JÚNIOR, Sérgio Luiz. **METABOLIZAÇÃO DA CELOBIOSE POR LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM DECOMPOSIÇÃO**. 2014. 20 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2014.

SEYFRIED, M. et al. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 201-214, Mar. 2016. disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722016000100201&lng=en&nrm=iso>.

Acesso em: 08 Dec. 2016.

SILVA, L.F., TACIRO, M.K., RAICHER, G., PICOLLI, R.A., MENDONÇA, T.T., LOPES, M.S., GOMEZ, J.G., 2014. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **Int J Biol Macromol.** 71, 2-7.

SILVEIRA, Erick de Abreu; ERNANDES, José Roberto. **Caracterização bioquímica de leveduras industriais produtoras de etanol cultivadas em diferentes açúcares.** 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia., Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

STAMBUK, B.U. *et al.* Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of scientific and industrial research.** v. 67, p.918-926, 2008. Disponível em: <[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2420/1/JSIR%2067\(11\)%20918-926.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2420/1/JSIR%2067(11)%20918-926.pdf)>. Acesso em: 21 jun. 2016.

USDA. United States Department of Agriculture. **Citrus: World markets and Trade (2016).** Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 17 nov. 16

USHER, J.; BALDERAS-HERNANDEZ, V.; QUON, P.; GOLD, N.D.; MARTIN, V.J.; MAHADEVAN, R.; BAETZ, K. Chemical and Synthetic Genetic Array Analysis Identifies Genes that Suppress Xylose Utilization and Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **G3**, v. 1(4), p. 247-258, 2011.

VAN MARIS, Antonius J. A. *et al.* **Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status.** 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/6761196_Alcoholic_fermentation_of_carbon_sources_in_biomass_hydrolysates_by_Saccharomyces_cerevisiae_Current_status>. Acesso em: 17 nov. 16.

ZANELLA, K. **Extração da pectina da casca da laranja-pera (*Citrus sinensis* L. osbeck) com solução diluída de ácido cítrico.** 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2013.