

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS CAPAZES DE UTILIZAR O
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO COMO FONTE DE CARBONO.**

LUCIANA ARAUJO CASSA-BARBOSA

MANAUS

2012

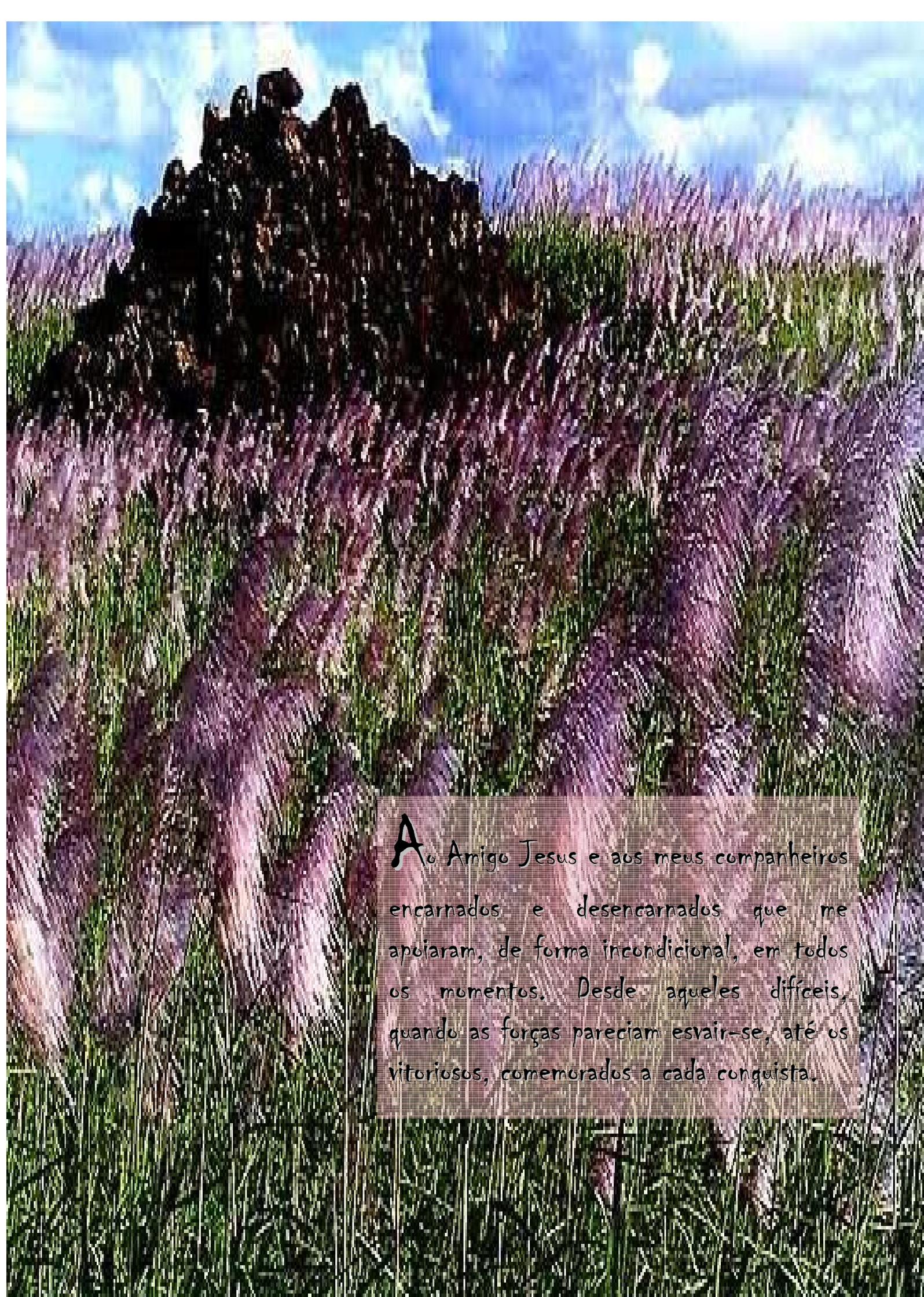
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUCIANA ARAUJO CASSA-BARBOSA

**Isolamento e Caracterização de Leveduras Capazes de Utilizar o
Hidrolisado Hemicelulósico como Fonte de Carbono.**

Documento apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do grau de
Doutor.

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi-Filho
Manaus
2012



Ao Amigo Jesus e aos meus companheiros encarnados e desencarnados que me apoiaram, de forma incondicional, em todos os momentos. Desde aqueles difíceis, quando as forças pareciam esvair-se, até os vitoriosos, comemorados a cada conquista.

Agradecimentos

A Deus, Criador Perfeito, Responsável por tudo;

Ao meu esposo amado, Enio Herculano Barbosa, pelo amparo constante, manutenção do amor e da harmonia em nosso lar, paciência com minhas ausências durante as vigílias no laboratório, e pelo dom de me acalmar, sempre que necessário;

Ao meu pai tão querido, Imar César de Araujo, por me fazer conhecer quanto amor sou capaz de guardar em meu coração e pela figura masculina presente em minha vida;

À minha amada e guerreira mãe, Eloína de Siqueira Cassa Araújo, pela doação de sua vida em meu favor, por ser quase *onipresente*, mesmo em minha vida adulta, bem como pelos incansáveis exemplos de superação que surgiram em minha mente sempre que pensei em desistir;

Aos meus irmãos Gustavo Cassa de Araújo e Cláudia Cassa de Araújo Brandão, pelo apoio de sempre, e por trazerem amparo e solidez à nossa família;

Ao meu sobrinho lindo, Paulo César de Araújo Brandão, por iluminar minha vida com sua alegre presença;

Aos meus cunhados Paulo Eduardo Brandão e Amanda Bentes Araújo, por completarem nossa família em clima de paz e harmonia;

A toda família Barbosa, pelo apoio e pelas reuniões fraternas e aconchegantes, que sempre me ajudaram com a convivência harmoniosa. Um agradecimento em especial à minha sogra, Maria Herculano Barbosa, pela presença, apoio, e nos últimos anos, pelo heroico exemplo de luta pela vida;

Ao meu primo do coração, José Paulo de Azevedo Macedo, por compartilhar tantos momentos comigo, pelas confidências, apoio do parente e vizinho, pelo período acadêmico que vivenciamos juntos, embora em áreas diferentes, e pela presença amiga de sempre;

Às minhas tias do coração: Jô, Edda e Vera, por estarem presentes mesmo na ausência, pela “torcida organizada”, e por fazerem parte de minha formação moral;

À minha amada Casa Bendita, Fundação Allan Kardec, por tudo que me proporcionou: amadurecimento, autoconhecimento, equilíbrio psicológico e espiritual e amparo incondicional. Por ter me aproximado de Jesus, O Amigo Fiel, e pela oportunidade bendita do trabalho no bem, única terapia que me possibilitou a solução e equilíbrio dos entraves íntimos;

Aos meus companheiros de Ideal Espírita, pelo amparo nos momentos difíceis e pela convivência fraterna que me alimentam e fortalecem a alma todos os dias, por serem extensão de minha família e rechearem meu coração com aquele amor verdadeiro, que nunca morre, apenas cresce;

Às minhas imortais amigas Josiley Azevedo Rocha Amorim e Themis de Jesus da Silva, por tudo que compartilhamos desde o primeiro período da graduação até os desafios da vida adulta. Ao amor que nos une, o qual o tempo nunca poderá apagar;

À minha amiga-irmã Lucivana Prata de Sousa Mourão, por dividir comigo os obstáculos que um cristão encontra no mundo científico, pelos anos de convivência fraterna desde os primeiros períodos na graduação, ao compartilhamento da arte de lecionar;

À minha amiga Doriane Picanço Rodrigues, por tudo que já compartilhamos no decorrer da vida acadêmica, em especial pelos momentos difíceis do mestrado fora de nossa sede;

Aos professores e companheiros do Centro Universitário do Norte, que compartilharam comigo boa parte de minha vida profissional, pela companhia agradável. Guardo com saudades o período no qual convivemos;

À minha *Mammy* Rozana de Medeiros Souza Galvão, pela presença orientadora e amiga, de tantos anos de convivência;

Ao meu amigo-irmão Pedro Queiroz da Costa Neto, pela ajuda com o mundo dos fungos, por compartilhar comigo aquele amor sublime que os irmãos podem sentir uns pelos outros;

Aos companheiros e novos amigos do Centro de Biotecnologia da Amazônia, pelo amparo e acolhimento no momento em que me deparei com ambiente completamente desconhecido. Em especial ao meu anjinho, Flávia Rafaella Farias, pela convivência harmoniosa diária, que me nutriu de equilíbrio e força moral. Às companheiras Ingrid Reis e Andressa Primavera pela convivência, aos doutores Rudi Emerson de Lima Procópio e Mayra Kassawara pelo apoio. Aos colegas Augusto, Victor Rafael, Diego Billby e Sabrina Kelly Reis de Moraes pela paciência e apoio na parte técnico-analítica;

Ao companheiro Carlos Gustavo Nunes da Silva, pela identificação dos insetos imaturos. À querida Ágata Cristiane Huppert Giancoli, pela companhia no Laboratório de Genética da UFAM e pelas fotografias de microscopia eletrônica. Ao companheiro de trabalho com hidrolisado hemicelulósico, Italo Matos, pela convivência em torno do assunto, e pelas leveduras compartilhadas durante os nossos trabalhos;

À Escola Agrotécnica de Manaus pela agilidade com que atenderam ao pedido de coleta, bem como pela recepção e atenção dispensadas durante a mesma;

Aos companheiros da Universidade Federal do Amazonas, principalmente os que compartilharam as disciplinas comigo, pela convivência divertida, mesmo nos momentos mais estressantes;

Ao meu imortal orientador, José Odair Pereira, por permanecer presente em minha vida acadêmica, mesmo sem o dever formal;

Ao meu orientador Spartaco Astolfi Filho, por me encaminhar no mundo científico desde que completei a graduação. Pela humildade em lidar com minhas dificuldades e pela nobreza perante minhas qualidades;

À “mãe” UFAM, responsável por praticamente toda a minha formação acadêmica, ao Centro de Biotecnologia da Amazônia pelo período em que lá trabalhei como colaboradora, e a CAPES pelo auxílio financeiro.



Procurai primeiro o Reino e a justiça de Deus, e tudo isso vos será dado por acréscimo. Não vos preocupeis, portanto, com o dia de amanhã: o dia de amanhã se preocupará consigo mesmo. A cada dia basta o seu mal.

Mateus, 6:33,34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: As três frações majoritárias da biomassa lignocelulósica. _____	15
Figura 2: Série histórica de geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil. _____	17
Figura 3: Formas de integração das etapas de bioconversão da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Mills et al, 2009. CBP: Bioprocesso consolidado; CF: Co-fermentação; SSCF: Fermentação e sacarificação simultâneas à co-fermentação; SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas. _____	23
Figura 4: Tecnologias para produção de xilitol _____	28
Figura 5: Regiões do RNA ribossomal, indicando a porção transcrita e as três moléculas de RNAr maduras formadas. Extraído de Korabecna, 2007. _____	35
Figura 6: Larva da família Cerambycidae (A); Larvas da família Scarabaeidae (B); Tubo digestivo de larva da família Cerambycidae íntegro (C) e com cortes transversais(D); Tubo digestivo de larva da família Scarabaeidae, trato íntegro com indicações do corte em quatro porções (E). Na figura dos tubos digestivos a extremidade esquerda representa porção proximal (boca) e a direita a porção distal (ânus). _____	44
Figura 7: Bovinos Girolanda na Escola Agrotécnica de Manaus (A); Coleta de fezes do solo. À esquerda o bolo fecal, à direita a raspagem da superfície com exposição do interior. A coleta foi realizada na região mais clara (B); Coleta de fezes do reto do animal (C); Coleta de material da saliva de Bovinos. À esquerda o animal imobilizado, à direita a coleta com swab (D). _____	47
Figura 8: Esquema simplificado da metodologia para isolamento de microrganismo do tubo digestivo de insetos imaturos (A); fezes (B); e saliva (C). _____	48
Figura 9: Prova de assimilação de açúcares: Exemplo de Placa Matriz com 48h de incubação. _____	49
Figura 10: Placas de isolamento das diversas fontes biológicas _____	52
Figura 11: Exemplo de leveduras isoladas, observadas em microscópio óptico com aumento de 400x. _____	53
Figura 12: Microscopia eletrônica de uma cepa isolada de inseto imaturo (L04P1C29R46a). _____	54
Figura 13: Prova de assimilação de açúcares. A: glicose; B: Arabinose; C: Xilose; D: Hidrolisado hemicelulósico; E: Controle negativo (somente fonte de nitrogênio) _____	56
Figura 14: Exemplo de gel com amplificação das sequências de DNA ribossomal. _____	59
Figura 15: Árvore filogenética contendo as sequências das leveduras isoladas em meio hidrolisado e selecionadas nos ensaios de assimilação. _____	60
Figura 16: Frasco com rolha de poliuretano para livre transferência de oxigênio (de forma padronizada), contendo mangueira para coleta de amostras (A); Coleta da amostra utilizando seringa esterilizada (B). _____	71
Figura 17: Produção de biomassa e consumo de xilose pelas leveduras selecionadas nos ensaios de assimilação e fermentação de açúcares. Linhas contínuas representam produção de biomassa e linhas pontilhadas representam consumo de xilose. _____	78
Figura 18: Influência do extrato de leveduras na produção de biomassa por FB07C04R0a. Gráfico de superfície de resposta com a variável extrato de levedura e ureia (A), extrato de leveduras e pH (B). _____	80
Figura 19: Superfície de resposta tridimensional mostrando a influência do pH e ureia na produção de biomassa por FB07C04R0a em meio hidrolisado hemicelulósico. _____	81
Figura 20: Influência do pH e da ureia no consumo de xilose por FB07C04R0a. Valores em porcentagem de consumo. _____	81
Figura 21: Efeito da concentração do hidrolisado hemicelulósico e da concentração de xilose na produção de biomassa por FB07C04R0a. Gráfico de contorno (A) superfície de resposta (B) _____	84
Figura 22: Influência da temperatura na produção de biomassa por FB07C04R0a em meio contendo 80% do hidrolisado hemicelulósico e 30g/L de xilose. As temperaturas ensaiadas foram 30°C e 35°C _____	86
Figura 23: Produção de biomassa e consumo de xilose por FB07C04R0a em meio hidrolisado. Fermentação em batelada simples utilizando fermentador instrumentado BIOFLO110. _____	87
Figura 24: Evolução de CO ₂ em cultivos com transferência de oxigênio limitada, em frascos cônicos lacrados com fermentômetros, utilizando meio hidrolisado hemicelulósico. _____	93
Figura 25: Cromatogramas exibindo picos referentes à pentose (xilose) e ao poliálcool xilitol. A: picos distintos possibilitando quantificação; B: picos geminados indicando duas substâncias diferentes. _____	94
Figura 26: Placa cromatográfica, sob luz ultravioleta (366nm) com amostras de xilose e xilitol formando bandas com diferentes fatores de migração. O meio de cultura utilizado foi sintético, contendo apenas xilose como fonte de carbono. _____	95
Figura 27: Análise das amostras contendo xilitol em scanner com luz ultravioleta. A: Leitura tridimensional das amostras. Os picos maiores representam diferentes concentrações da amostra padrão. B: Incidência de _____	

diferentes comprimentos de onda nas bandas contendo xilitol. A linha superior (vermelha) representa amostra padrão. _____ 96

Figura 28: Biomassa microbiana de três diferentes leveduras após a centrifugação, demonstrando mucilagem menos densa, com pigmentações diferentes, bem como mucilagem sem pigmentação. O cultivo foi realizado em meio contendo hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono. _____ 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de alguns materiais lignocelulósicos.....	16
Tabela 2: Empresas que empregam tecnologia de hidrólise da biomassa vegetal e bioconversão a etanol.....	25
Tabela 3: Número de colônias de leveduras isoladas de acordo com o perfil de assimilação de diferentes fontes de carbono.....	55
Tabela 4: Número de colônias selecionadas e sequenciadas classificadas de acordo com a fonte de isolamento e a espécie mais próxima no alinhamento das sequências.	59
Tabela 5: Variáveis e níveis do primeiro planejamento experimental para produção de biomassa.....	72
Tabela 6: Planejamento composto central em valores não codificados para o primeiro planejamento experimental para produção de biomassa. Os ensaios 1 a 8 correspondentes aos pontos fatoriais, 9 a 14 aos pontos axiais, 15 a 20 às repetições do ponto central	73
Tabela 7: Variáveis e níveis do segundo planejamento experimental para produção de biomassa.....	74
Tabela 8: Planejamento composto central em valores não codificados para o primeiro planejamento experimental para produção de biomassa. Os ensaios 1 a 4 correspondentes aos pontos fatoriais, 5 a 8 aos pontos axiais, 9 a 13 às repetições do ponto central.	75
Tabela 9: Parâmetros cinéticos calculados para as fermentações em frascos cônicos e em fermentador instrumentado.	77

SUMÁRIO

RESUMO	12
1-REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 – O uso da biomassa lignocelulósica	15
1.2 – Biorefinaria e bioconversão de hemicelulose	25
1.2.1– Produção de xilitol	27
1.2.2 – Produção de etanol a partir de xilose	29
1.2.3– Produção de xilanases	30
1.2.4 – Produção de biomassa microbiana a partir de resíduos	31
1.3 – Técnicas moleculares de identificação de leveduras	34
2-OBJETIVOS	39
3- ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS CAPAZES DE UTILIZAR O HIDROLISADO HEMICELULÓSICO COMO FONTE DE CARBONO	41
3.1 – Introdução	41
3.2 – Material e Métodos	43
3.2.1 - Isolamento de Microrganismos	43
3.2.1.1 - Microrganismos associados a insetos imaturos	43
3.2.1.2 - Microrganismos de fezes de gado bovino	45
3.2.1.3 - Microrganismos da saliva de bovinos	45
3.2.2 – Estoque e confecção do banco de células que utilizam o hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono	45
3.2.3 – Observação microscópica das células	46
3.2.4 - Viabilidade no hidrolisado hemicelulósico	46
3.2.5 - Prova da assimilação de açúcares	46
3.2.6 - Identificação molecular	50
3.3 – Resultados e Discussão	51
3.3.1 - Isolamento de microrganismos	51
3.3.2 – Viabilidade no hidrolisado hemicelulósico	51
3.3.3 - Prova de assimilação de açúcares	55
3.3.4 - Identificação molecular	57
3.4 – Conclusão	62
4 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA A PARTIR DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	65
4.1 - Introdução	65
4.2 – Material e métodos	69
4.2.1 – Seleção da levedura para produção de biomassa	69
4.2.1.1 – Adaptação das células ao meio hidrolisado hemicelulósico	69
4.2.1.2 – Curva de crescimento em meio hidrolisado hemicelulósico	70
4.2.2 – Otimização da produção de biomassa	71
4.2.2.1. – Influência do pH inicial, ureia e extrato de leveduras	71
4.2.2.2 – Influência das concentrações de hidrolisado hemicelulósico e xilose	74
4.2.2.3 – Ensaio para definição da temperatura	75
4.2.3 – Ensaio em fermentador para produção de biomassa	76
4.2.4 – Parâmetros cinéticos avaliados	76

4.3 – Resultados e Discussão	77
4.3.1 – Seleção da levedura para produção de biomassa	77
4.3.1.1 – Curva de crescimento em hidrolisado hemicelulósico	77
4.3.2 – Otimização da produção de biomassa	79
4.3.2.1 – Influência do pH inicial, ureia e extrato de leveduras	79
4.3.2.2 – Influência das concentrações de hidrolisado hemicelulósico e xilose	82
4.3.2.3 – Ensaio para definição da temperatura	85
4.3.3 – Ensaio em fermentador para produção de biomassa	85
4.4 – Conclusão	88
5 – POTENCIALIDADE BIOLÓGICA DAS LEVEDURAS ISOLADAS	90
5.1. – Produção de etanol celulósico	91
5.2 – Produção de xilitol	94
5.3 – Produção de pigmentos	97
5.4 – Potencialidade para produção de aroma	98
6 – ANEXOS	100
6.1 – Soluções e meios de cultura	100
6.1.1 – Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar	100
6.1.2 – Soluções	100
6.1.2.1 – Solução nitrogenada enriquecida	100
6.1.2.2 – Solução de sais e ácido cítrico	100
6.1.2.3 – Tampão H	101
6.1.2.4 – Mix para PCR	101
6.1.3 – Meios de cultura.	101
6.1.3.1 – Meio hidrolisado hemicelulósico para o isolamento de leveduras	101
6.1.3.2 – Meio hidrolisado hemicelulósico para ensaios fermentativos	101
6.1.3.3 – Meio para ensaios de assimilação	101
6.1.3.4 – Meios sintético fermentativo	101
6.1.3.5 – Meio para manutenção das células	102
6.1.3.6 – Meio para reativação das células	102
6.2 – Metodologias	102
6.2.1 – Extração de DNA total (modificado de HARJU et al, 2004)	102
6.2.2 – PCR	103
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

RESUMO

Os resíduos agroindustriais são fontes renováveis de carbono e energia e podem ser utilizados para produção de alimentos, forragens, compostos químicos, além de combustíveis líquidos. O Brasil gera diversos resíduos agroindustriais, entre eles, o bagaço de cana-de-açúcar é o mais abundante. Esta biomassa lignocelulósica é rica em carboidratos metabolizáveis de forma economicamente viável, desde que haja hidrólise adequada do material. A hidrólise desarranja as fibras dos três polímeros majoritários da biomassa vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), tornando-as mais acessíveis às enzimas hidrolíticas microbianas. Este processo, além de liberar os monômeros e pequenos sacarídeos fermentáveis, gera inibidores do crescimento microbiano e da fermentação do material hidrolisado. Os monômeros gerados pela hidrólise da fração hemicelulósica não são compostos apenas de glicose, como os substratos amiláceos e celulósicos. Eles contêm, entre outros, vasta concentração de pentoses que não são metabolizadas por todos os microrganismos. Objetivando obter leveduras com atributos necessários ao aproveitamento da biomassa, com ênfase na fração hemicelulósica, investigaram-se as seguintes fontes ricas em hidrolisados naturais: fezes e salivas de ruminantes (bovinos), como também tubos digestivos de insetos imaturos que se alimentam de madeira. Os meios de cultura utilizados para isolamento e cultivo (sólidos e líquidos) foram confeccionados com hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana-de-açúcar, obtido por hidrólise ácida. Os microrganismos isolados foram selecionados com base em suas características de utilização das pentoses xilose (majoritária na hemicelulose) e arabinose, visando o melhor aproveitamento da biomassa lignocelulósica. Foram isoladas 237 colônias de microrganismos unicelulares, em meio seletivo. Destas, 231 colônias foram submetidas aos ensaios de assimilação de açúcares, entre as quais 125 foram capazes de crescer utilizando hidrolisado hemicelulósico, xilose ou arabinose como fonte de carbono. Destacaram-se, quanto ao crescimento em tamanho, 57

colônias que foram selecionadas e tiveram a região ITS1 – 5.8S rDNA sequenciada. Após seleção para acúmulo em biomassa, uma levedura sequenciada foi escolhida e investigada, através de métodos de superfície de resposta para otimização da produção de biomassa microbiana a partir do hidrolisado hemicelulósico. As cepas sequenciadas formaram 05 grupos distintos na árvore filogenética e tiveram alta similaridade com *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondi*, *Trichosporon micotoxinivorans*, *Trichosporon loubieri*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida lignohabitans* e *Candida etanolica*. Uma cepa com 99% de similaridade com *Meyerozyma caribbica*, isolada a partir de fezes de bovinos, acumulou 14,21g/L de biomassa em 72h, em cultivo tipo batelada simples (utilizando fermentador instrumentado), sendo capaz de tolerar até 90% de hidrolisado hemicelulósico com acúmulo de biomassa seca em torno de 12,43g/L, ($Q_x = 0,44\text{g/L}^{-1}\text{h}^{-1}$), após 27 horas de cultivo, em experimentos com frascos cônicos. Esta levedura produziu 14,8g/L de xilitol ($Q_{xilt}=0,55\text{ g/L}^{-1}\text{h}^{-1}$) em 27 horas de cultivo.



Revisão
de
Literatura

1-REVISÃO DE LITERATURA

1.1 – O uso da biomassa lignocelulósica

Celulose, hemicelulose e lignina correspondem de 97 a 99% da massa seca da biomassa vegetal. A celulose é homopolímero de glicose encontrando-se envolvido pela lignina, heteropolímero aromático. A hemicelulose, elo químico entre celulose e lignina, (**Figura 1**) é um heteropolissacarídeo constituído principalmente de pentoses (xilose, arabinose e raminose), como também de hexoses (glicose, manose, galactose), ácidos urônicos e radicais acetilas. De forma geral, a celulose encontra-se em maiores proporções, seguida da hemicelulose e lignina, mas, a composição química dessas frações lignocelulósicas difere entre os diversos tipos de biomassa (**Tabela 1**) (CASTRO E PEREIRA Jr, 2010).

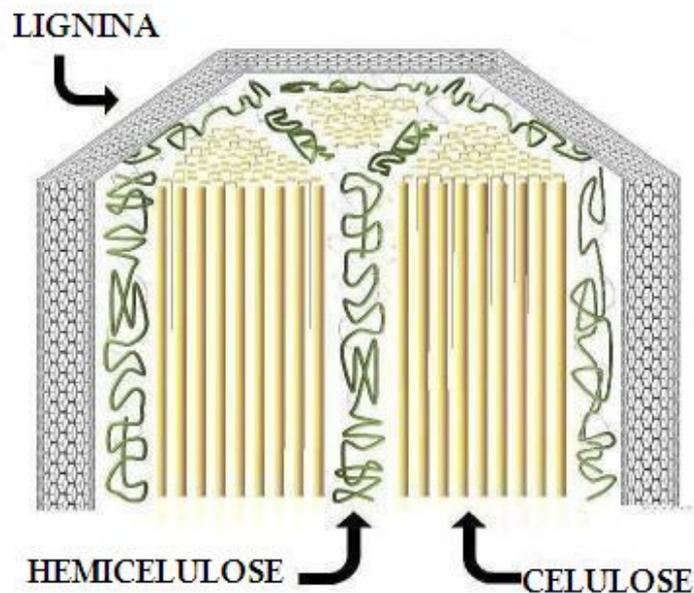


Figura 1: As três frações majoritárias da biomassa lignocelulósica.
Fonte: modificado de Mills et al, 2009

Tabela 1: Composição de alguns materiais lignocelulósicos

Material	Composição (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Bagaço de cana (<i>Saccharum officinarum</i>)	36	28	20
Palha de cana	36	21	16
Palha de milho (<i>Zea mays</i>)	36	28	29
Sabugo de milho	36	28	n.r
Palha de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	39	36	10
Palha de cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	44	27	7
Farelo de cevada	23	33	21
Palha de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	33	26	7
Casca de arroz	36	20	19
Palha de aveia	41	16	11
Palha de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	42	12	15
Casca de amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	38	36	16
Douglas fir (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	50	18	28
Pinheiro (<i>Pinus sp</i>)	44	26	29
Salgueiro (<i>Salix alba</i>)	37	23	21
Capim elefante (<i>Pennisetum purpureum</i>)	32	20	9
Resíduos sólidos municipais	33	9	17
Papel	43	13	6
Papelão	47	25	12
Jornal	62	16	21

Fonte: Castro e Pereira Jr, 2010.

n.r.:valores não descritos.

Os resíduos agroindustriais, fontes renováveis de carbono e energia, têm sido objeto de intensa pesquisa, para a produção de alimentos, forragens, químicos, além de combustíveis líquidos (VARGAS-BETANCUR E PEREIRA JR, 2010). O Brasil gera diversos resíduos agroindustriais. Entre estes, o bagaço de cana-de-açúcar é predominante. Em 1991 o Brasil gerou cerca de 80 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar, atingindo, em 2007, um total de 147 milhões de toneladas. O país também gera outros resíduos agroindustriais como palha de cana-de-açúcar, palha de soja, palha de arroz e sabugo de milho (**Figura 2**).

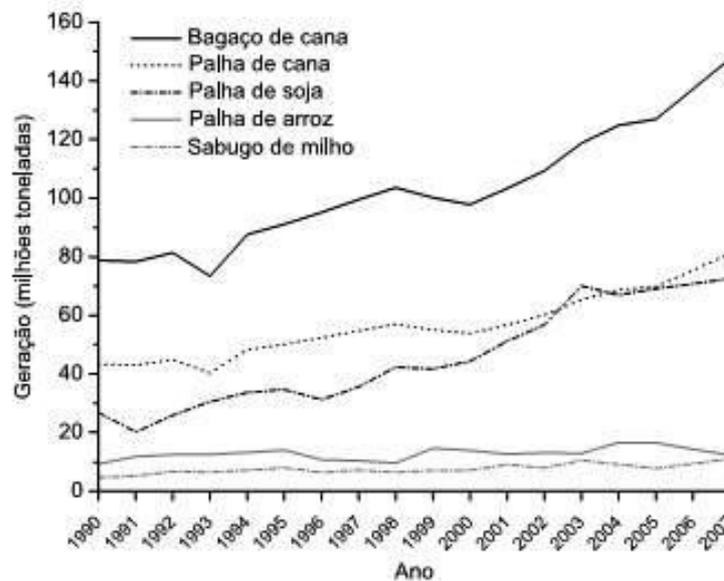


Figura 2: Série histórica de geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil.
Fonte: Castro e Pereira JR, 2010

Alguns resíduos são estocados em locais próximos ao sítio de processamento, outros permanecem no campo após a colheita. No caso das indústrias canavieiras o bagaço (cana-de-açúcar moída) é estocado e queimado para produção de energia elétrica. Estas indústrias normalmente são autossustentáveis neste sentido e algumas também exportam energia elétrica para comunidades vizinhas (PEREIRA JR, 2008). Pelo seu conteúdo de carboidratos, esta biomassa vegetal ainda pode ser aproveitada pelos microrganismos para bioconversão em produtos de interesse.

Teoricamente, qualquer material lignocelulósico pode ser utilizado para bioconversão em produtos que possuem interesse econômico, tanto pela grande demanda, quanto pelo alto valor agregado. Desta forma, vários estudos foram realizados buscando explorar diferentes fontes lignocelulósicas para realização de hidrólise da biomassa vegetal a fim de utilizá-las para bioconversão. Neste sentido, utilizando metodologia adequada às características individuais de cada material, vários estudos utilizaram resíduos gerados pelos processos agroindustriais predominantes em cada país: bagaço de cana-de-açúcar no Brasil (VARGAS BETANCUR e PEREIRA JR, 2010); sabugo e palha de milho nos Estados Unidos (SASSNER *et al*, 2008; HSU *et al*, 2011); gramíneas e lascas do tronco de coníferas na Suécia (SASSNER *et al*, 2008), palha de trigo em vários países da Europa (ERDEI *et al*, 2010); palha de arroz em Taiwan e em outros países da Ásia (HUANG *et al*, 2009, 2010; CHANG, 2011); plantas aquáticas na Índia (KUMAR *et al*, 2009); casca de soja, abacaxi e laranja, polpa de café e de caju em regiões de clima tropical (GROHMANN *et al*, 1995; CASSALES, 2011; SHENOY, 2011) e bagaço de *Agave tequilana*, gerado pela produção de tequila no México (SAUCEDO-LUNA, 2011). Também existem estudos que utilizam resíduos não usuais, como madeira resultante da demolição de casas no Japão, resíduo viável pela predominância deste tipo de habitação no país (OKUDA *et al*, 2007), bem como a

utilização de restos de paisagens urbanas, a exemplo de galhos e folhas resultantes das podas (SPRINGER, 2012).

Para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica, de forma economicamente viável, há necessidade de um processamento específico com vistas a desarranjar suas estruturas majoritárias (celulose, hemicelulose e lignina). A porção hemicelulósica, por ser menos resistente ao desarranjo, é separada do complexo lignocelulolítico na primeira etapa do processo (pré-tratamento). Sua liberação ocorre em forma líquida, rica em monômeros, oligômeros e fragmentos poliméricos, a depender do processo utilizado. A fração sólida resultante do pré-tratamento, consiste em celulose e lignina (celulignina), com suas fibras mais frouxas, facilitando o acesso ao ataque de enzimas (MILLS et al, 2009; LIU et al, 2011; PENG et al, 2011).

Existem diferentes tipos de tratamentos da biomassa vegetal, podendo ser de natureza física, química ou biológica, bem como associações entre os três tipos. Tratamentos físicos incluem auto-hidrólise (*steam explosion*), moagem, irradiação e aplicação de vapor. Os químicos consistem em tratamento com álcalis, ácidos, amônia e solventes orgânicos. Os biológicos, que oferecem importantes vantagens, referem-se ao uso de fungos para delignificação. O tipo de tratamento da biomassa dependerá do tipo de resíduo lignocelulósico e da viabilidade econômica do método. (CASTRO E PEREIRA JR, 2010; PENG et al, 2011).

Algumas condições utilizadas em pré-tratamentos não biológicos formam uma variedade de compostos tóxicos que inibem a formação de biomassa e processo fermentativo. Ácido acético é liberado pela decomposição da acetil xilana (um dos componentes da hemicelulose), ácido fórmico e ácido levulínico derivados da degradação de açúcares. Furanos são derivados da desidratação de pentoses (furfural) e de hexoses (5-hidroximetilfurfural – HMF). Compostos fenólicos são derivados da lignina. (MILLS et al, 2009; LEE et al, 2011; LIU et al, 2011).

Os níveis de acetato encontrados no hidrolisado dependem do tipo de material lignocelulósico e do tipo de pré-tratamento. As concentrações variam entre 1 a mais que 10g/L. Concentrações menores que 0,5g/L de ácido acético podem promover a inibição do crescimento microbiano em até 50%. O ácido fórmico é mais tóxico devido à sua extraordinária permeabilidade. Em sua forma associada, estes ácidos podem atravessar a membranas dissociando-se no interior da célula, liberando o próton e o ânion respectivo. Desta forma, funcionam como agentes desacopladores, desfazendo o potencial transmembrana sem formação concomitante de ATP. Os ânions também possuem efeito inibitório, pois o acúmulo no interior celular pode afetar a pressão de turgor. (MILLS et al, 2009).

Enquanto alguns autores dedicaram-se a processos de desintoxicação do hidrolisado (CHANDELA et al, 2007; LEE et al, 2011). Vargas Betancur e Pereira Jr (2010) otimizaram a hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar, obtendo maior concentração de xilose, maior rendimento de hidrólise e menor produção de inibidores (furfural, hidroximetilfurfural, compostos fenólicos e ácido acético). Os fatores ensaiados, através de um planejamento fatorial foram: tempo de exposição, concentração do ácido sulfúrico e razão sólido:líquido. O efeito linear da razão sólido:líquido foi a influência mais importante na concentração de xilose do hidrolisado. A razão sólido:líquido também foi o fator que mais influenciou na formação de ácido acético e compostos fenólicos. Os parâmetros que mais influenciaram na formação de furfural e hidroximetilfurfural foram a concentração do ácido sulfúrico e o tempo de exposição. As melhores condições de hidrólise foram definidas como: concentração de ácido sulfúrico, 1,09% (v/v); razão sólido:líquido 1:2,8 e tempo de exposição de 27 minutos a 121°C. Este trabalho serve como bom parâmetro para hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar.

Quando o pré-tratamento envolve hidrólise ácida, uma etapa de neutralização é requerida, a fim de possibilitar condições de cultivo necessárias. O hidrolisado deve ser neutralizado, até índices de pH que possibilitem o funcionamento metabólico dos microrganismos. O valor de pH ideal varia com o microrganismo, mas usualmente está compreendido entre 5,5 e 7,5. Para o ajuste do pH é necessária a adição de álcalis como Ca(OH)_2 , NH_4OH e NaOH . (DUARTE, 2008; VARGAS BETANCUR e PEREIRA Jr, 2010).

Entre as diversas associações de tratamento da biomassa vegetal destaca-se o modelo de duas correntes, incluindo tratamentos com ácido, para liberação da fração hemicelulósica, seguido por delignificação (da fração lignocelulósica) e tratamento enzimático da celulose. O processo descrito por Cardona e Sanches (2007) inclui cinco passos principais, a saber: pré-tratamento da biomassa, fermentação de hexoses, separação e tratamento de efluentes, retirada de moléculas tóxicas e fermentação de pentoses. A fração celulósica é sacarificada (por ácidos ou enzimas) e depois fermentada até etanol. Este processo é chamado de hidrólise e fermentação separados (SHF) e tem como principal vantagem o fato de cada processo (sacarificação e fermentação) ser conduzido em suas condições ótimas.

Um modelo otimizado promove simultaneamente a sacarificação dos polímeros (com adição de enzimas ao caldo fermentativo) e a fermentação realizada pelo microrganismo em questão. Este processo, chamado de sacarificação e fermentação simultâneos (SSF) foi utilizado por diversos autores para o aproveitamento da celulose (SASSNER et al, 2008; CASTRO e PEREIRA Jr, 2010; ERDEI et al, 2010; PENG et al, 2012). Neste processo as duas etapas são agrupadas no mesmo vaso reacional, promovendo o consumo dos monômeros concomitantemente à liberação a partir das cadeias polissacarídicas. As vantagens incluem redução do custo de investimento à planta industrial, menor inibição da enzima pelo produto de hidrólise, equilíbrio das demais reações de hidrólise (pelo deslocamento no sentido do

produto) além da diminuição dos riscos de contaminação do sistema. (CARDONA e SANCHES, 2007; CASTRO e PEREIRA Jr, 2010).

Nos modelos supracitados a fermentação de pentoses é conduzida em vaso separado, por ser normalmente mais lenta e requerer condições diferenciadas quando comparada à fermentação das hexoses. Além destes fatos, a fermentação de pentoses é normalmente conduzida por microrganismos diferentes, com habilidades específicas de bioconversão destes açúcares.

Existe, entretanto, uma alternativa de modelo que requer microrganismo com boa habilidade para utilização tanto de pentoses quanto de hexoses. Neste sistema, denominado co-fermentação (CF), as etapas de fermentação de hexoses e pentoses ocorrem no mesmo vaso reacional, diminuindo o custo de investimento à planta industrial. Entretanto, este modelo não permite aplicação das condições ótimas para cada processo. Uma extensão do processo de co-fermentação é a sacarificação simultânea à co-fermentação (SSCF), que apresenta vantagens e desvantagens similares ao processo SSF.

Há ainda um sistema integrado, chamado de bioprocesso consolidado (BPC), que inclui a produção de celulasas. Neste sistema a produção das enzimas a partir da biomassa é inclusa na planta industrial e integrada ao sistema SSCF. Este sistema pode diminuir os custos de produção, levando-se em consideração que os gastos com aquisição dessas enzimas representam até 18% do custo operacional de uma planta industrial (CARDONA e SANCHES, 2007; CASRO e PEREIRA Jr, 2010). Todos estes sistemas estão esquematizados na **Figura 3**.

Alguns autores sugerem processos de aperfeiçoamento dos sistemas citados anteriormente, com vistas à diminuição dos custos e otimização de pontos específicos. Hahn-Hagerdal e colaboradores (2007) sugerem a utilização de microrganismos resistentes aos inibidores gerados pelo pré-tratamento, suprimindo o processo oneroso de desintoxicação do

hidrolisado. Sassner e colaboradores (2008) sugerem a formação de *pellets* de lignina como combustível sólido. Esta é uma alternativa viável por alimentar a combustão das caldeiras para geração da energia elétrica, utilizando a fração não metabolizável do resíduo e aproveitando as frações celulósica e hemicelulósica para bioconversão.

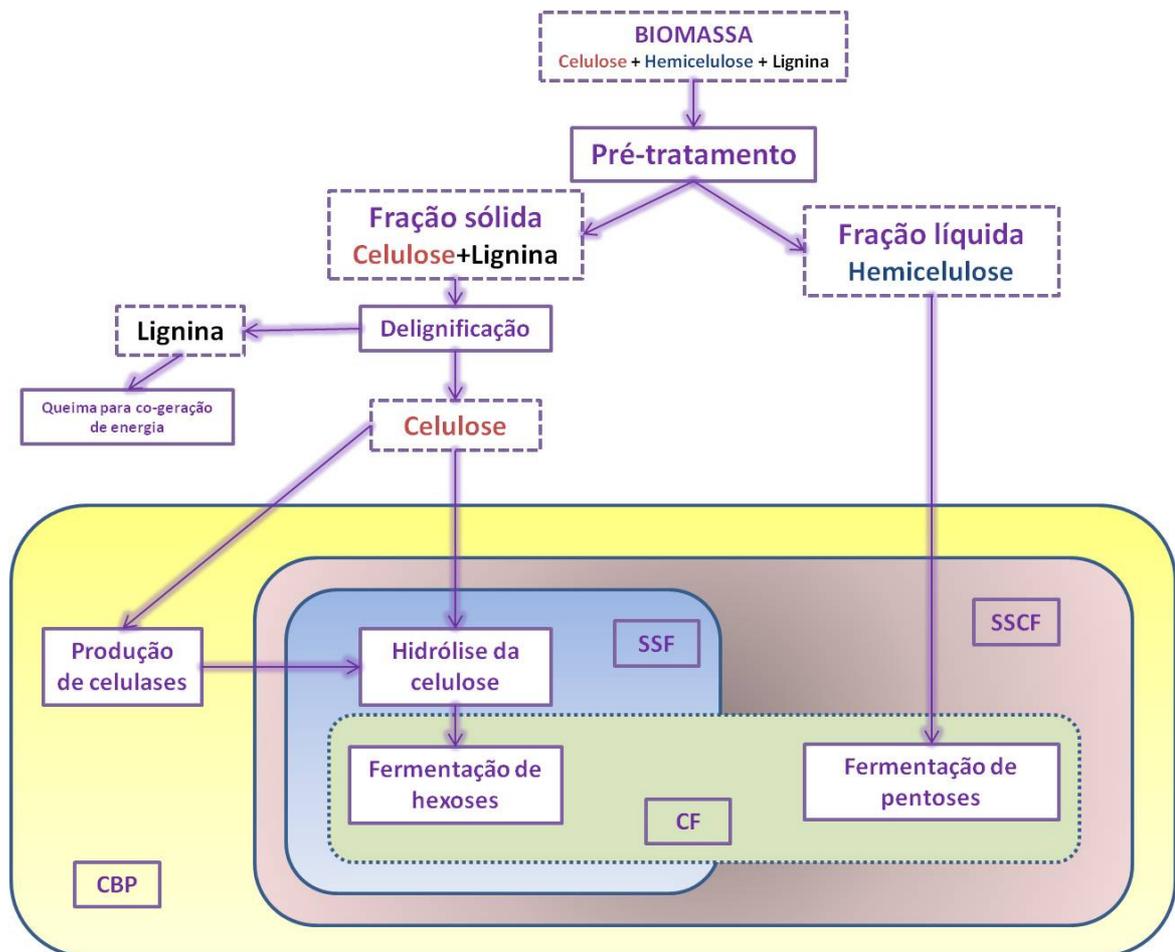


Figura 3: Formas de integração das etapas de bioconversão da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Mills et al, 2009. **CBP:** Bioprocessamento consolidado; **CF:** Co-fermentação; **SSCF:** Fermentação e sacarificação simultâneas à co-fermentação; **SSF:** Sacarificação e fermentação simultâneas.

Objetivando melhor aproveitamento da fração celulósica, vários esforços vêm sendo aplicados na melhoria da produção de celulases, no isolamento de microrganismos produtores, no aumento da expressão das enzimas e nas etapas de purificação e caracterização. Diversos microrganismos, principalmente fungos filamentosos, podem produzir celulases, especialmente quando em presença de material celulósico. Desta forma, os fungos *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Trichoderma harzianum*, *Ruminococcus albus*, *Humicola lanuginosa*,

Ceriporiopsis subvermispora, e a bactéria *Bacillus sp*, entre outros, foram utilizados para produção de diversos tipos de enzimas celulolíticas.

Embora existam várias aplicações para as enzimas celulolíticas, há algumas décadas grandes investimentos foram aplicados na produção de celulases, com ênfase na produção de etanol de segunda geração (neste caso, etanol celulósico). Em 2000 o USDOE (*United States Department of Energy*), buscando tornar economicamente viável a produção de etanol a partir de resíduos de milho, utilizando principalmente palha e sabugo, assinou um acordo com as duas empresas líderes mundiais em produção de enzimas (Novozymes e Genencor) e com o laboratório Nacional de Energias Renováveis (*National Renewable Energy Laboratory – NREL*). Neste acordo foram liberados dezessete milhões de dólares para a redução no custo de produção de celulases em 10 vezes. Em 2004 as empresas anunciaram a redução em 12 vezes no custo das enzimas.

Líder mundial na produção de etanol celulósico, a Iogen Corporation também recebeu recursos para melhorias na tecnologia de produção de etanol de segunda geração, utilizando talo de milho, palha de trigo, aveia e cevada. O governo Canadense financiou a primeira planta demonstrativa mundial de etanol produzido a partir de resíduos. Em 2004 foi inaugurada uma planta comercial para produção do EchoEthanolTM. (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010)

Em alguns países como Finlândia, Suécia, Rússia, Japão e Estados Unidos também existem plantas demonstrativas de bioconversão utilizando material lignocelulósico. Os Estados Unidos lideram o número de empresas que empregam esta tecnologia, com 6 plantas operantes, todas dedicadas à produção de etanol de segunda geração (**Tabela 2**). No Brasil existe uma planta demonstrativa da PETROBRÁS que, aliás, é a única da América Latina. A planta produz etanol celulósico do bagaço de cana-de-açúcar (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2010; PENG et al, 2012).

Tabela 2: Empresas que empregam tecnologia de hidrólise da biomassa vegetal e bioconversão a etanol

Empresa	País de Origem	Características de Processo	Localização	Capacidade (m³etanol/ano)
AE Biofuels	EUA	Hidrólise enzimática	Montana	567
Blue Fire Ethanol	EUA/Japão	Hidrólise com ácido concentrado	Califórnia Izumi	12.110 n.d.
Chempolis Ou	Finlândia	Hidrólise com ácido diluído	Oulu	n.d.
Iogen	Canadá	Hidrólise Enzimática	Ontário	4.000
KL Energy	EUA	Hidrólise Enzimática	Wyoming	5.680
Lignol Energy	Canadá	Pré-tratamento <i>organosolv</i>	Vancouver	2.500
Mascoma	EUA	n.d.	Nova Iorque	1.890
Poet	EUA	n.d.	Dakota do sul	75
Sekab	Suécia	Hidrólise enzimática	n.d.	n.d.
ST1	Finlândia	n.d.	Lappeenranta Hamina	1.000 1.000
St. Petersburg State Forest-Technical Academy	Rússia	Hidrólise com ácido diluído	13 unidades no país	n.d.
Sun Opta	Canadá	Hidrólise Enzimática	China	n.d.
University of Flórida	EUA	Hidrólise enzimática utilizando <i>E.coli</i> recombinante (modelo integrado)		
Verenium	EUA	Hidrólise enzimática (modelo de duas correntes)	Louisiana Japão	5.300 4.920

Fonte: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010

1.2 – Biorefinaria e bioconversão de hemicelulose

A biotecnologia industrial tem sido considerada uma das rotas mais promissoras para sustentabilidade das atividades industriais e tem papel importante no desenvolvimento das biorefinarias. Por biorefinaria entende-se a conversão integrada da biomassa vegetal em uma gama de produtos como combustíveis, químicos e blocos de construção para biossíntese. (DUMON et al, 2012). Conceitualmente a biorefinaria é análoga ao processamento do óleo cru, no qual o material lignocelulósico é composto por uma mistura de compostos orgânicos e inorgânicos, produzindo vasta matriz de produtos químicos através de fracionamento e conversão. Integrando uma variedade de tecnologias, a biorefinaria é capaz de produzir, simultaneamente, calor, eletricidade, grandes volumes de produtos químicos de baixo valor

agregado ou pequenos volumes de produtos químicos de alto valor agregado (ZHANG et al, 2012a).

A conversão biotecnológica da biomassa lignocelulósica é uma atividade incipiente por causa da intrincada estrutura química desses resíduos e da diversidade de compostos intermediários gerados pela bioconversão. Assim sendo, as técnicas precisam levar em conta esta complexidade, desenvolvendo uma ampla variedade de ferramentas, entre versáteis e específicas para certos componentes da biomassa (DUMON et al, 2012).

Os processos de extração e desconstrução da celulose vêm sendo o foco da maioria das pesquisas nas últimas décadas, principalmente porque o polímero contém somente glicose em sua constituição, uma *commodity* utilizada em inúmeros processos bem estabelecidos de bioconversão. Na economia de cereais a hemicelulose tem importância em sua composição (em torno de 30% da composição seca dessas plantas), entretanto, menor atenção tem sido aplicada a esta fração da biomassa, composta principalmente de arabinosilanos, polissacarídeos ricos nas pentoses xilose e arabinose. A utilização destes açúcares é limitada por ainda não serem produzidos como *commodities*.

Para assegurar a sustentabilidade da biorefinaria, as pentoses devem ser aproveitadas para bioconversão em produtos de interesse, fato economicamente necessário e viável, por gerar diversos produtos específicos, alguns de alto valor agregado (DUMON et al, 2012).

Como a xilose é a pentose mais abundante no material hemicelulósico, a maioria dos esforços de pesquisas têm envolvido o desenvolvimento de microrganismos eficientes na fermentação deste açúcar. (HAHN-HAGERDAL et al, 2006).

A produção de etanol combustível tem sido o maior foco de interesse no aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa vegetal. As melhorias resultantes puderam ser empregadas para produção de outros compostos de interesse que também foram amplamente estudados, como: enzimas celulolíticas, xilitol, ácido xilônico; ácido acético,

acetona, butanol, ácidos graxos, ácido lático, hidrogênio, metano, bioplásticos e biomassa microbiana (LAOPAIBOON et al, 2010;; NYGARD et al, 2011; ZHANG, et al, 2012b; DELABONA et al, 2012; LIU et al, 2012; SUN e LIU, 2012; WHITFIELD et al, 2012).

1.2.1– Produção de xilitol

O xilitol é um poliálcool com poder adoçante capaz de substituir a sacarose, com algumas vantagens sobre esta: tem boa estabilidade química, atua como conservante dos alimentos oferecendo resistência ao crescimento microbiano. É tolerado por diabéticos, tem várias aplicações químicas e alto valor agregado. A anticariogenicidade, uma das propriedades mais relevantes do xilitol, é determinada principalmente pela sua não fermentabilidade por bactérias do gênero *Streptococcus*, cuja proliferação na microbiota bucal torna-se então limitada. A salivação com aumento na produção de minerais (especialmente cálcio e fosfato) são estimuladas pelo sabor do adoçante. Estes minerais promovem remineralização dos dentes com reversão de cáries em estágio inicial. Com aumento da salivação ocorre aumento da produção de enzimas e elevação do pH das placas, aumentando a capacidade tamponante e a atividade bacteriostática da saliva, fazendo com que o ambiente bucal torne-se pouco favorável ao desenvolvimento de bactérias. O xilitol também pode ser utilizado em auxílio no tratamento de pacientes com lesões renais e parenterais, agente terapêutico para tratamento de anemia hemolítica e na prevenção tanto de otite média aguda quanto de osteoporose (MUSSATO e ROBERTO, 2002).

O xilitol é um produto intermediário do metabolismo de carboidratos em diversos organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e mamíferos. A extração do xilitol é impraticável quando aplicada a frutas e outros vegetais, por estar presente em quantidades inferiores a 900mg/100g. A produção de xilitol dá-se pela hidrogenação de xilose, por via

química ou biotecnológica, conforme ilustrado na **Figura 4** (DUMON et al, 2012; MUSSATO e ROBERTO, 2002).

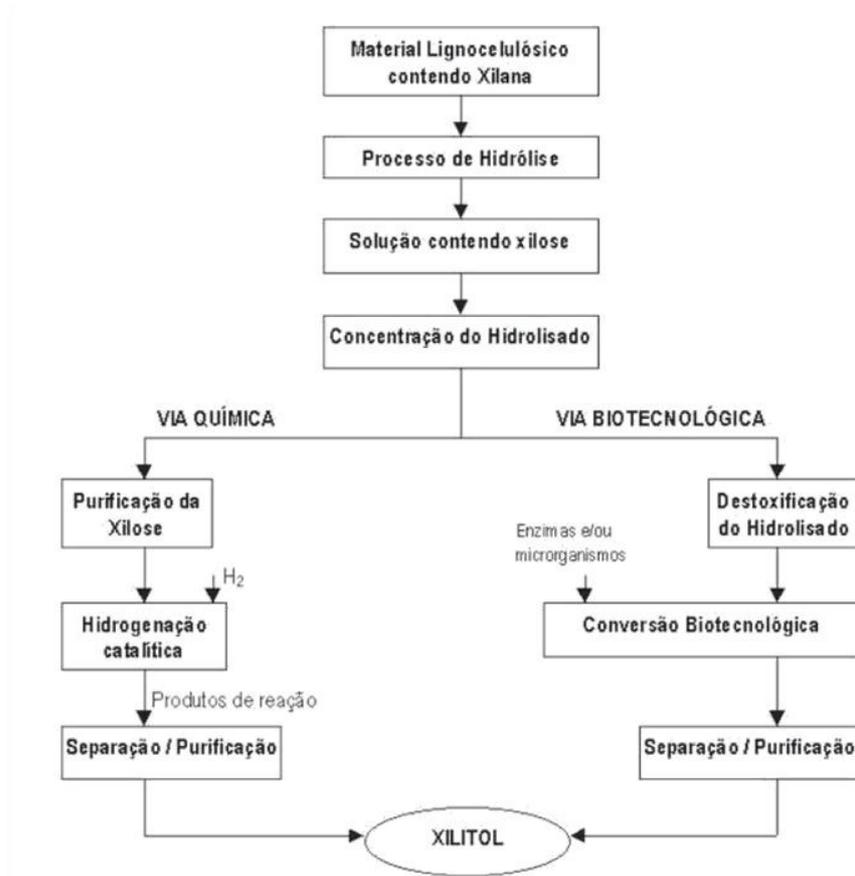


Figura 4: Tecnologias para produção de xilitol
Fonte: Mussato e Roberto, 2002

A produção por via química teve início em 1975, pela Finnish Sugar Co. Ltda (Finlândia). É um processo oneroso, cerca de 10 vezes maior que aqueles relativos à sacarose ou sorbitol e que fornece 50 a 60% de rendimento. A purificação da xilose é etapa crítica: pequenas impurezas, a exemplo da lignina, podem paralisar a etapa de redução de forma irreversível (MUSSATO E ROBERTO, 2002).

Devido ao elevado custo da produção de xilitol por via química, vários estudos vem sendo realizados para produção de xilitol por via biotecnológica, na tentativa de produzir o adoçante em larga escala, por técnicas menos dispendiosas (MUSSATO E ROBERTO, 2002).

No metabolismo microbiano catabólico da xilose, o primeiro passo das vias, após o transporte do açúcar para célula, consiste na redução a xilitol pela enzima xilose redutase e posteriormente oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase. Estes dois passos de óxido redução podem ser resumidos a um único passo de isomerização pela enzima xilose isomerase, presente normalmente em bactérias.

A xilulose, formada por qualquer um dos passos anteriores, pode ser fosforilada pela enzima xiluloquinase produzindo xilulose-5-fosfato, a qual pode ser canalizada para a via das pentoses fosfato. Os passos de oxido-redução podem sofrer desbalanço redox, pelos requerimentos específicos por cofatores reduzidos das enzimas, mas estes problemas vêm sendo amplamente estudados (DUMON ET AL, 2012).

As leveduras *Candida tropicalis*, *Candida rugosa* e *Pichia guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) são normalmente utilizadas para produção de xilitol a partir de diversos resíduos agroindustriais (BRANCO et al, 2011; HUANG et al, 2011, LOURENÇO et al, 2010; SCHIRMER et al, 2007).

1.2.2 – Produção de etanol a partir de xilose

O xilitol pode ser metabolizado até etanol quando oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase. A xilulose formada pode ser fosforilada a xilulose-5-fosfato pela enzima xiluloquinase que por sua vez pode ser canalizada para a via das pentoses fosfato. Esta via converte pentoses em moléculas com três ou seis carbonos (frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato) que podem ser convertidos posteriormente, pela via glicolítica, em piruvato e em etanol e dióxido de carbono pela fermentação etanólica. Cada 3 moles de xilose

podem potencialmente ser transformados em 5 moles de etanol, se não houver acúmulo de xilitol. (HAHN-HAGERDAL *et al*, 2007). *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *C.parapsilosis* e *Pichia stipitis* pertencem à pequena faixa de leveduras que conseguem fermentar naturalmente xilose até etanol.

Nas últimas décadas o desenvolvimento de microrganismos com habilidade de produzir etanol a partir de xilose tem sido alvo nos trabalhos de pesquisa e desenvolvimento. O principal motivo desta busca é a inabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (tradicionalmente utilizada na produção de etanol a partir da sacarose) no metabolismo de pentoses (DUMON *et al*, 2012; PENG *et al*, 2012).

1.2.3– Produção de xilanases

Xilanas são heteropolímeros compostos de xilose, arabinose, galactose, raminose entre outros açúcares. Consistem em repositório de carbono de biomassa mais abundante, depois da celulose. Os resíduos xilosil são unidos por ligações β 1-4, mas diferentes resíduos (arabinose, ácido glicurônico, entre outros) podem ser ligados à estrutura por ligações α 1-2, α 1-3 ou α 1-5. As xilanas são amplamente distribuídas em várias espécies de vegetais, especialmente entre gramíneas e dicotiledôneas, em quantidades consideráveis: 10 a 30% do peso seco (DUMON *et al*, 2012).

No contexto de biorefinarias, descrito anteriormente, existe a necessidade da desconstrução do material lignocelulósico. Uma das alternativas, em detrimento dos tratamentos químicos, é a utilização de enzimas específicas para a fração hemicelulósica da biomassa. Este tratamento biológico traz vantagens ambientais, especificidade e baixa formação de co-produtos como os inibidores de crescimento. Vários microrganismos são capazes de produzir estas enzimas, especialmente por indução, quando em presença de

substrato lignocelulósico. Esta produção também pode ser integrada à produção de compostos de interesse, em um bioprocesso consolidado (PENG et al, 2012; ZHANG et al, 2012b).

As xilanases (endo-1,4- β -xilanases – E.C.3.2.1.8) hidrolisam a cadeia principal formando xilo-oligossacarídeos. Algumas xilanases possuem atividade endo-1,3- β -xilanases, catalisando a hidrólise de β -1,3-xilanas, polímeros típicos de algas marinhas (DUMON et al, 2012, PENG et al, 2012).

As enzimas β -xilosidases (exo 1,4- β -xilosidases E.C. 3.2.1.37) hidrolisam pequenos xilo-oligossacarídeos produzindo xilose. Elas têm ação complementar àquela das xilanases. As arabinofuranosidades (E.C. 3.2.1.55) liberam arabinose de arabinoxilanas, arabinogalactanas ou arabinanas. Estas enzimas possuem importante papel na desconstrução da biomassa e possuem efeito sinérgico às xilanases. Variantes especializadas de esterases de ácidos carboxílicos são frequentemente encontradas em *pools* enzimáticos lignocelulolíticos. Elas agem em conjunto com as glicoses hidrolases para desconstruir a lignocelulose (DUMON et al, 2012, PENG et al, 2012).

1.2.4 – Produção de biomassa microbiana a partir de resíduos

A natureza e quantidade de resíduos agroindustriais, bem como os gerados pelas indústrias de alimentos, variam com os tipos de culturas e tecnologia de processamento. A necessidade de reprocessamento e reutilização varia com o potencial energético. Nas economias produtoras de grãos, grandes quantidades de palha são formadas, já naquelas produtoras de tubérculos, os resíduos são ricos em amido. Na maioria dos casos, os resíduos agroindustriais são particularmente ricos em material lignocelulósico como palhas de cevada, arroz e trigo, bagaços de cana-de-açúcar e de mandioca, talo e espiga de milho, cascas de algodão e amendoim além de restos fibrosos de plantas forrageiras. As indústrias de alimentos também geram diversos resíduos que não entram na cadeia de produção.

Estes resíduos possuem potencial para suprimento em calorias, mas são pobres em proteínas, vitaminas, óleos e outros nutrientes, além de possuir palatabilidade e digestibilidade limitadas. Entretanto, os resíduos ainda podem ser utilizados para suplementação alimentar de animais e até de humanos, desde que sejam enriquecidos em proteínas através do cultivo com bactérias, leveduras ou fungos filamentosos (UGWUANYI et al, 2009).

As tecnologias escolhidas dependem da natureza do material e dos objetivos desejados assim como o material pode ser utilizado com ou sem pré-tratamento.

O tipo de cultivo que mais se assemelha às condições naturais de crescimento é a fermentação em estado sólido. Historicamente utilizado, este tipo de cultivo utiliza substratos sólidos úmidos na ausência de água livre ou com presença de fase líquida em pequena quantidade.

Na Ásia e na América Latina este processo é utilizado na produção de alimentos e condimentos tais como *tempeh*, *shoyu* e *misso*. Na Europa o cultivo é pouco explorado, com exceção da fabricação de queijo e pão. A maioria das aplicações da fermentação em estado sólido é direcionada para produção de enzimas de utilização industrial, mas, outras aplicações da técnica visam biorremediação, biodegradação e desintoxicação de resíduos industriais.

De particular interesse, este cultivo pode ser utilizado para produção de biomassa microbiana e *single cell protein* para alimentação animal ou enriquecimento nutricional de resíduos. Outros produtos relacionados com alimentos também podem ser gerados, a exemplo de ácidos orgânicos, *single cell oil* e basidiomicetos comestíveis. Em muitos casos o enriquecimento em proteínas dos resíduos pode ser acompanhado pela produção de outros compostos de interesse, a exemplo de ácidos orgânicos (UGWUANYI et al, 2009).

O enriquecimento de resíduos utilizando meio semissólido também é um processo atrativo. O reprocessamento de resíduos como polpa de *Citrus* e alguns resíduos da indústria da cana-de-açúcar são gerados neste estado. Sua desidratação para fermentação em estado

sólido é onerosa e indesejável. Desta forma, o cultivo em meio semissólido propicia aquecimento, possibilitando o acúmulo de microrganismos termófilos, produzindo enriquecimento em proteínas e a pasteurização do material. No processo, as fontes naturais de carbono e nitrogênio são transformadas em biomassa microbiana rica em proteínas. O resultado é o resíduo acrescido de suplemento nitrogenado que pode ser utilizado para alimentação animal (UGWUANYI et al, 2009).

Uma proposta viável para o desenvolvimento de fermentação de baixo custo é a produção de biomassa microbiana a partir de resíduos, através de cultivo em meio líquido livre de partículas sólidas, a exemplo do hidrolisado hemicelulósico. O acúmulo de biomassa microbiana pode ser canalizado para produção de extrato de leveduras e *single cell protein*, dois produtos com amplas aplicações farmacêuticas, biotecnológicas e nutricionais. O extrato de leveduras, insumo para meios de cultura, consiste em um dos principais obstáculos técnicos, podendo contribuir com até 38% do custo total do processo de fermentação (ZALDIVAR et al, 2001).

Cultivado no hidrolisado hemicelulósico, o microrganismo consome as diferentes fontes de carbono, especialmente as pentoses, exibindo altos rendimentos e produtividades em biomassa. As leveduras utilizadas precisam ter alta tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado, capacidade de produzir biomassa em baixos valores de pH e altos valores de temperatura, consumir amplas variedades de açúcares simultaneamente e requerer suplementação nutricional mínima (ZALDIVAR et al, 2001).

Os relatos de produção de biomassa microbiana a partir do hidrolisado hemicelulósico são pouco comuns. Duarte e colaboradores (2008) cultivaram *Debaryomyces hansenii* em frascos cônicos contendo hidrolisado hemicelulósico de grãos utilizados em cervejaria. A levedura obteve taxa específica de crescimento de $0,34\text{h}^{-1}$; rendimento em biomassa de $0,61\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e produtividade de $0,56\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. O perfil nutricional da biomassa microbiana foi

elevado e comparado favoravelmente a outros citados na literatura. O conteúdo é rico em aminoácidos essenciais e tem alta razão de ácidos graxos insaturados sobre os saturados.

Carvalho e colaboradores (2006) também cultivaram *D. hansenii* em hidrolisado hemicelulósico produzido a partir de grãos residuais de cervejaria. Os autores produziram biomassa microbiana e xilitol e estudaram os requerimentos nutricionais da levedura. O nutriente que influenciou na produção de biomassa microbiana foi o fosfato (0,5g/L KH_2PO_4).

Existem relatos antigos de produção de biomassa microbiana em hidrolisado hemicelulósico: Almeida e Silva e colaboradores (2003) cultivaram o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii*; Pandey e colaboradores (2000) e Singh e Mishra (1995) abordaram as vantagens do cultivo para produção de *single cell protein* a partir de resíduos lignocelulósicos e xilose, enquanto du Prez (1989) cultivou, neste meio, as leveduras *Candida utilis* e *Geotrichum candidum*.

1.3 – Técnicas moleculares de identificação de leveduras

Regiões do RNA ribossomal de leveduras são largamente adotadas na identificação molecular. Elas consistem nas regiões 18S (subunidade menor), 5.8S e 26S (subunidade maior). Entre as regiões 18S e 5.8S, bem como entre esta última e a região 26S existem pequenas regiões não codificadoras, denominadas, respectivamente, ITS-1 e ITS-2 (*Internal Transcribed Spacers*). Ver **Figura 5** (KORABECNA, 2007). As regiões mais utilizadas são 18s, ITS-1, ITS-2 e os domínios D1/D2, presentes na extremidade 5' da região 26S.

A região 18S é altamente conservada e pouco viável para estudos intraespecíficos. Entretanto, tem sido utilizada com certa frequência para diferenciar espécies.

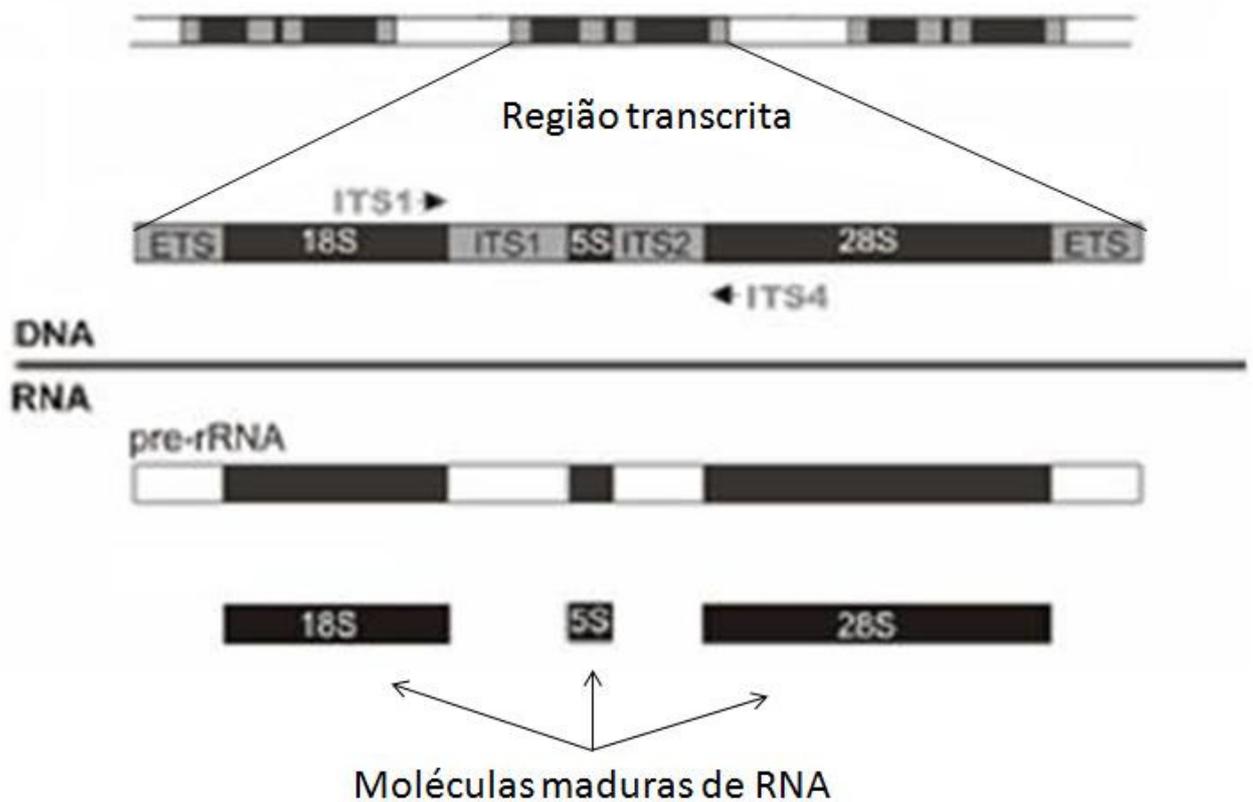


Figura 5: Regiões do RNA ribossomal, indicando a porção transcrita e as três moléculas de RNAr maduras formadas. Extraído de Korabecna, 2007.

As regiões espaçadoras (ITS) são extremamente variáveis, tanto no comprimento quanto na sequência das bases, provendo uma excelente ferramenta para identificação molecular. A Região ITS-1 é provavelmente a mais utilizada para sequenciamento em fungos. É tipicamente utilizada em estudos de sistemática molecular em nível de espécie, como também dentro da mesma espécie (DENG et al, 2008).

Em virtude desta característica, diversos estudos foram realizados utilizando as regiões ITS para identificação molecular de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon sp.*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Candida montana* e *Pichia fabianii*. Outros estudos foram realizados com grupos mais específicos, incluindo leveduras associadas ao trato digestivo de insetos: *Candida arabinofementans*, *C. membranifaciens*, *C. oregonensis*, *C. piceae*, *Kuraishia capsulata*, *Pichia americana*, *P.*

canadensis, e *P. glucozyma*. Outros trabalhos foram ainda mais específicos, utilizando a mesma fonte para isolamento de leveduras assimiladoras de xilose: *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia anômala*, *Candida xestobii* e *Candida ernobii*; bem como as fermentadoras de xilose: *Candida intermédia*, *Candida tenuis*, *Candida shehatae*, *Candida lyxosophila*, *Pichia stipitis*, *Pichia segobiens*, *Pachysolen tannophilus* e *Brettanomyces naardenensis* (SUH *et al*, 2003; JEYARAM *et al*, 2008; RIVERA, 2009; BASUKRIADI, 2010).

Os primers utilizados para sequenciar as regiões ITS são normalmente: Forward - ITS-1; Reverse- ITS-4.

Após a extração do DNA total e amplificação do DNA requerido, as sequências são comparadas com outras disponíveis em bancos de dados, a exemplo do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Desta forma, pode-se inferir a proximidade genética da sequência desconhecida com aquelas depositadas no banco.

Com base nas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos podem-se fazer as reconstruções filogenéticas, que consistem em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos. Desta forma, as árvores filogenéticas representam a história evolutiva dos organismos nela presentes. Para obtenção de uma árvore filogenética pode-se utilizar diversos algoritmos que podem ser aplicados a métodos de distância, critérios de máxima parcimônia e máxima verossimilhança.

Os algoritmos heurísticos aplicam a decomposição da politomia em estrela que consiste em unir os táxons inicialmente em um único nó interno. Os passos seguintes consistem em avaliar todas as árvores possíveis, considerando cada táxon como único, em busca de uma árvore que otimize o critério escolhido.

Para a construção da árvore filogenética pelo método geométrico, primeiro são realizados cálculos das distâncias propriamente ditas, depois, constrói-se a topologia da

árvore. Existem vários modelos matemáticos diferentes para o cálculo das distâncias: distância p, a mais simples de todas, que considera apenas a proporção de posições em que as sequências diferem; distância de Tajima-Nei, que estima a taxa de composição de nucleotídeos com Guanina e Citosina; distância de Jukes-Cantor, que considera substituições múltiplas; distância Kimura (2 parâmetros) que leva em consideração, além das substituições múltiplas a razão entre transições e transversões; distância Tamura (3 parâmetros), que inclui os cálculos das distâncias de Tajima-Nei como também de Kimura; distância de Tamura-Nei que diferencia as taxas de transição entre purinas e pirimidinas.

Quanto maior o número de parâmetros inseridos nos cálculos, maior a variância. Por este motivo, deve-se escolher o modelo adequado para cada caso.

Para construir a topologia da árvore filogenética podem-se utilizar diferentes algoritmos, a saber: UPGMA (*unweigheted pair group method with arithmetic means*), o mais simples, agrupamento de vizinhos e outros métodos de evolução mínima modificados. O método de agrupamento de vizinhos busca árvore com a menor soma total de ramos, onde a evolução mínima está implícita a cada passo do algoritmo.

A fim de assegurar a confiabilidade dos dados, deve-se utilizar um teste de confiança em topologia, a exemplo do *bootstrap*, que constrói réplicas da árvore filogenética de acordo com o número de amostragens escolhido no passo de configuração do programa. Os valores de *bootstrap* gerados pelo programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis: <http://www.megasoftware.net>*) são inclusos nos ramos da árvore indicando as percentagens com que cada agrupamento apareceu nas réplicas (AVISE, 2004).

A close-up photograph of a hand holding a bundle of dried, fibrous plant material, likely a root or stem. The material is light brown and has a rough, textured appearance. The hand is visible on the left side, with fingers gripping the bundle. The background is a soft, out-of-focus brown color.

Objetivos

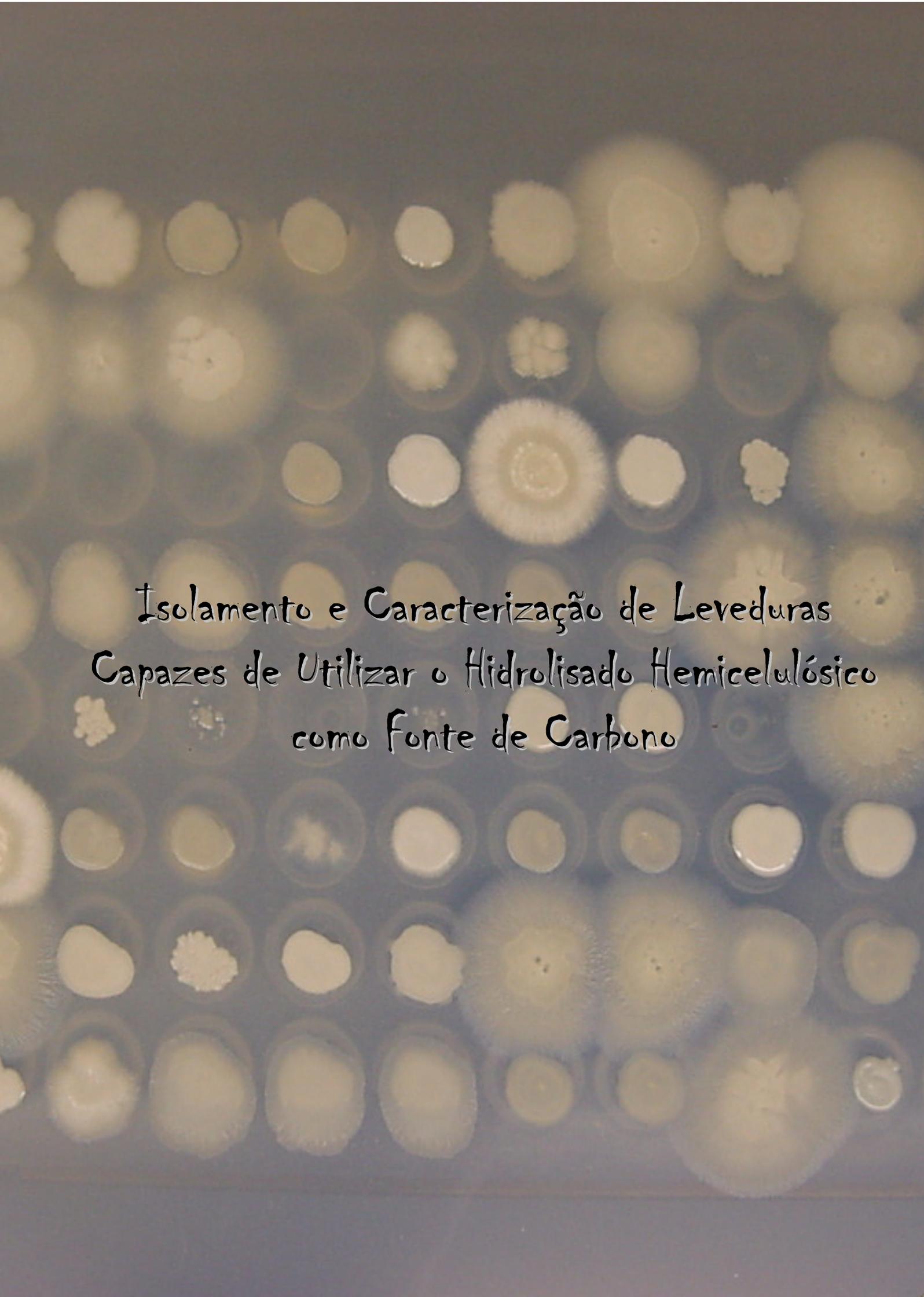
2-OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Isolar e caracterizar leveduras da biodiversidade amazônica capazes de utilizar o hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono.

Objetivos Específicos:

- a) Isolar leveduras da microbiota amazônica capazes de crescer em meio de cultura contendo hidrolisado ácido do bagaço da cana-de-açúcar como única fonte de carbono;
- b) Montar um banco de germoplasma de leveduras que utilizam o hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono;
- c) Verificar a capacidade de crescimento dessas leveduras utilizando diferentes açúcares, incluindo pentoses, hexoses e dissacarídeos como fonte de carbono;
- d) Classificar, utilizando técnicas moleculares, as leveduras capazes de utilizar, como fonte de carbono, tanto o hidrolisado hemicelulósico quanto as pentoses xilose e arabinose.
- e) Selecionar uma levedura capaz de produzir biomassa a partir de xilose, utilizando como fonte de carbono o hidrolisado hemicelulósico;

A grid of approximately 40 petri dishes, each containing a different yeast culture. The cultures exhibit various growth patterns, including circular, irregular, and filamentous forms, with colors ranging from white to light yellow. The dishes are arranged in a roughly rectangular pattern, filling the background of the image.

Isolamento e Caracterização de Leveduras
Capazes de Utilizar o Hidrolisado Hemicelulósico
como Fonte de Carbono

3- ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS CAPAZES DE UTILIZAR O HIDROLISADO HEMICELULÓSICO COMO FONTE DE CARBONO

3.1 – Introdução

A biomassa vegetal é constituída, majoritariamente, por celulose, hemicelulose e lignina. A proporção destes constituintes varia com a fonte vegetal e reflete-se nas características do material. Normalmente, a celulose é a fração mais abundante mas, a fração hemicelulósica pode corresponder a até 40% da biomassa seca CASTRO E PEREIRA Jr, 2010.

Os diversos resíduos agroindustriais, produzidos após o processamento da matéria-prima, são ricos nestes polímeros de carboidratos que ainda podem ser aproveitados para bioconversão por microrganismos. Para tornar os carboidratos acessíveis ao metabolismo microbiano, de forma economicamente viável, é necessário um processo de hidrólise da biomassa vegetal. Este processo promove o desarranjo dos polímeros, facilitando o acesso das enzimas microbianas às cadeias polissacarídicas e a liberação de oligômeros e monômeros VARGAS BETANCUR e PEREIRA JR, 2010.

Apesar do etanol ter sido alvo das mais vastas pesquisas e desenvolvimentos metodológicos, outros produtos de interesse têm sido catalisadores de pesquisas que utilizam como fonte de carbono o hidrolisado hemicelulósico. Entre eles, destacam-se os que se dedicam a substituir o corrente e oneroso processo químico de produção de xilitol (BRANCO et al, 2011; CHIUNG-FANG et al, 2011; LOURENÇO, 2009; AYUB, 2007) entre outros compostos de interesse: ácido xilônico (NYGARD, et al, 2011); ácido láctico (LAOPAIBOON et al, 2010); enzimas celulolíticas (HSU et al, 2011; DELABONA et al, 2012); ácido acético, quitosana, aromas, pigmentos, ácido cítrico e alcaloides (PANDEY et al, 2000); ração animal,

substratos enriquecidos em proteínas, SCP (*Single Cell Protein*) e biomassa microbiana (NYGARD et al, 2011; PANDEY et al, 2000; CHOI e PARK, 2003).

Na busca pelo aproveitamento eficiente da fração hemicelulósica da biomassa, parte das pesquisas concentrou-se na identificação de microrganismos com características específicas necessárias para tal cometimento. Além da tolerância aos inibidores gerados pelo pré-tratamento (furfurais, hidroximetilfurfurais e ácido acético) e aos ambientes das dornas industriais, os microrganismos utilizados nestas fermentações precisam ser hábeis na utilização de pentoses como principal substrato para conversão nos produtos de interesse (HAHN-HAGERDAL, 2007).

Algumas leveduras selvagens são capazes de utilizar as pentoses: *Pichia stipitis* fermenta naturalmente xilose a etanol e *Meyerozyma guilliermondi* fermenta naturalmente xilose a xilitol. Estas leveduras precisam ser adaptadas ao meio com a presença de inibidores do crescimento microbiano, resultante dos processos de hidrólise. Existem ainda leveduras que não metabolizam pentoses, mas possuem características específicas competitivas em ambientes industriais (*Saccharomyces cerevisiae*). Neste caso, vários são os relatos de modificações genéticas, normalmente com inserção de genes que codificam as primeiras enzimas da via: xilose redutase e xilitol desidrogenase (HAHN-HAGERDAL, 2007).

Neste contexto, o isolamento de novas leveduras selvagens é uma alternativa viável para melhoria de desempenho do microrganismo alvo. Ambientes com a presença da matéria lignocelulósica hidrolisada naturalmente, como intestino de insetos comedores de madeira, ou do trato gastrointestinal de outros animais que se alimentam da biomassa, a exemplo dos ruminantes, são fontes viáveis de microrganismos já adaptados a estes açúcares.

Em razão do exposto, este trabalho teve como objetivo a busca por leveduras selvagens em ambientes lignocelulósicos, usando como meio de isolamento seletivo o hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana-de-açúcar, como forma de obtenção de

microrganismos adaptados ao metabolismo de pentoses e de contribuição com as pesquisas que envolvem microrganismos utilizadores destes açúcares para melhor aproveitamento biotecnológico da fração hemicelulósica da biomassa.

3.2 – Material e Métodos

3.2.1 - Isolamento de Microrganismos

3.2.1.1 - Microrganismos associados a insetos imaturos

Procedeu-se buscas por insetos imaturos em troncos de árvores fisiologicamente ativas e em troncos em decomposição. As larvas foram coletadas em frascos com tampa perfurada juntamente com pedaços do substrato do local da coleta e levadas ao laboratório onde foram pesadas, fotografadas e identificadas em ordem e família¹.

Foram coletadas 7 larvas pertencentes à ordem Coleoptera sendo uma larva pertencente à família *Cerambycidae* e 6 pertencentes à família *Scarabaeidae*. (**Figura 6a e 6b**).

O trato digestivo das larvas foi excisado com auxílio de pinças, bisturi e tesoura de ponta fina, autoclavados. Posteriormente, o material foi cortado transversalmente em quatro porções. A quarta porção incluiu a epiderme do animal (**Figura 6c, 6d e 6e**). Cada porção pertencente ao tubo digestivo (porção 1 a 3 de cada larva) teve as paredes cortadas longitudinalmente para exposição do conteúdo interno e foi incubada em meio contendo hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono (anexo 6.1.1).

¹ A identificação foi realizada pelo professor Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4768602U4>

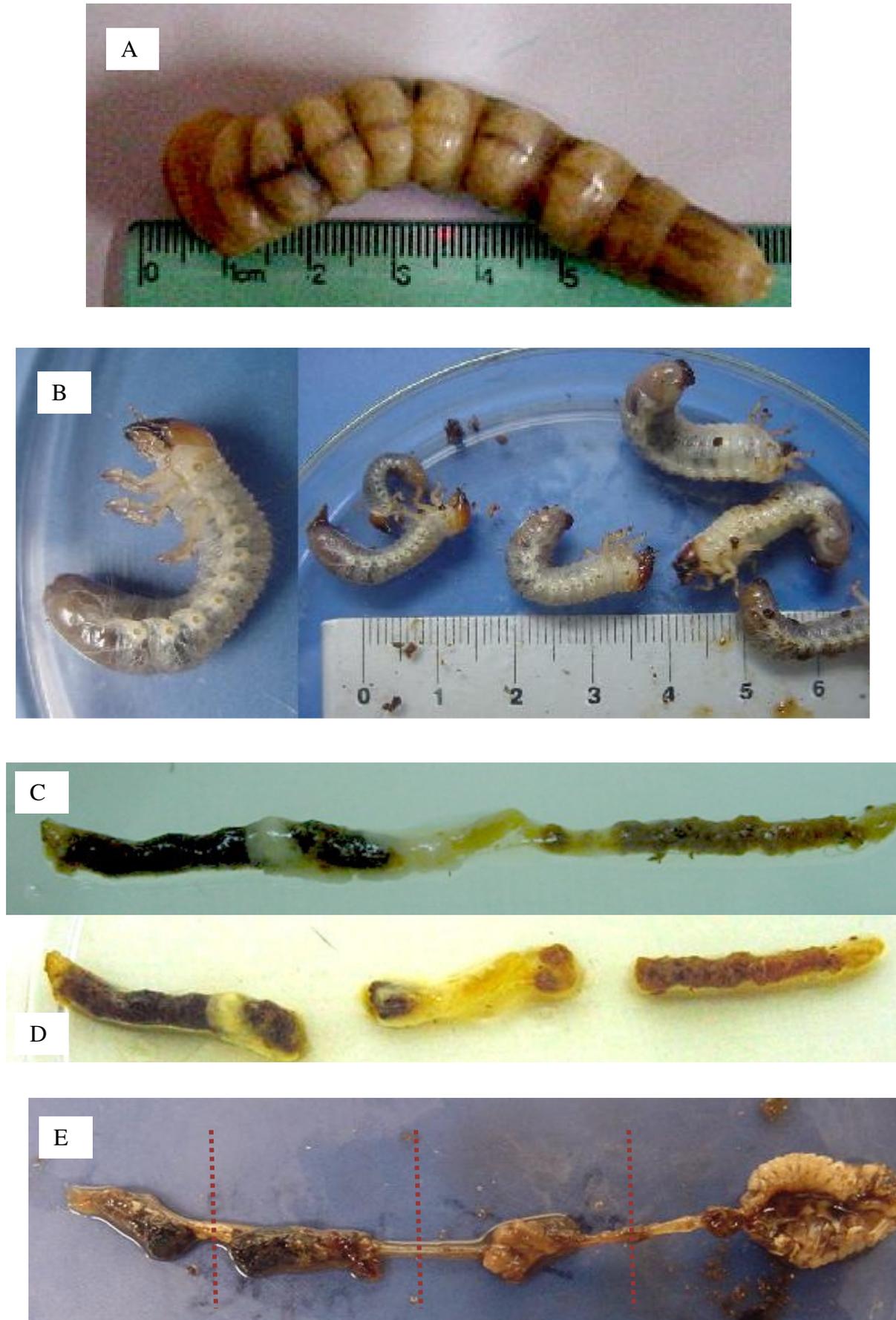


Figura 6: Larva da família *Cerambycidae* (A); Larvas da família *Scarabaeidae* (B); Tubo digestivo de larva da família *Cerambycidae* íntegro (C) e com cortes transversais(D); Tubo digestivo de larva da família *Scarabaeidae*, trato íntegro com indicações do corte em quatro porções (E). Na figura dos tubos digestivos a extremidade esquerda representa porção proximal (boca) e a direita a porção distal (ânus).

3.2.1.2 - Microrganismos de fezes de gado bovino

Dez amostras de fezes de bovinos fêmeas (Girolanda) foram coletadas na Escola Agrotécnica de Manaus em frascos esterilizados. As amostras foram coletadas tanto do solo como também diretamente do reto dos animais (**Figura 7 b e c**). No laboratório dois gramas de fezes foram adicionados a 20mL de meio hidrolisado hemicelulósico.

3.2.1.3 - Microrganismos da saliva de bovinos

Quatro amostras da cavidade bucal de bovinos fêmeas (Girolanda) foram coletadas na Escola Agrotécnica de Manaus em *swabs* esterilizados. (**Figura 7d**) As amostras foram coletadas diretamente da saliva dos animais. No laboratório, em cada tubo contendo a amostra, foram adicionados 2mL de meio hidrolisado hemicelulósico.

A metodologia para processamento das amostras está descrita resumidamente na **Figura 8**.

3.2.2 – Estoque e confecção do banco de células que utilizam o hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono

As colônias isoladas foram contadas, codificadas, purificadas e estocadas. Quando o número de colônias em uma mesma placa excedeu a 50, houve uma seleção de colônias a serem purificadas. Neste caso as colônias foram separadas por seus aspectos morfológicos macroscópicos distintos e foram purificadas até cinco colônias de cada aspecto macroscópico identificado na mesma amostra.

Todas as colônias foram estocadas em triplicata, em blocos de gelose (meio de cultura: glicose 1% - como fonte de carbono e 0,67% de YNB - *Yeast Nitrogen Base* - como fonte de nitrogênio) conservados em água destilada, em temperatura ambiente. As três cópias de cada colônia foram acondicionadas em caixas plásticas distintas, com tampa. Em cada caixa os frascos de estoque foram separados em setores e identificados com etiquetas de cores diferentes, a fim de facilitar a recuperação do estoque quando da necessidade de reativação.

Somente uma das triplicatas foi utilizada para a reativação. Todos os dados referentes às colônias foram registrados em planilha eletrônica.

As colônias selecionadas nos ensaios de assimilação de açúcares (ver item 3.2.5), bem como as colônias fermentadoras adaptadas ao meio xilose 5% foram conservadas em glicerol 25% e estocadas em no freezer a -80°C.

3.2.3 – Observação microscópica das células

Para cada colônia isolada foi confeccionada uma lâmina para microscopia óptica. As células foram coradas com azul de lactofenol e observadas em aumento de 400x.

3.2.4 - Viabilidade no hidrolisado hemicelulósico

O material coletado (porções do trato gastrointestinal de insetos, fezes e material da saliva de bovinos) foi inoculado em meio hidrolisado hemicelulósico líquido, onde permaneceram incubados por diferentes intervalos de tempo.

Decorrido o tempo de ensaio, alíquotas de 100 microlitros do meio líquido de incubação foram plaqueadas em meio sólido (com a mesma composição e as mesmas condições de cultivo). Os tempos de incubação no meio líquido foram de 3 horas; 10 e 45 dias de cultivo, em temperatura de 30°C. As colônias que cresceram em meio sólido foram contadas, codificadas, purificadas e estocadas de acordo com as técnicas descritas anteriormente.

3.2.5 - Prova da assimilação de açúcares

A prova de assimilação foi realizada através da técnica de *replica plate* (modificado de BARNET et al, 1990). Para o desenvolvimento da técnica foi construída uma placa matriz para fonte de origem dos inóculos. Uma placa de Petri descartável (140x15mm) foi preenchida com uma camada de 5mm de meio sólido (glicose 1% e YNB 0,67%), sobre o qual foi posicionado um *grid* com 96 poços. Em cada poço do *grid* foi inoculada uma colônia. A matriz foi incubada por 48 h a 30°C (**Figura 9**).



Figura 7: Bovinos Girolanda na Escola Agrotécnica de Manaus (A); Coleta de fezes do solo. À esquerda o bolo fecal, à direita a raspagem da superfície com exposição do interior. A coleta foi realizada na região mais clara (B); Coleta de fezes do reto do animal (C); Coleta de material da saliva de Bovinos. À esquerda o animal imobilizado, à direita a coleta com *swab* (D).

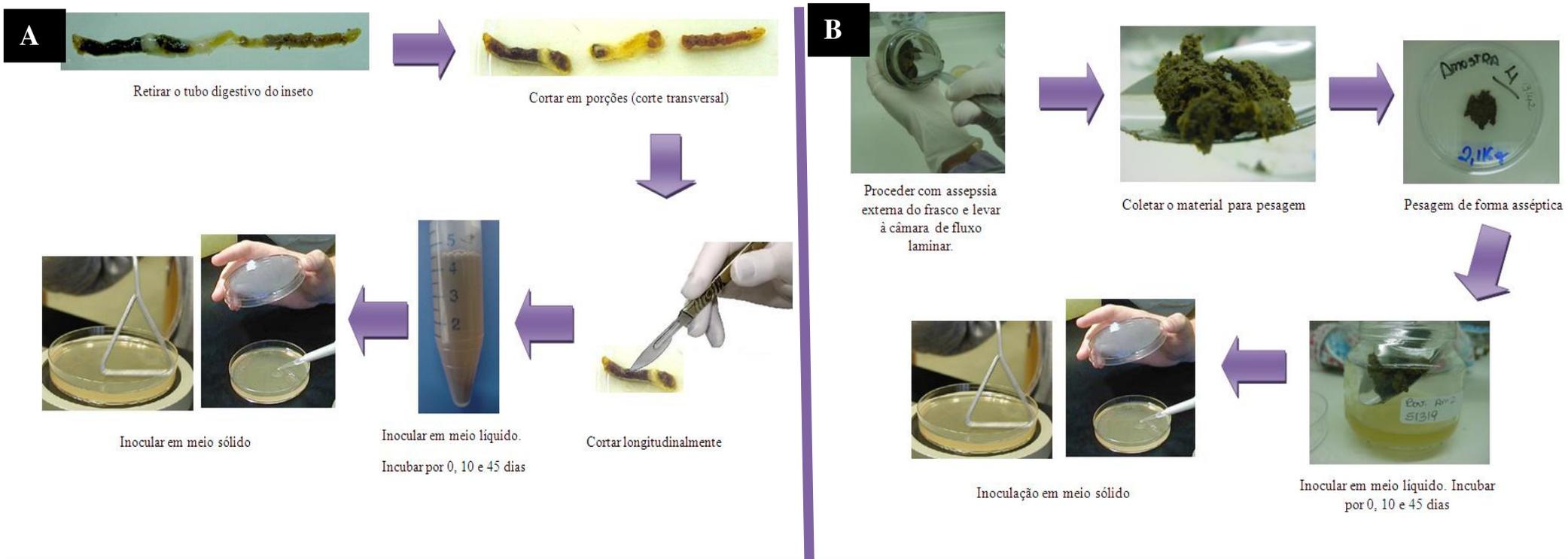


Figura 8: Esquema simplificado da metodologia para isolamento de microrganismo do tubo digestivo de insetos imaturos (A); fezes (B); e saliva (C).

As colônias foram repicadas, a partir da placa matriz, com replicador multifio, nas placas de ensaio. As placas de ensaio continham meio de cultura sólido com 1% da fonte de carbono a ser ensaiada e 0,67% de YNB como fonte de nitrogênio e o pH ajustado para 5,5. As fontes de carbono ensaiadas foram as pentoses xilose e arabinose; as hexoses glicose, manose e galactose; os dissacarídeos lactose e sacarose e o hidrolisado hemicelulósico (com 1% de açúcar redutor total). Os resultados foram registrados após 48h de crescimento.

Após o crescimento nas placas de ensaio, cada colônia foi classificada, através de análise qualitativa, para produção de biomassa a partir da fonte de carbono em questão. As colônias que excederam 0,8 mm de diâmetro nos três meios de interesse (hidrolisado hemicelulósico, xilose e arabinose) foram selecionadas para ensaios posteriores.

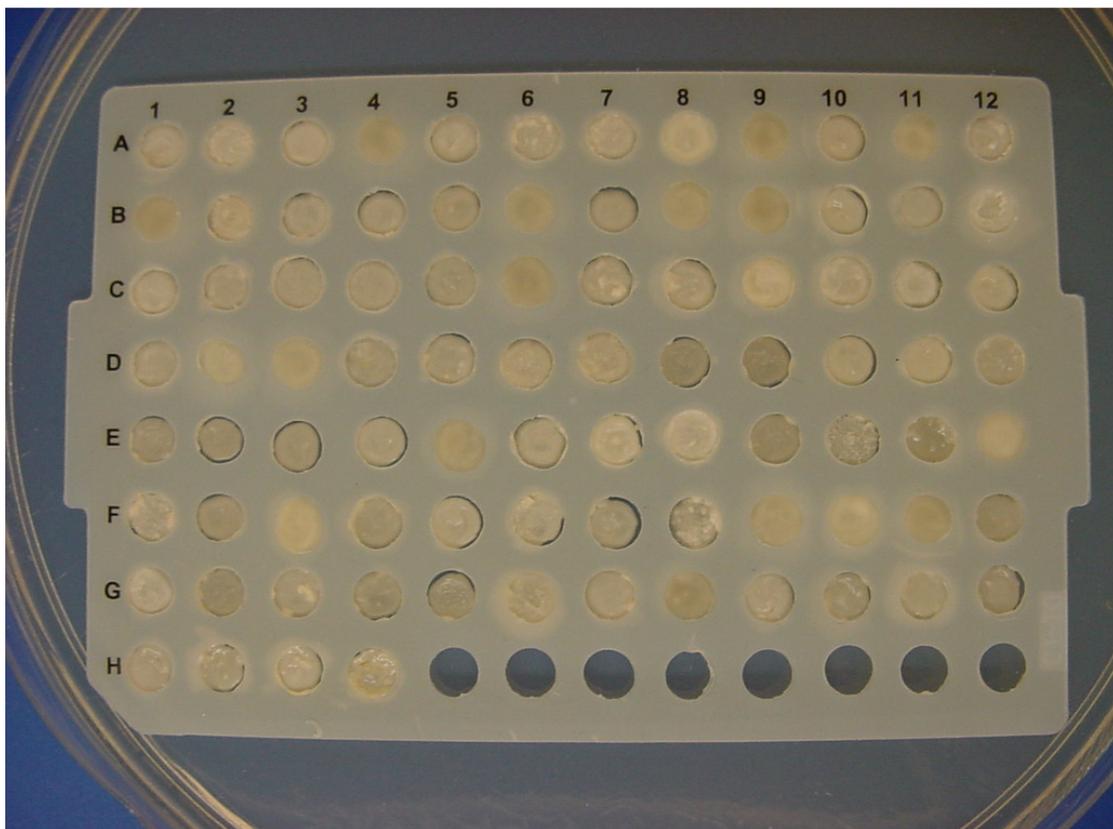


Figura 9: Prova de assimilação de açúcares: Exemplo de Placa Matriz com 48h de incubação.

3.2.6 - Identificação molecular

A identificação molecular foi procedida com as leveduras selecionadas nos ensaios de assimilação de açúcares.

A extração de DNA total foi conduzida pelo método de Harju *et al*, 2004 modificado (**anexo 6.2.1**). A região amplificada compreendeu parte da região 18S, as regiões não codificadoras ITS-1 e ITS-2, bem como a região 5.8S (completas) e parte do DNA ribossomal 26S. Os *primers* utilizados foram ITS-1(CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG).e ITS-4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) ver figura **Figura 5**. O sequenciamento foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (USP).

As seqüências foram comparadas com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) através do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*: www.ncbi.nlm.nih.gov). Com base nas seqüências, uma árvore filogenética foi construída pelo método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-joining*) e com teste de filogenia *bootstrap* com 1000 réplicas, utilizando-se o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*: <http://www.megasoftware.net>).

Para compor a árvore filogenética, foram inseridas: seqüências relativas às leveduras isoladas e selecionadas neste trabalho, alguns padrões obtidos no banco do NCBI e 04 seqüências de leveduras (IB04L; IB04R; IB09 e LC27) que foram isoladas a partir de insetos maduros (*Colosoma sp* – Coleoptera), em meio com hidrolisado hemicelulósico².

² O isolamento de leveduras a partir de insetos maduros (*Colosoma sp*) foi realizado pelo professor Msc Italo Matos - UFAM - <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4762472D9>

3.3 – Resultados e Discussão

3.3.1 - Isolamento de microrganismos

De todas as fontes biológicas foi possível isolar leveduras. A quantidade de fungos filamentosos presentes nas amostras foi desprezível e não foram detectadas bactérias na coleção. Algumas placas foram selecionadas para ilustração do isolamento (**Figura 10**). Na **Figura 11** constam fotografias com exemplos de visualização em microscopia óptica e na **Figura 12** fotografia de microscopia eletrônica.

A metodologia utilizada para as fontes biológicas como larvas e saliva de bovinos resultou em placas de isolamento com quantidade reduzida e estimável de colônias. Já a metodologia utilizada para isolamento a partir de fezes de bovino resultou em várias placas de isolamento com número excessivo de colônias. Ainda assim, foi possível isolar e purificar eficientemente microrganismos unicelulares oriundos das amostras de fezes. Como o número de amostras das diversas fontes, bem como a metodologia de coleta e isolamento foram distintas, não foi possível comparar a quantidade de colônias unicelulares isoladas. Entretanto, a título informativo, entre todas as colônias isoladas, 127 foram coletadas de larvas, 36 de fezes e 74 da saliva dos bovinos, totalizando 237 colônias.

3.3.2 – Viabilidade no hidrolisado hemicelulósico

Das 237 colônias, 156 foram isoladas três horas após a pré-incubação das porções do trato digestivo em meio líquido, 43 foram isoladas após 10 dias de pré-incubação e 38 colônias foram isoladas após 45 dias de pré-incubação em meio líquido.

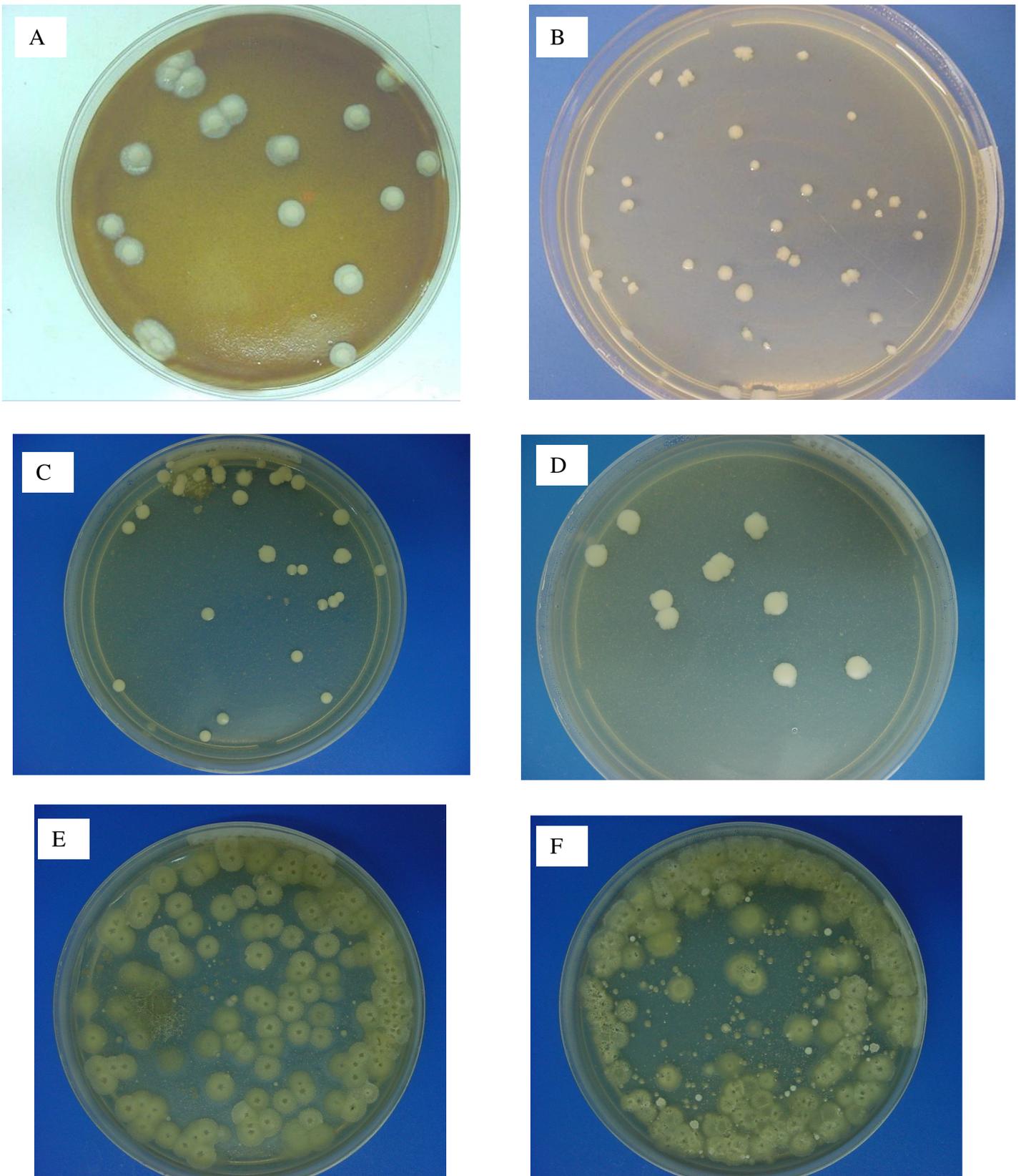


Figura 10: Placas de isolamento das diversas fontes biológicas

Fontes biológicas: **A:** Larva de *Cerambycidae* com três horas de pré-incubação; **B:** Larva de *Scarabaeidae* com 46 dias de pré-incubação; **C:** Saliva de bovino (semeadura com *Swab*); **D:** Saliva de bovino (semeadura com micropipeta e espalhamento com alça de vidro); **E:** Fezes de bovino coletada do solo; **F:** Fezes de bovino coletada do reto do animal.

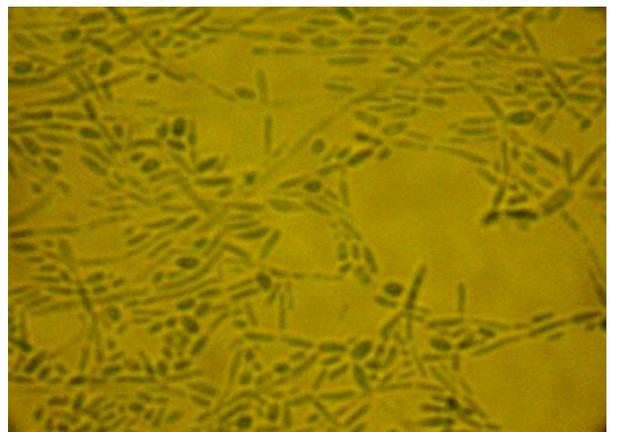
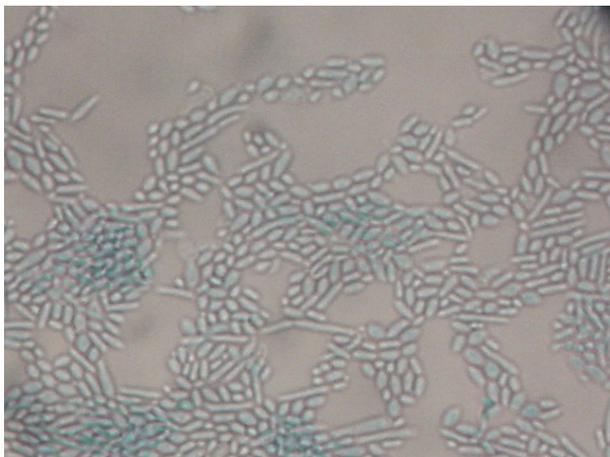
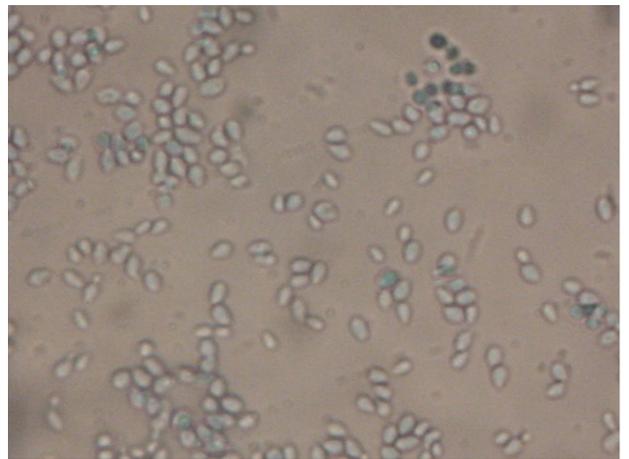
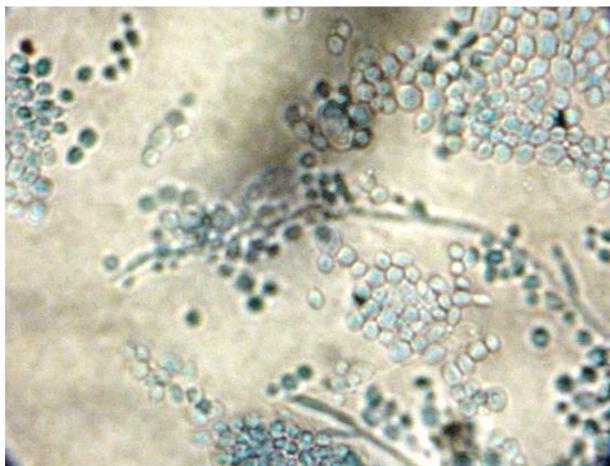
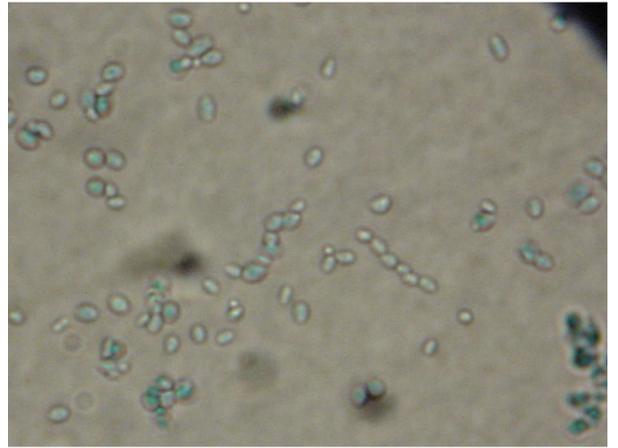
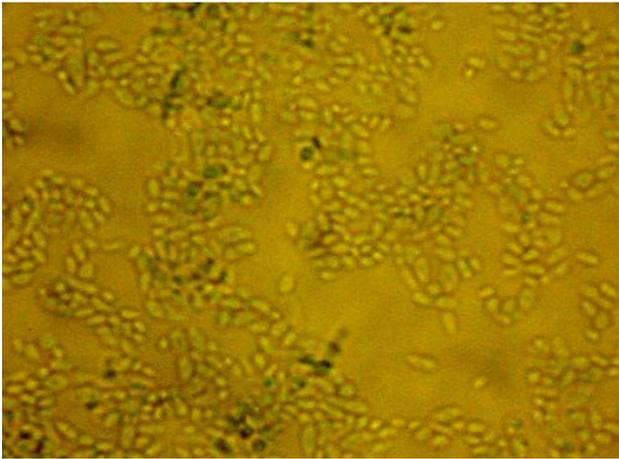


Figura 11: Exemplo de leveduras isoladas, observadas em microscópio óptico com aumento de 400x.

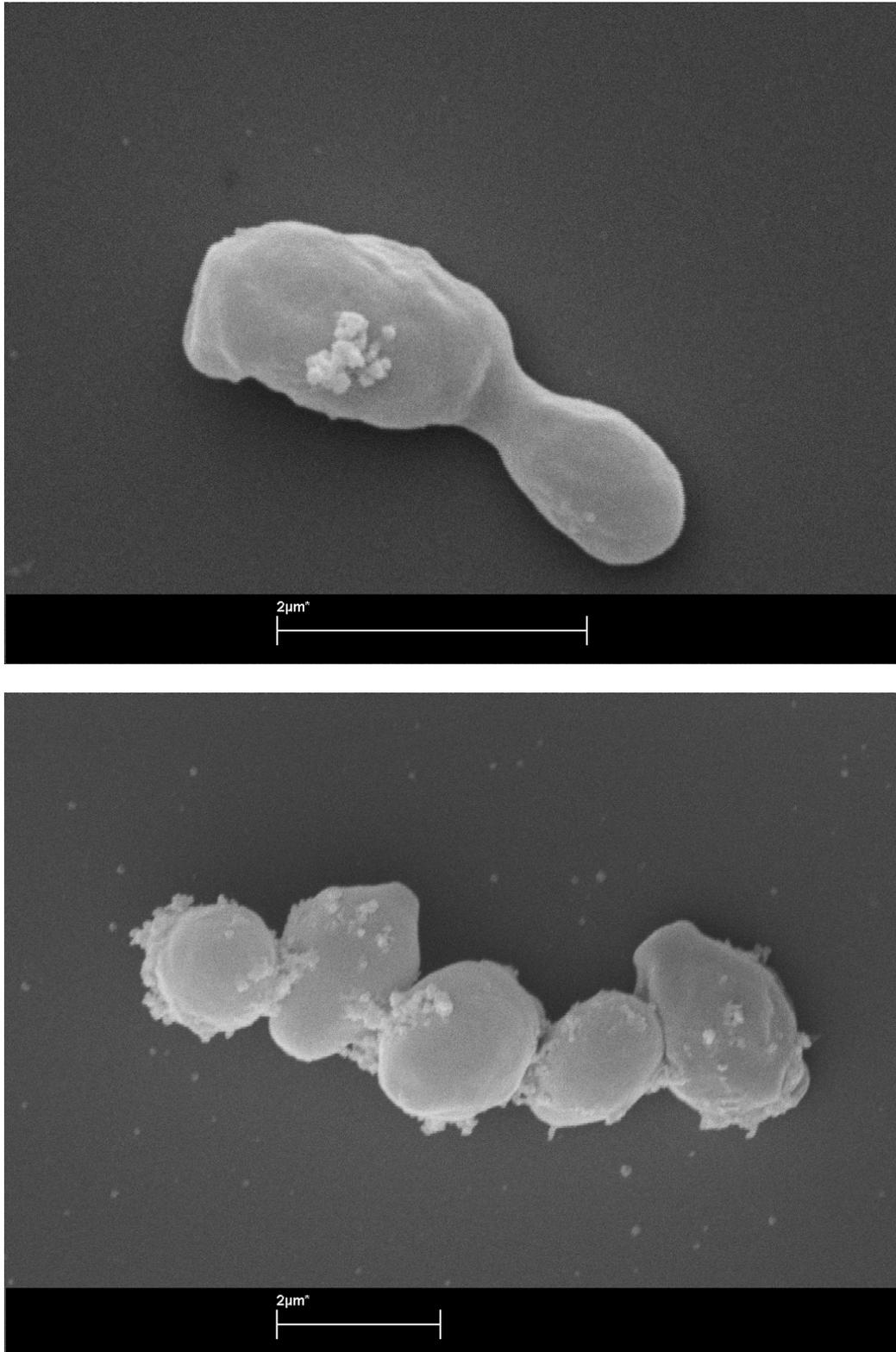


Figura 12: Microscopia eletrônica de uma cepa isolada de inseto imaturo (L04P1C29R46a). Esta levedura isolada teve 100% de similaridade com *Meyerozyma guilliermondii* (ver **figura 14**).

Créditos da fotografia: Doutora Ágata Cristiane Huppert Giancoli
NAP/MEPA – Núcleo de Apoio À Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicadas à Agricultura
(ESALQ – USP)

3.3.3 - Prova de assimilação de açúcares

Entre as leveduras ensaiadas, 125 foram capazes de produzir biomassa utilizando as três fontes de interesse (xilose, arabinose e hidrolisado hemicelulósico). O perfil de assimilação das leveduras ensaiadas está descrito na **Tabela 3**. Na **Figura 13** constam exemplos fotográficos das placas de assimilação nestes meios de cultura.

Tabela 3: Número de colônias de leveduras isoladas de acordo com o perfil de assimilação de diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono			Número de leveduras isoladas
Xilose	Arabinose	Hidrolisado Hemicelulósico	
+	+	+	125
+	+	-	1
+	-	+	51
+	-	-	0
-	+	+	6
-	+	-	0
-	-	+	47
-	-	-	0

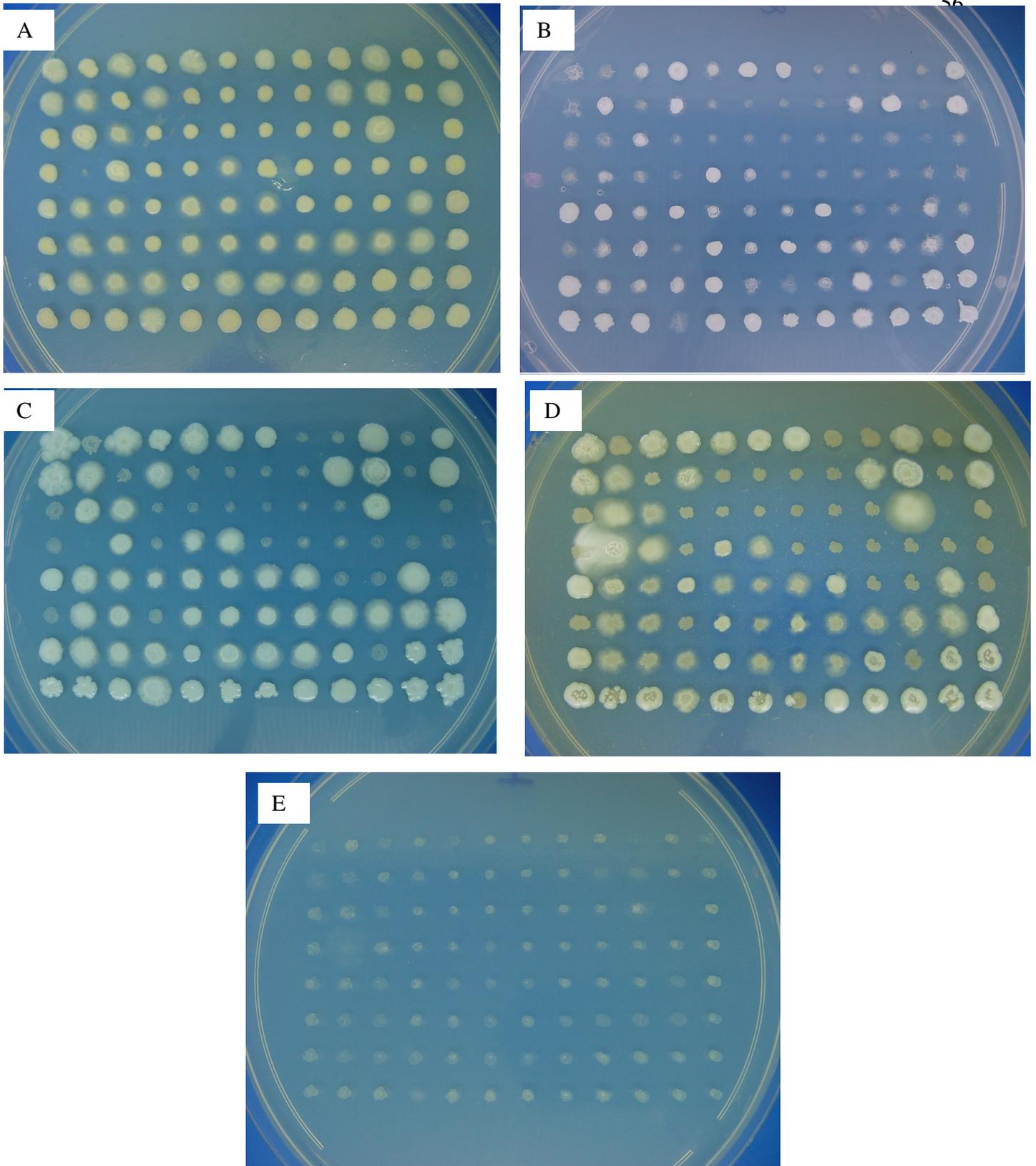


Figura 13: Prova de assimilação de açúcares. **A:** glicose; **B:** Arabinose; **C:**Xilose; **D:** Hidrolisado hemicelulósico; **E:** Controle negativo (somente fonte de nitrogênio)

3.3.4 - Identificação molecular

Foi possível extrair DNA de todas as colônias utilizadas. Todas as amostras, exceto uma, foram amplificadas. Um gel com o resultado da amplificação foi selecionado para exemplificação (**Figura 14**).

Através da comparação das sequências no NCBI, aquelas submetidas tiveram similaridade com 07 diferentes espécies, formando 05 grupos. A distribuição do número de leveduras selecionadas, classificadas de acordo com as fontes de isolamento está disponível na **Tabela 4**. A árvore filogenética está disponível na **Figura 15**.

Segundo Rivera et al (2007), sequências do DNA ribossomal 18S, bem como os domínios D1/D2 da subunidade 26S são fontes confiáveis para identificação de leveduras.

A maioria das leveduras selecionadas foi agrupada junto com as espécies *Meyerozyma guilliermondii* e *Meyerozyma caribbica*, cujas sequências estão depositadas no NCBI. O total é de 37 indivíduos isolados neste trabalho. A porcentagem de identificação das sequências com as depositadas variou entre 99 e 100%. O gênero *Meyerozyma* é uma reclassificação de do gênero *Pichia*. Portanto, estes microrganismos foram conhecidos até pouco tempo como *Pichia guilliermondii* e *Pichia caribbica*. Estes resultados de isolamento coincidem com outros referentes ao isolamento de *Meyerozyma caribbica* e diferentes espécies associadas ao grupo filogenético de *M. guilliermondii*, a partir do tubo digestivo de insetos da ordem Coleoptera (HAMMONS et al, 2008; RAO et al, 2007; RIVERA et al, 2007; SUNG-OUI et al 2005, 2004). Existem relatos de isolamento de *Meyerozyma caribbica* a partir de outras fontes como tubo digestivo de *Aedes aegypti* (GUSMÃO et al, 2007), assim como de bebidas fermentadas (HIDALGO et al, 2012; PAPALEXANDRATOU e VUYST, 2011). *M. guilliermondii* já foi isolada como levedura endofítica (ZHAO et al, 2010); a partir de leite de

bovinas (ZARAGOZA *et al*, 2011); e do trato genital de camelos fêmeas (SHOKRI et al, 2010).

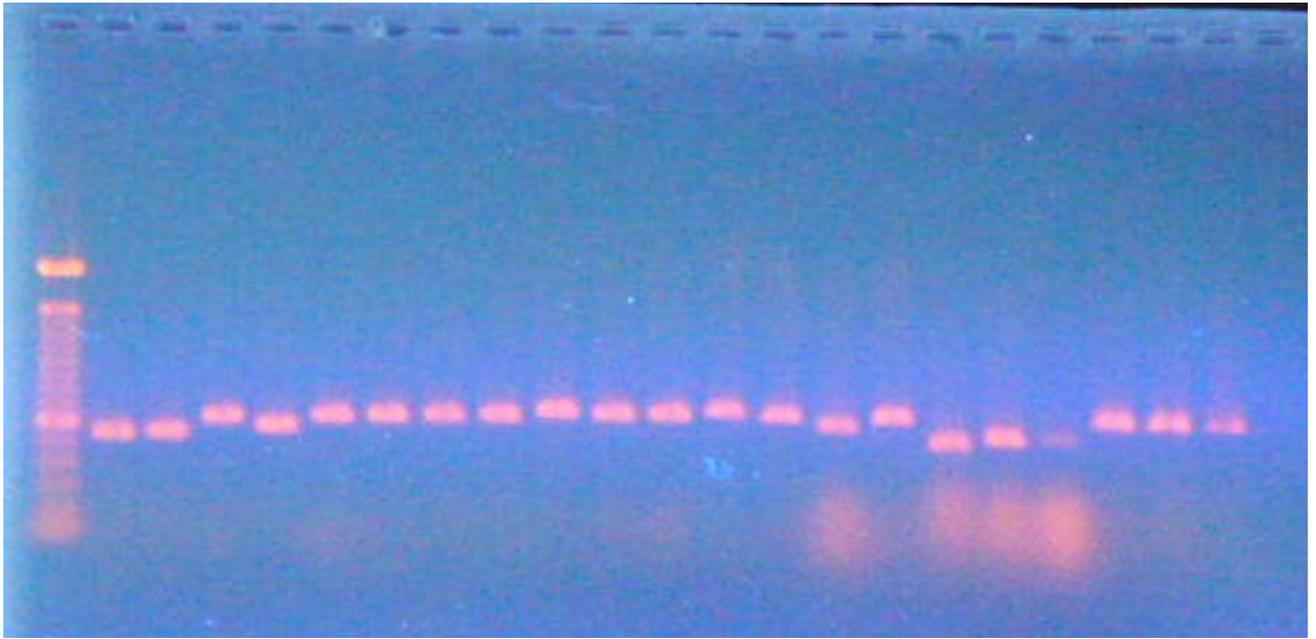


Figura 14: Exemplo de gel com amplificação das sequências de DNA ribossomal.

Tabela 4: Número de colônias selecionadas e sequenciadas classificadas de acordo com a fonte de isolamento e a espécie mais próxima no alinhamento das sequências.

Espécie de maior proximidade no alinhamento das sequências	Número de leveduras selecionadas e sequenciadas por Fonte de isolamento						Subtotal (por espécie)
	Tubo digestivo de inseto imaturo (<i>Cerambycidae</i>)	Tubo digestivo de inseto imaturo (<i>Scarabaeidae</i>)	Tubo digestivo de inseto maduro (genero)	Saliva de bovinos fêmeas (Girolanda)	Fezes de bovinos (chão)	Fezes de bovinos fêmeas (reto)	
<i>Candida etanolica</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>Candida lignohabitans</i>	9	2	0	0	0	0	11
<i>Meyerozyma caribbica</i>	11	17	0	1	1	0	30
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2	2	2	2	1	0	9
<i>Pichia kudriavzevii</i>	0	0	0	1	1	0	2
<i>Trichosporon loubieri</i>	0	0	0	3	0	1	4
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1	1	2	0	0	0	4
total	23	22	4	7	4	1	61

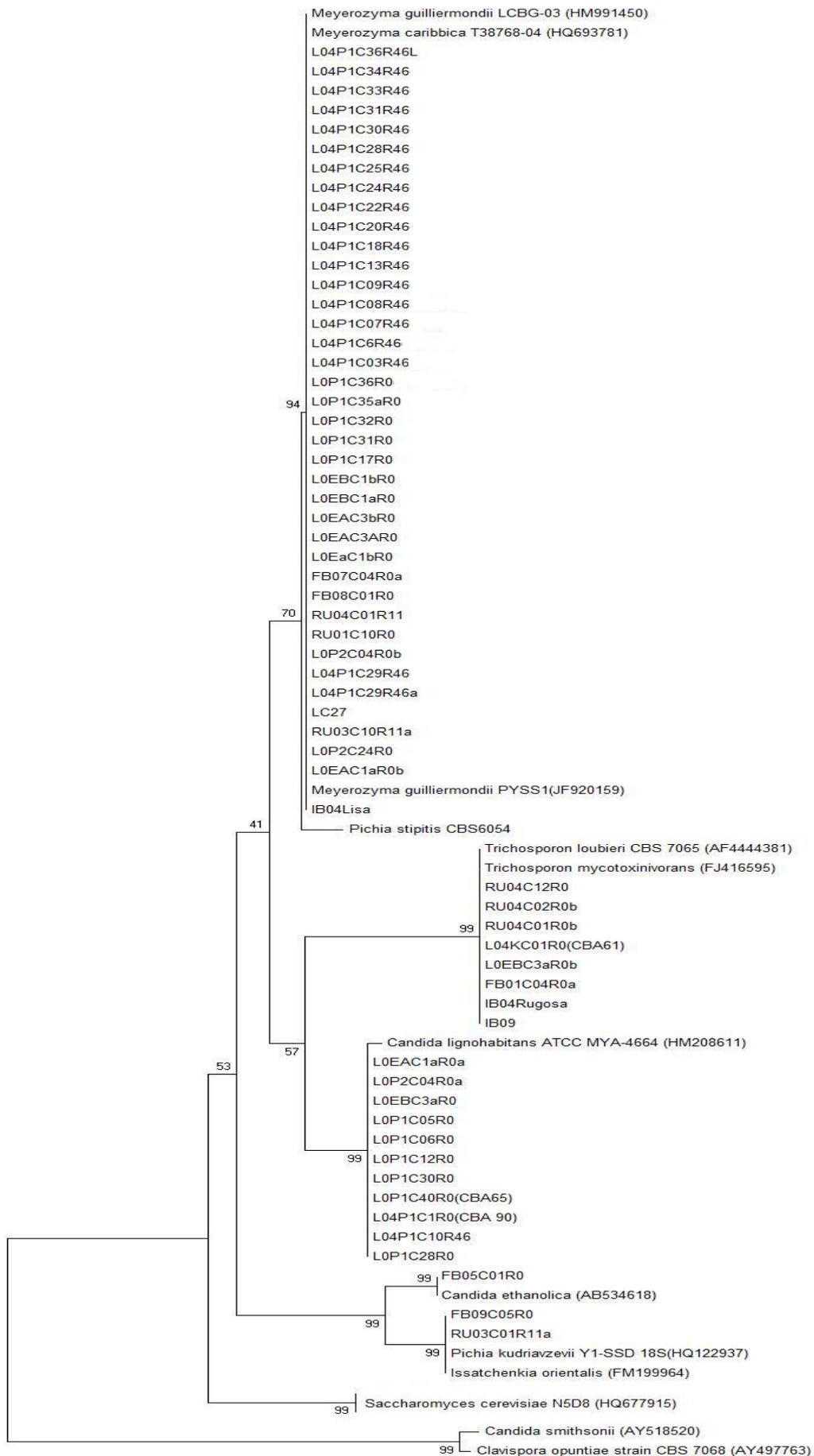


Figura 15: Árvore filogenética contendo as seqüências das leveduras isoladas em meio hidrolisado e selecionadas nos ensaios de assimilação.

A árvore foi construída por agrupamento de vizinhos (*neighbour-joining*) e foi gerada através do alinhamento de 57 seqüências de leveduras isoladas neste trabalho, 04 seqüências cedidas por Italo Matos e 06 seqüências de linhagens depositadas no NCBI. Os valores de cada nó dos ramos representam as réplicas de *bootstrap* (1000 réplicas)

Estas espécies são citadas na literatura como produtoras de xilitol (RAO et al, 2007; MICHEL, 2007). *M. caribbica* também pode ser utilizada na sacarificação do hidrolisado hemicelulósico, aumentando o rendimento na liberação de açúcares fermentáveis (SAUCEDO-LUNA et al, 2011).

Um dos grupos da árvore foi formado por 06 leveduras isoladas neste trabalho, duas sequências cedidas e as espécies depositadas no NCBI (*Trichosporon loubieri* e *Trichosporon mycotoxinivorans*). As sequências referentes à levedura FB01C04R0a (isolada de fezes) e às leveduras RU04C12R0; RU04C01R0b; RU04C02R0b (isoladas de saliva de bovinos) tiveram 99% de identificação com *T. loubieri*. Em relação à proximidade com *T. mycotoxinivorans*, a identificação variou entre 99% (IB09, L0EBC3aR0b) e 100%.(IB04R, L04C01R0). Estas duas espécies de *Trichosporon* têm sido descritas como leveduras patogênicas (HICKEY et al, 2010, 2010; GIRMENIA et al 2010; SHARMAN et al 2010; GABRIEL et al, 2011). As espécies são muito próximas nas análises através de árvores filogenéticas baseadas nas regiões D1/D2 do DNA ribossomal 26S e em aproximadamente 600pb do DNA ribossomal 18S (em ambas as regiões ITS – *Internal Transcribed Spacer*). *T. mycotoxinivorans* distingue-se de *T. loubieri* por sua habilidade de assimilar inulina e galactiol e pela incapacidade de crescer a 40°C. *T. mycotoxinivorans* pode ser utilizado para suprimir o efeito de micotoxinas como ocratoxina A e zearalenona, que causam danos a algumas criações de animais de corte, como porcos e frangos. O acréscimo desta levedura na alimentação de frangos causou decréscimo de toxinas no soro desses animais (HANIF et al, 2011; POLITIS et al, 2005; MOLNAR et al, 2004).`

Onze espécies isoladas formaram um grupo com *Candida lignohabitans*. Esta levedura já foi isolada do tubo gastrointestinal de insetos da ordem Coleóptera em conjunto com outras pertencentes ao grupo de *Sugiyamaella sp* e *Candida shehatae* (HOUSEKNECHT et al, 2011, WILLIAMS, 2011); a partir de partes ocas de talos de algodão (MAGANTI et al, 2012) e de

outros habitats florestais (KURTZMAN, 2007). Os autores abordam o isolamento da espécie sem comentar sobre suas características fisiológicas ou biotecnológicas específicas.

Somente uma das sequências obteve boa porcentagem de identificação (100%) com *Candida etanolica*.

Duas sequências de leveduras isoladas agruparam-se junto com *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*). Existem relatos de produção de etanol celulósico (hidrolisado lignocelulósico enriquecido em glicose) com a levedura termotolerante *Pichia kudriavzevii* em diversos estados de estresse, como altas temperaturas (40 a 43°C), elevadas concentrações de ácido sulfúrico e sal (sulfato de cálcio – gerado pela neutralização de hidrolisado). As fontes consistiram em hidrolisados lignocelulósicos diversos, a exemplo de talos e palha de algodão, com diversos tratamentos, incluindo hidrólise enzimática com celulases. Em altas temperaturas este microrganismo demonstrou melhor produção de etanol (até 200%) quando comparada à levedura *Sacharomyces cerevisiae* (OBEROI et al, 2011; ISONO et al, 2011; DHALIWAL et al, 2011; KAUR et al, 2011). Fonseca e colaboradores (2009) utilizaram uma cepa de *Isaatchenkia orientalis* para reduzir componentes tóxicos do hidrolisado hemicelulósico.

3.4 – Conclusão

A utilização do hidrolisado hemicelulósico (do bagaço de cana-de-açúcar) como meio seletivo propiciou o isolamento de cepas de leveduras capazes de utilizar este meio de cultivo como fonte de carbono para produção de biomassa. Isto reflete uma relativa tolerância do microrganismo aos inibidores gerados pela hidrólise desta biomassa vegetal. Vários indivíduos foram capazes de assimilar, tanto as hexoses, quanto as pentoses xilose e arabinose, açúcares normalmente disponíveis nos hidrolisados provenientes do material

lignocelulósico. Esta característica é importante para o melhor aproveitamento dos açúcares presentes na biomassa vegetal.

Depois da importação do açúcar para a célula microbiana, este pode ser destinado a diferentes vias metabólicas que variam entre as fermentações a xilitol e etanol, acúmulo de biomassa ou a produção de outras moléculas de interesse.

A identificação das leveduras isoladas comprovou que cepas com potencial biotecnológico para aproveitamento de resíduos lignocelulósicos foram isoladas a partir das fontes escolhidas, contribuindo com a construção de um banco de células microbianas que poderá ser explorado para agregar valor aos resíduos agroindustriais, aproveitando os carboidratos que ainda podem ser metabolizados na transformação em produtos de interesse.



Produção de Biomassa
Microbiana a Partir do
Hidrolisado Hemicelulósico

FBO9050

R004

4 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA A PARTIR DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

4.1 - Introdução

Os resíduos das indústrias alimentícias e agrícolas apresentam-se como porção significativa desses processos econômicos. Estima-se que em torno de 30% da biomassa vegetal utilizada como matéria-prima transforme-se em resíduo após o processamento (UGWUANYI *et al*, 2009).

O Brasil tem atributos que o posicionam privilegiadamente para o aproveitamento da biomassa. As variadas condições climáticas e ambientais do país compõem um cenário com múltiplas características de interesse: grande incidência solar, água em abundância, rica biodiversidade, ampla disponibilidade de recursos renováveis, existência de culturas agrícolas de grande extensão, bem como produção de diversos resíduos agroindustriais com destaque para indústria canavieira (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010; CENTRO de GESTÃO e ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2010).

A natureza e quantidade dos resíduos agroindustriais variam com o tipo de cultura e com a tecnologia de processamento. Geralmente, os resíduos agroindustriais tais como palhas de trigo, cevada ou arroz, talos e espigas de milho, bagaços de mandioca e cana-de-açúcar são ricos em material lignocelulósico. A reutilização deste material pode incrementar a economia da produção, desde que seja utilizada tecnologia adequada às características da biomassa vegetal. Após o devido reprocessamento, este material pode ser empregado em fermentações por microrganismos, a fim de produzir compostos de interesse (UGWUANYI *et al*, 2009).

Com vistas à utilização das frações celulósicas e hemicelulósicas da biomassa vegetal, há necessidade de processamento adicional para liberação de carboidratos fermentáveis. A fração celulósica, após os tratamentos adequados, libera monômeros de glicose, açúcar

universal utilizado por quaisquer microrganismos. Entretanto, a fração hemicelulósica libera grandes quantidades de pentoses, que não são amplamente metabolizáveis. O completo aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos pelos microrganismos requer algumas características microbianas específicas com tolerância: ao ambiente das dornas de fermentação, aos inibidores de crescimento gerado pelos tratamentos impostos à biomassa vegetal e ao produto final formado, requerendo ainda a capacidade de metabolizar pentoses, além das hexoses do meio.

As maiores pesquisas em utilização microbiana dos resíduos lignocelulósicos concentraram-se na produção de etanol combustível e do adoçante xilitol (HUANG et al, 2011; HUININ et al, 2011; LING et al, 2011; BETANCUR e PEREIRA Jr, 2010). Entretanto, vários outros produtos podem ser gerados a partir desta matéria-prima como: enzimas celulolíticas, ácidos orgânicos, compostos farmacêuticos e enriquecimento em proteínas aplicado à ração animal (NYGARD et al, 2011; UGWUANYI et al, 2009; PANDEY et al, 2000).

Em virtude da grande demanda ou do alto valor agregado de produtos como etanol e xilitol, respectivamente, pouca atenção tem sido empregada na produção de biomassa microbiana, a partir dos resíduos. Entretanto, esta também é uma forma economicamente viável de aproveitamento da matéria lignocelulósica. O aproveitamento do potencial microbiano para produção de proteínas comestíveis ocorre desde a primeira guerra mundial, quando os primeiros esforços foram empreendidos na Alemanha. Posteriormente, o cultivo de leveduras, em diferentes fontes de carbono, foi realizado em escala comercial. A produção de biomassa microbiana tem vantagens próprias: é independente das condições climáticas (por ocorrer em ambientes controlados), é também muito rápida devido ao acelerado crescimento dos microrganismos e pode ser adaptada para melhor composição de proteínas, através de

variados tipos de manipulação das condições de cultivo ou de diferentes processos adaptativos impostos aos microrganismos (SINGH e MISTRA, 1995).

Historicamente, a produção de biomassa microbiana utilizando biomassa vegetal como fonte de carbono, foi utilizada através de processos fermentativos no estado sólido, em pilhas de matéria lignocelulósica. (ORZOCO et al, 2008; UBALUA, 2007; OBOH e ELUSIYAN, 2007; OBOH, 2006; FAGBEMI e IAJAH, 2006; PANDEY e SOCCOL, 1998; NIGAM, 1994; RODRIGUEZ-VAZQUEZ e DIAZCERVANTES, 1994; IYO e ANTAI, 1991).

Existem relatos de enriquecimento nutricional de resíduos em meio semissólido (UGWUANYI et al, 2009) mas poucos são os trabalhos relatando a extração de carboidratos dos resíduos para produção de biomassa microbiana em meio líquido (hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos). Esta metodologia reaproveita as frações celulósicas e hemicelulósicas dos resíduos utilizando a maquinaria das indústrias que já utilizam processos fermentativos em meio líquido, a exemplos das indústrias alcooleiras. Existem plantas demonstrativas, que empregam a tecnologia para produção de etanol de segunda geração, com o aproveitamento do resíduo lignocelulósico disponível. Empresas como Chempolis (Finlândia), St. Petersburgo State Forest-Tecnal Academy (Russia) e Blue Fire Ethanol (EUA e Japão) empregam o processo de hidrólise do material lignocelulósico com ácido, enquanto Iogen (Canadá), KL Energy (EUA) e Verenium (EUA) utilizam hidrólise enzimática para liberação de açúcares (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2010).

Vários substratos podem ser utilizados como fonte de carbono para acúmulo de biomassa microbiana, com a finalidade de produção de suplementos alimentares para meios de cultivo microbiano (extrato de leveduras), enriquecimento de rações animais (*single cell protein* – SCP), através do cultivo em meio líquido (du PREZZ, 1989, ALMEIDA E SILVA et al, 1995; PESSOA Jr et al, 1996; ALMEIDA E SILVA et al, 2003; DUARTE et al, 2008).

Neste contexto, este estudo sugere a utilização das pentoses, liberadas pela hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, para produção de biomassa microbiana, utilizando levedura selvagem, isolada de ambiente lignocelulósico natural.

4.2 – Material e métodos

4.2.1 – Seleção da levedura para produção de biomassa

Com a finalidade de produzir biomassa microbiana, utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana-de-açúcar, foram realizados ensaios para escolha de uma cepa com melhor capacidade de produzir biomassa a partir deste substrato. Utilizando os ensaios de assimilação de açúcares realizados previamente (**capítulo 4**), escolheram-se as leveduras que obtiveram melhor resultados em relação à assimilação das seguintes fontes de carbono: hidrolisado hemicelulósico, xilose e arabinose (**Tabela 3**). Entre as 125 leveduras que assimilaram as três fontes, 57 se destacaram quanto ao tamanho e foram selecionadas. Entre estas, foram escolhidas as 04 que mais se destacaram, tanto no tamanho das colônias, quanto à fermentação de glicose. Estas leveduras foram isoladas de diferentes fontes utilizadas neste trabalho: fezes de bovinos (FB07C04R0a e FB09C05R0), saliva de bovinos fêmeas (RU047C01R11) e tubo intestinal de insetos imaturos (L0P2C24R0). Três delas foram agrupadas em conjunto com *Meyerozyma caribbica* e *M. guilliermondii* na árvore filogenética (**Figura 15**), enquanto que uma (FB09C05R0) foi agrupada junto com *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*). Uma cepa de *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*- CBS 6054) foi utilizada como padrão para comparação da produção de biomassa.

4.2.1.1 – Adaptação das células ao meio hidrolisado hemicelulósico

Cada cepa foi adaptada ao meio hidrolisado através de uma sequência de 3 pré-inóculos com concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico. Uma alçada das culturas foi inoculada em 75 mL de meio contendo 25% de hidrolisado hemicelulósico e suplemento nitrogenado (ureia, 1,25g/L; extrato de leveduras, 1,5g/L, KH_2PO_4 , 1,1g/L, e solução de sais e ácido cítrico 40mL/L, pH 5.5 – **anexo 6.1.2.2**) contido em frascos cônicos de 125mL fechados com rolhas de poliuretano (para propiciar livre transferência de oxigênio de forma padronizada). As células foram cultivadas a 30°C, sob 150rpm de agitação por 48

horas. Findo o período de incubação, as culturas foram centrifugadas (7.000rpm/20min.) de forma asséptica e a biomassa foi transferida para um meio novo, contendo 50% de hidrolisado hemicelulósico, nas mesmas condições de ensaio. As culturas foram incubadas por mais 48 horas. Na terceira fase da adaptação, o processo foi repetido e o conteúdo em biomassa foi transferido para um novo meio de cultura, contendo 80% de hidrolisado hemicelulósico. O período de incubação nesta fase foi de 72 horas.

4.2.1.2 – Curva de crescimento em meio hidrolisado hemicelulósico

Findo o período de adaptação, as células (3,5g/L) foram inoculadas em 230mL de meio contendo 80% de hidrolisado hemicelulósico (contendo 6,61g/L de xilose) em frascos cônicos de 1000mL, nas mesmas condições de cultivo e os mesmos suplementos descritos para os pré-inóculos. O tempo de cultivo foi de 40 horas. Os frascos foram fechados com rolhas de poliuretano contendo mangueira para coleta periódica das amostras. Uma unidade autoclavada de filtro *milipore* (0,45 μ m) foi adaptada na saída da mangueira para assegurar as condições assépticas (**Figura 16**). Através do filtro foram insuflados 10mL de ar, antes de cada coleta, para liberar o possível acúmulo de meio e células na mangueira. Alíquotas de 04mL foram coletadas a cada 5 horas de cultivo. As amostras foram centrifugadas (12.000rpm/5min.) em microtubos de 2.000 μ L. Os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de açúcares e o precipitado foi desidratado e pesado para acompanhamento da formação de biomassa.

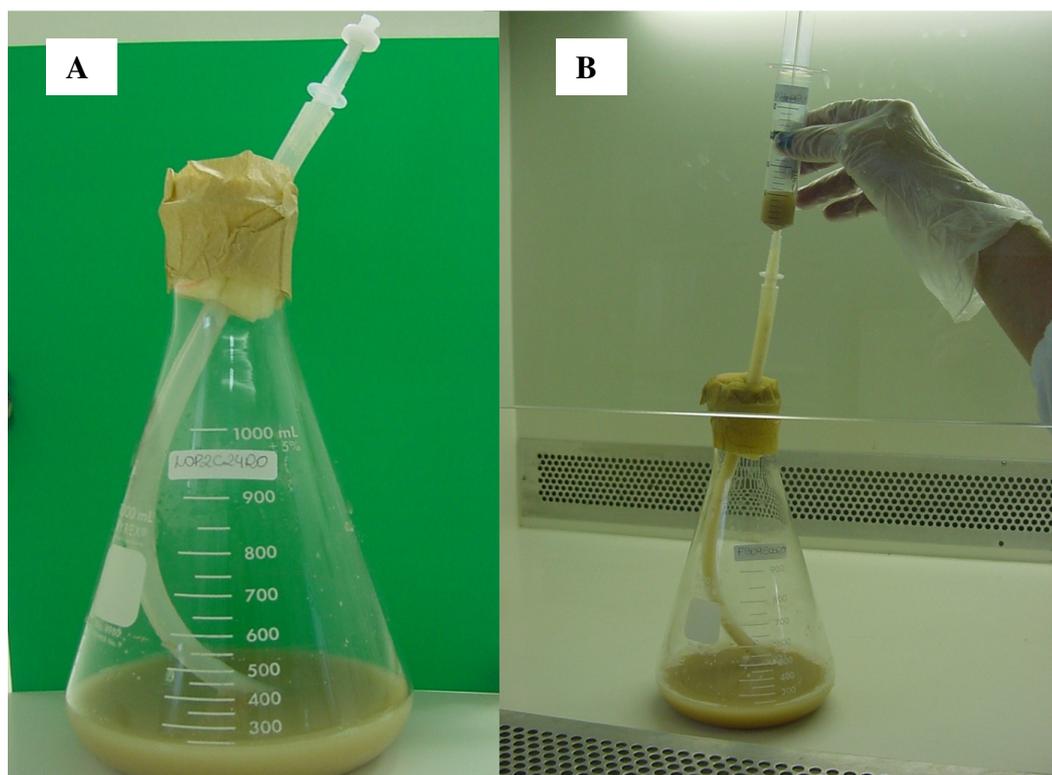


Figura 16: Frasco com rolha de poliuretano para livre transferência de oxigênio (de forma padronizada), contendo mangueira para coleta de amostras (A); Coleta da amostra utilizando seringa esterilizada (B).

4.2.2 – Otimização da produção de biomassa

A levedura com maior produção de biomassa e maior consumo de xilose, na curva de crescimento (4.2.1.2) foi selecionada para os ensaios de otimização da produção de biomassa.

Dois delineamentos experimentais do tipo composto central rotacional (DCCR) completos foram realizados para otimização da produção de biomassa pela levedura selecionada, utilizando o programa Minibab.

4.2.2.1. – Influência do pH inicial, ureia e extrato de leveduras

O primeiro delineamento foi construído empregando-se a metodologia de superfície de resposta, com três fatores (2^3), completo, para investigar o efeito de três variáveis independentes (pH, ureia e extrato de leveduras) sobre a produção de biomassa (**Tabela 5**). As variáveis dependentes (respostas) foram produção de biomassa e consumo de xilose. O

delineamento foi composto de 20 ensaios com 6 repetições no ponto central (**Tabela 6**). As condições de ensaio foram as seguintes: frascos com 500mL de volume útil e 120mL de meio (volume de trabalho) com 83% de hidrolisado hemicelulósico, KH_2PO_4 (1.1g/L), solução de sais e ácido cítrico (40mL/L – **anexo 6.1.2.2**). A temperatura de ensaio foi 30°C, e agitação de 150rpm. A cada 5 horas de cultivo foi retirada uma amostra de 4mL que foi centrifugada em microtubos (12.000rpm/5min). O sobrenadante foi congelado para análise de açúcares e o precipitado foi pesado para acompanhamento da formação de biomassa. O tempo de cultivo foi de 15 horas.

Tabela 5: Variáveis e níveis do primeiro planejamento experimental para produção de biomassa

Fatores	-α	Nível inferior	Ponto central	Nível superior	+α
pH	5	5,61	6,5	7,39	8
Ureia	0	0,81	2	3,19	4
Extrato de Leveduras	0	0,81	2	3,19	4

Tabela 6: Planejamento composto central em valores não codificados para o primeiro planejamento experimental para produção de biomassa. Os ensaios 1 a 8 correspondentes aos pontos fatoriais, 9 a 14 aos pontos axiais, 15 a 20 às repetições do ponto central

Ensaio	Variáveis dependentes com valores não codificados		
	pH inicial	Ureia	Extrato de leveduras
1	5,61	0,81	0,81
2	7,39	0,81	0,81
3	5,61	3,19	0,81
4	7,39	3,19	0,81
5	5,61	0,81	3,19
6	7,39	0,81	3,19
7	5,61	3,19	3,19
8	7,39	3,19	3,19
9	5	2	2
10	8	2	2
11	6,5	0	2
12	6,5	0	2
13	6,5	2	0
14	6,5	2	0
15	6,5	2	2
16	6,5	2	2
17	6,5	2	2
18	6,5	2	2
19	6,5	2	2
20	6,5	2	2

4.2.2.2 – Influência das concentrações de hidrolisado hemicelulósico e xilose

O segundo delineamento também foi construído empregando-se a metodologia de superfície de resposta, com dois fatores (2^2), completo, para investigar o efeito de duas variáveis independentes (concentração de hidrolisado e concentração de xilose) sobre a produção de biomassa (**Tabela 7**). As variáveis dependentes (respostas) foram produção de biomassa e consumo de xilose. O delineamento foi composto de 13 ensaios com 5 repetições no ponto central (**Tabela 8**). As condições de ensaio foram: frascos com 500mL de volume útil contendo 120mL (volume de trabalho). O inóculo inicial foi de 3,5g/L, temperatura de ensaio foi 30°C, e agitação de 150rpm. O meio foi suplementado com KH_2PO_4 (1,1g/L) e solução de sais e ácido cítrico (40mL/L - **anexo 6.1.2.2**). As concentrações de ureia e extrato de leveduras bem como o pH utilizado foram definidos de acordo com os resultados do primeiro delineamento experimental (item 4.2.2.1.) . A cada 5 horas de cultivo foi retirada uma amostra de 5mL que foi centrifugada em microtubos (12.000rpm/5min). O sobrenadante foi congelado para análise de açúcares e o precipitado desidratado foi pesado para acompanhamento da formação de biomassa. O tempo de cultivo foi de 27 horas.

Tabela 7: Variáveis e níveis do segundo planejamento experimental para produção de biomassa

Fatores	$-\alpha$	Nível inferior	Ponto central	Nível superior	$+\alpha$
Concentração de xilose	14	19,27	32	44,73	50
Extrato de Leveduras	25	34,52	57,5	80,48	90

Tabela 8: Planejamento composto central em valores não codificados para o primeiro planejamento experimental para produção de biomassa. Os ensaios 1 a 4 correspondentes aos pontos fatoriais, 5 a 8 aos pontos axiais, 9 a 13 às repetições do ponto central.

Variáveis dependentes com valores não codificados		
Ensaio	Concentração de xilose	Concentração de hidrolisado
1	19,27	34,52
2	44,73	34,52
3	19,27	80,48
4	44,73	80,48
5	14	57,5
6	50	57,5
7	32	25
8	32	90
9	32	57,5
10	32	57,5
11	32	57,5
12	32	57,5
13	32	57,5

4.2.2.3 – Ensaio para definição da temperatura

O experimento foi realizado em duplicata, em frascos cônicos com volume útil de 500mL. As células foram inoculadas na concentração inicial de 3,5g/L em 120mL de meio com as concentrações de extrato de leveduras, ureia, pH, hidrolisado hemicelulósico e xilose definidas nos delineamento experimentais precedentes (item 4.2.2.1 e 4.2.2.2). O meio foi suplementado com KH_2PO_4 (1,1g/L) e solução de sais e ácido cítrico (40mL/L). As temperaturas ensaiadas foram 30 e 35°C e agitação utilizada foi de 150rpm. O tempo de cultivo foi de 35 horas.

4.2.3 – Ensaios em fermentador para produção de biomassa

Para realização dos ensaios de produção de biomassa, sob condições controladas, foi utilizado o fermentador BIOFLO 110. O vaso de fermentação de fundo redondo e volume nominal de 5,5 L foi abastecido com 2,5L de meio de cultura com KH_2PO_4 1,1g/L; solução de sais e ácido cítrico 40mL/L e concentrações de extrato de leveduras, xilose, hidrolisado e ureia, bem como os parâmetros pH e temperatura definidos nos ensaios anteriores. O pH foi monitorado mas não controlado. A temperatura foi mantida por meio do acoplamento de uma manta de aquecimento e monitoração por termômetro inserido no poço próprio, banhado com glicerina líquida para efetivar a transferência de calor. Coaxialmente ao fermentador foram dispostos uma turbina de *Rushton* de 6 pás montadas, submersa no meio e 04 chicanas. A agitação imposta foi de 300rpm e aeração de 2,3L/min. Após adaptação ao meio de cultura (conforme descrito anteriormente - 4.2.1.1) foram inoculados 2,5g/L de células da levedura selecionada nos ensaios anteriores.

Para acompanhamento do consumo de açúcares e produção de biomassa, alíquotas foram retiradas (a cada 2,5 horas de cultivo) de forma asséptica, utilizando-se do amostrador submerso e do tubo de colheita.

4.2.4 – Parâmetros cinéticos avaliados

Os parâmetros cinéticos das fermentações foram calculados conforme descrito na **Tabela 9**.

Parâmetro	Símbolo utilizado	Função	
Taxa volumétrica de produção em Biomassa (Produtividade)	Q_x	Valor do acúmulo em massa seca (g/L) pelo tempo de cultivo (h)	$g/L^{-1}h^{-1}$
Taxa volumétrica de produção de Xilitol (Produtividade)	Q_{xilt}	Valor da produção de xilitol (g/L) pelo tempo de cultivo (h)	$g/L^{-1}h^{-1}$
Taxa volumétrica do consumo em açúcares	Q_s	Açúcares consumidos (g/L) pelo tempo de cultivo (h)	$g/L^{-1}h^{-1}$
Rendimento em Biomassa	$Y_{x/s}$	Q_x/Q_s	g/g

Tabela 9: Parâmetros cinéticos calculados para as fermentações em frascos cônicos e em fermentador instrumentado.

4.3 – Resultados e Discussão

4.3.1 – Seleção da levedura para produção de biomassa

4.3.1.1 – Curva de crescimento em hidrolisado hemicelulósico

Todas as leveduras foram capazes de produzir biomassa utilizando o hidrolisado hemicelulósico nas condições do ensaio. Duas leveduras isoladas (FB07C04R0a e L0P2C24R0) consumiram toda a xilose presente no meio em 15 horas de cultivo. A isolada RU04C01R11 consumiu a totalidade da xilose em 20h de cultivo, assim como *P. stipitis*. A concentração de xilose na curva de crescimento da levedura FB09C05R0, isolada de fezes, oscilou nas primeiras 20 horas seguida de redução, esgotando-se em 40h de cultivo.

As leveduras L0P2C24R0 (100% de identificação com *Meyerozyma guilliermondii*) e FB09C05R0 (99% de identificação com *Pichia kudriavzevii*) acumularam menor quantidade

de biomassa quando comparadas às demais. As maiores produtoras de biomassa nas condições ensaiadas foram FB07C04R0a (99% de identificação com *Meyerozyma caribbica*) e *Pichia stipitis* que acumularam 35g/L de biomassa microbiana. A levedura RU04C11R11 (99% de identificação com *Meyerozyma Caribbica*) acumulou 33,75g/L de biomassa. Enquanto *P.stipitis* acumulou esta quantidade de biomassa em 20 horas de cultivo as outras duas o fizeram em 15 horas. A levedura que consumiu a totalidade de xilose e acumulou a maior quantidade de biomassa, no menor tempo de cultivo, foi FB07C04R0a. Esta levedura foi selecionada para os ensaios posteriores. Os dados relativos ao consumo de xilose e produção de biomassa estão plotados na **Figura 17**.

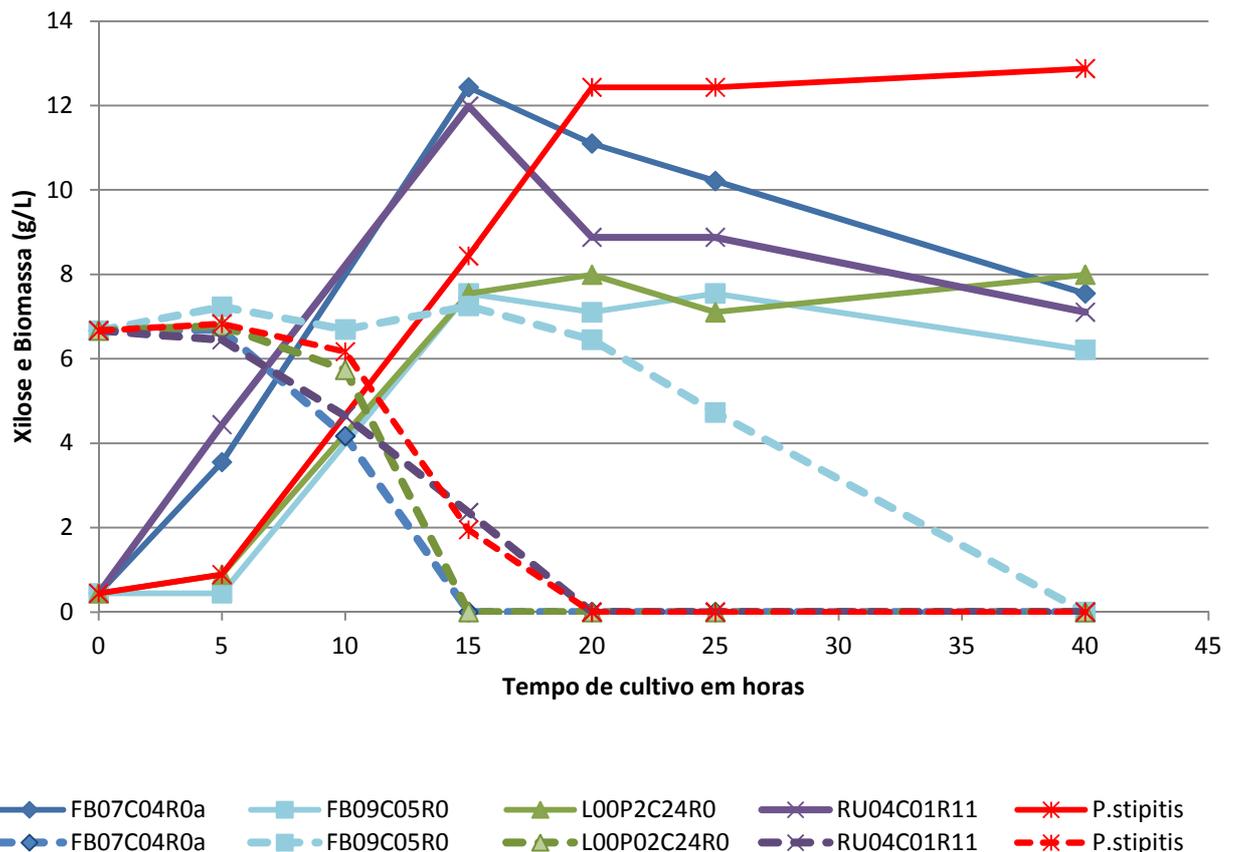


Figura 17: Produção de biomassa e consumo de xilose pelas leveduras selecionadas nos ensaios de assimilação e fermentação de açúcares. Linhas contínuas representam produção de biomassa e linhas pontilhadas representam consumo de xilose.

4.3.2 – Otimização da produção de biomassa

4.3.2.1 – Influência do pH inicial, ureia e extrato de leveduras

Através da análise de variância dos experimentos concluiu-se que, em baixas concentrações de xilose (6,67g/L) a variável (ensaiada) que influenciou consideravelmente na formação de biomassa foi o extrato de leveduras ($p=0,000$), **ver Figura 18**.

O extrato de leveduras é um suplemento normalmente utilizado em meios de cultura. Quando utilizado em altas concentrações pode servir como fonte de carbono para as células. No experimento atual, em baixa concentração de xilose, este suplemento influenciou diretamente na formação de biomassa. Acima de 2g/L o extrato de leveduras promoveu acúmulo de biomassa igual ou superior a 7,10g/L. Considerando o propósito deste trabalho, acumular biomassa a partir o hidrolisado hemicelulósico, estipulou-se valor abaixo de 2g/L para os experimentos subsequentes.

A variável pH inicial, influenciou na produção de biomassa ($p=0,057$), mas não no consumo de xilose ($p=0,633$). Houve interação entre os fatores pH inicial e ureia para a produção de biomassa ($p=0,015$) que é acumulada em torno de 7,10g/L quando em valores altos das duas variáveis (pH maior que 7,0 e ureia em torno de 3,0g/L). Na região de pH entre 5,5 e 6,0 ocorreu acúmulo de biomassa em torno de 6,22g/L quando a concentração de ureia foi menor que 1,5g/L. A produção de biomassa foi menor na região de pH 5,5 quando os valores de ureia foram maiores que 1,5g/L (**Figura 19**).

Também houve interação entre as variáveis pH e ureia no consumo de xilose ($p=0,044$). Houve maior consumo deste açúcar em uma faixa de pH em torno de 5,5 (quando a concentração de ureia variou entre 1,0 e 2,5g/L), bem como acima de 7,0 (relacionado a altos níveis de ureia, acima de 2,5g/L) (**Figura 20**).

A hidrólise para produção da fração hemicelulósica foi realizada com ácido sulfúrico (hidrólise ácida), calor e pressão, obtendo hidrolisado muito ácido, com pH em torno de 0,5

(anexo 6.1.1). Para ajuste do pH do hidrolisado até valores aceitáveis para os microrganismos, foi necessário a utilização de uma base forte, neste caso, hidróxido de cálcio. Quanto maior o pH utilizado no meio de cultura, maiores quantidades de hidróxido de cálcio têm que ser utilizadas, aumentando o custo de produção.

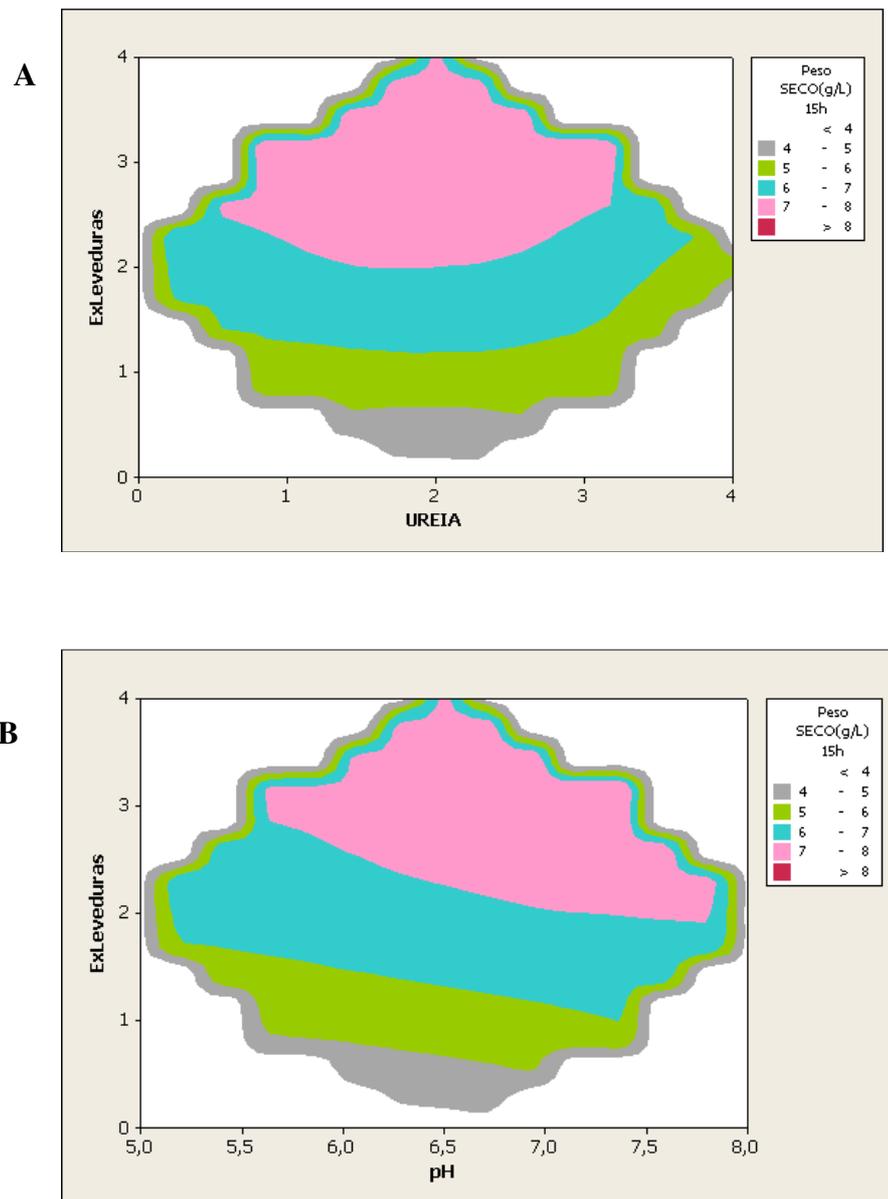


Figura 18: Influência do extrato de leveduras na produção de biomassa por FB07C04R0a. Gráfico de superfície de resposta com a variável extrato de levedura e ureia (A), extrato de leveduras e pH (B).

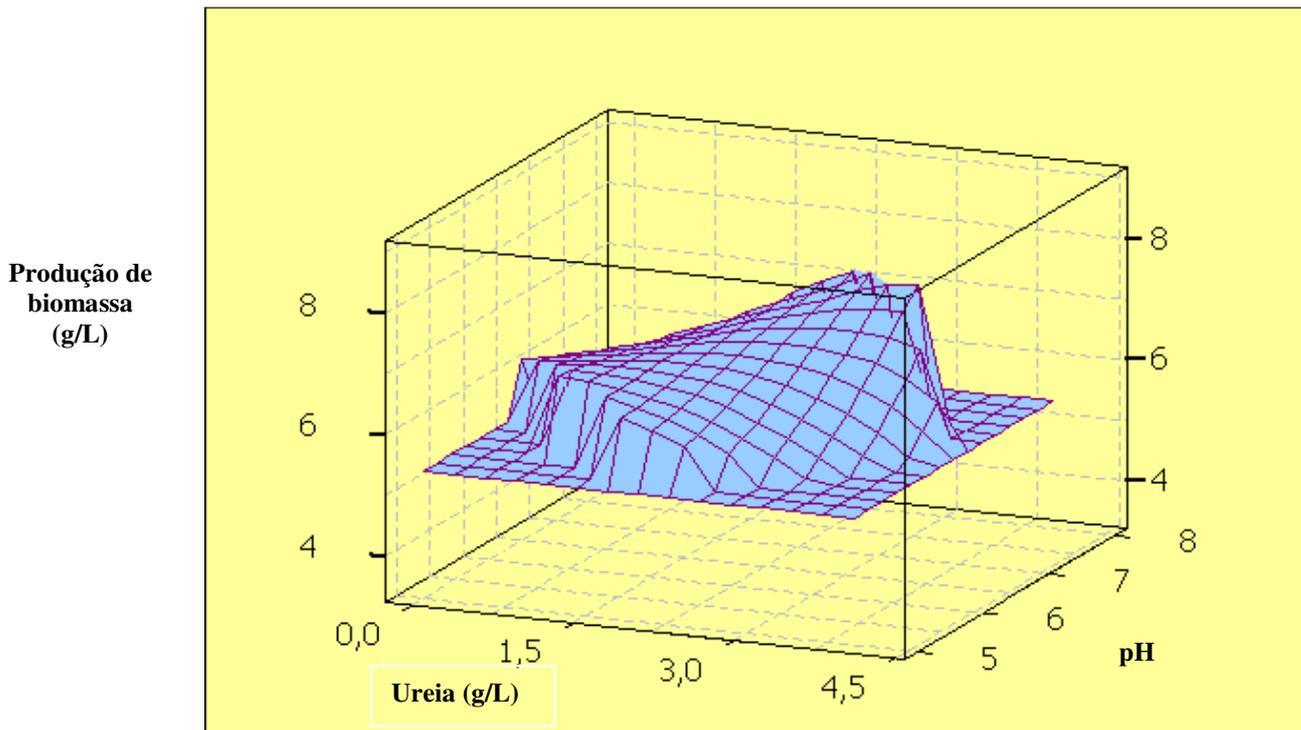


Figura 19: Superfície de resposta tridimensional mostrando a influência do pH e ureia na produção de biomassa por FB07C04R0a em meio hidrolisado hemicelulósico.

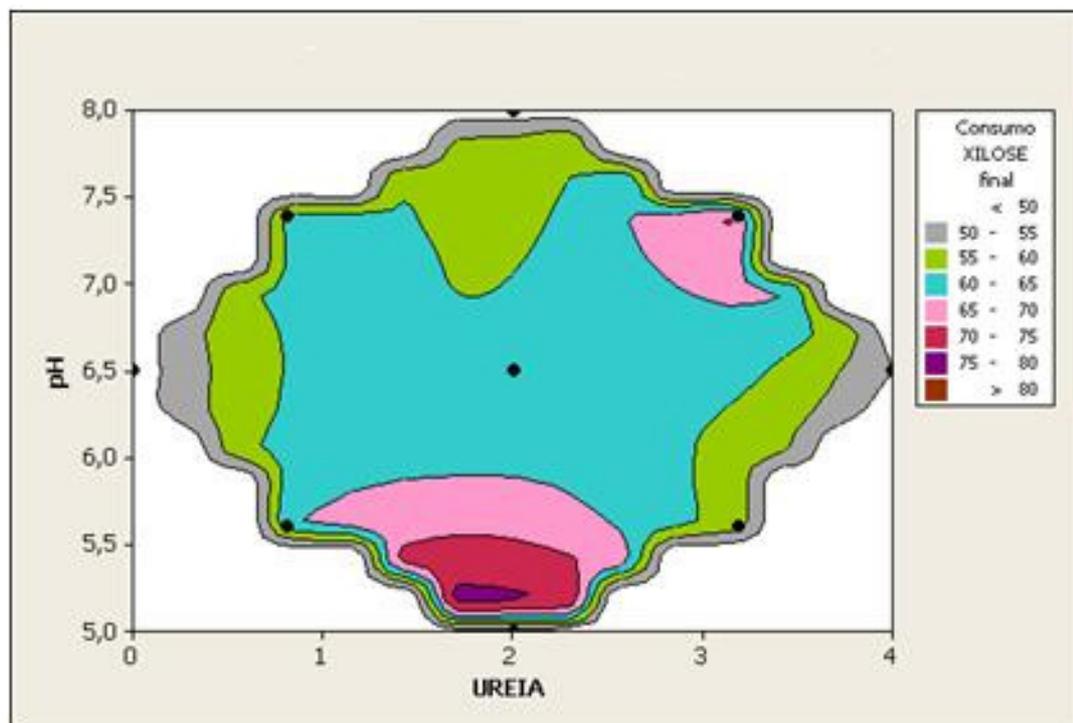


Figura 20: Influência do pH e da ureia no consumo de xilose por FB07C04R0a. Valores em porcentagem de consumo.

Apesar de o maior acúmulo de biomassa ter ocorrido em zona de altas concentrações de ureia e pH acima de 7,0, também houve bom acúmulo de biomassa (6,22g/L) em pH 5,5 associado a baixos valores de ureia (menores que 2,0g/L). Este valor de pH também foi eficiente no processo de isolamento dos microrganismos utilizados neste trabalho.

Os melhores valores de consumo de xilose também ocorreram nas regiões cujo pH variou em torno de 5,5 com concentrações menores que 2g/L de ureia, bem como nas regiões cujo pH foi maior que 7,0, aliado a concentrações de ureia maior que 2,5g/L.

Relacionando os dados de consumo de xilose e acúmulo de biomassa, levando em consideração a menor quantidade de substâncias utilizadas na produção do meio de cultura (hidróxido de cálcio e ureia, neste caso), escolheu-se como parâmetros para os ensaios subsequentes concentração de ureia 1,25g/L ; extrato de leveduras 1,5g/L e pH inicial 5,5.

4.3.2.2 – Influência das concentrações de hidrolisado hemicelulósico e xilose

O acúmulo de biomassa variou entre 8,88 e 15,10g/L (massa seca. O maior valor acumulado foi resultante do experimento fatorial nº 7 com 32g/L de xilose e 25% de hidrolisado ($Q_x = 0,54\text{g/L}^{-1}\text{h}^{-1}$). Houve acúmulo de 12,43g/L na região próxima dos valores com 90% do hidrolisado, com concentrações de xilose variando entre 30 e 32g/L. Os experimentos com 80% de hidrolisado possibilitaram acúmulo de biomassa em torno de 12,43g/L em uma faixa de concentração de xilose variável entre 25 e 40g/L (ver **Figura 21**). Observando-se os valores plotados no gráfico, pode-se notar um aumento da produção de biomassa com o aumento da concentração do hidrolisado, a partir de 70% de hidrolisado no meio.

A inibição do crescimento microbiano é fato descrito amplamente na literatura. O processo de hidrólise libera inibidores, a exemplo de hidroximetil furfural e ácido acético. Os

microrganismos utilizados nestes meios precisam ser tolerantes a estas substâncias, para utilizar o hidrolisado sem desintoxicação (DUARTE, 2008; HAHN-HAGERDAL, 2007).

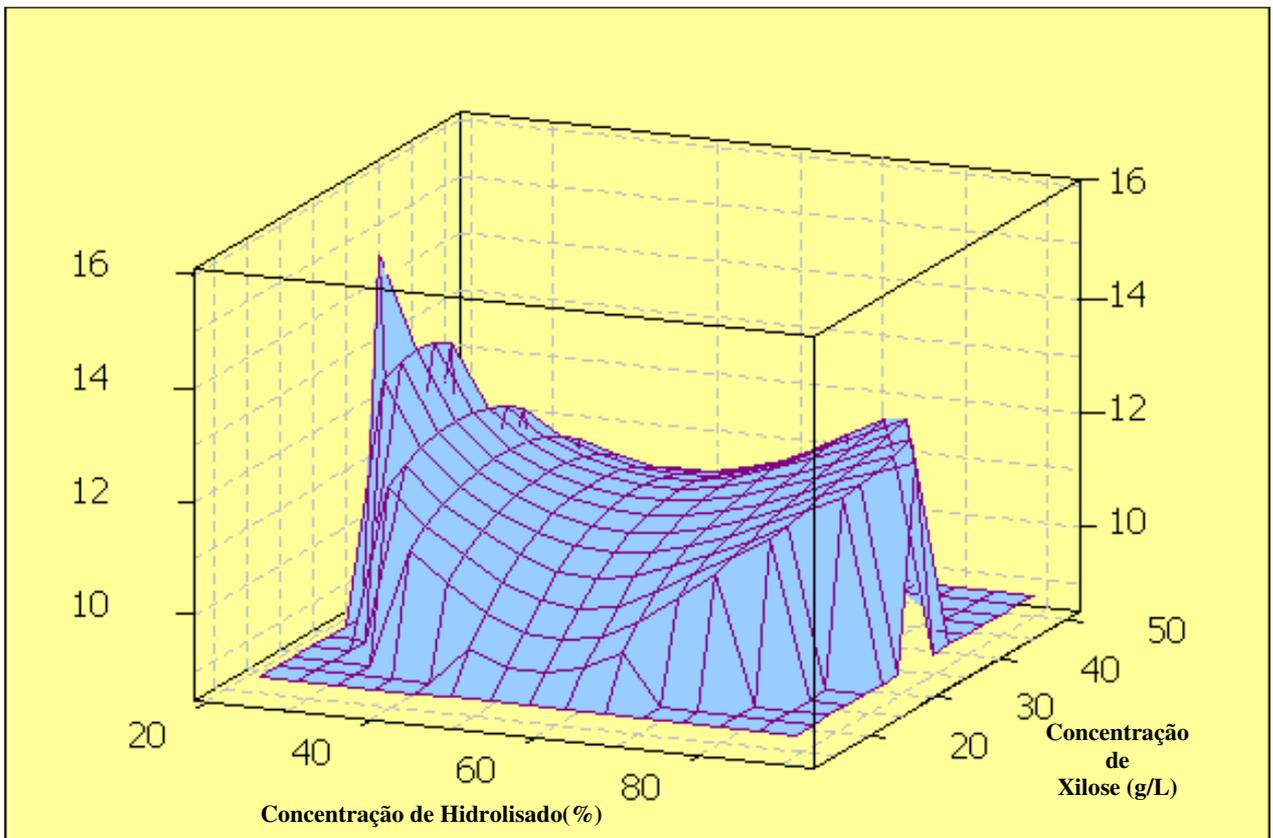


Figura 21: Efeito da concentração do hidrolisado hemicelulósico e da concentração de xilose na produção de biomassa por FB07C04R0a. Gráfico de contorno (A) superfície de resposta (B)

Alguns estudos sugerem que o microrganismo utilizado neste meio também deva assimilar os subprodutos da hidrólise, a exemplo de *Debaryomyces hansenii* e *Candida utilis* capazes de utilizar ácido acético do hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono para acúmulo de biomassa (CARVALHEIRO et al, 2006; du PREEZ, 1989). As concentrações destes inibidores não foram monitoradas neste estudo, mas, o aumento da produção de biomassa em valores acima de 70% do hidrolisado hemicelulósico, com valores constantes na faixa entre 25 e 40g/L de xilose, sugerem que a levedura esteja utilizando outras fontes de carbono presentes no hidrolisado. Em reforço a esta análise, a levedura produziu xilitol em todos os tratamentos com concentração em xilose igual ou superior a 32g/L.

Nestas concentrações de açúcar, após a estabilização do crescimento microbiano, o fluxo de carbono da pentose foi provavelmente redirecionado do acúmulo em biomassa para produção de xilitol que variou entre 4,89 a 14,8g/L (Q_{xilt} entre 0,18 e 0,55 g/L⁻¹h⁻¹). O maior acúmulo de xilitol ocorreu nos tratamentos com maior concentração de xilose (44,73g/L).

Com base nos resultados deste experimento decidiu-se utilizar, nos ensaios posteriores, 30g/L de xilose e 80% de hidrolisado hemicelulósico, pois ambos os valores propiciaram acúmulo significativo de biomassa.

4.3.2.3 – Ensaio para definição da temperatura

A levedura acumulou maior quantidade de biomassa em 35°C em comparação ao cultivo a 30°C. O perfil de produção de biomassa e consumo de xilose foi plotado na **Figura 22**. A levedura produziu xilitol a partir de 20h de cultivo, em ambas as temperaturas, 7,89g/L em 20h de cultivo a 30°C ($Q_{xilt} = 0,39$ g/L⁻¹h⁻¹) e 7,58g/L em 27h de cultivo a 35°C ($Q_{xilt} = 0,28$ g/L⁻¹h⁻¹)

4.3.3 – Ensaios em fermentador para produção de biomassa

Através da otimização dos resultados em frascos cônicos estabeleceu-se parâmetros para o cultivo de FB07C04R0a em meio hidrolisado hemicelulósico. Os parâmetros escolhidos para este ensaio foram: ureia 1,25g/L, concentração de hidrolisado hemicelulósico 80%, xilose 30g/L, temperatura 35°C, pH inicial 5,5. A fim de evitar qualquer influência no acúmulo de biomassa, a variável extrato de leveduras foi reduzida até 0,5g/L.

Com o conjunto de parâmetros estabelecido, a levedura acumulou 14,21g/L em 72 h de crescimento ($Q_x=0,19$ g/L⁻¹h⁻¹) em biomassa (**Figura 23**). Em 30 horas de cultivo a levedura acumulou 7,1 g/L ($Q_x = 0,21$ g/L⁻¹h⁻¹) em biomassa e produziu 6,23 g/L de xilitol ($Q_{xilt} = 0,2$ g/L⁻¹h⁻¹)

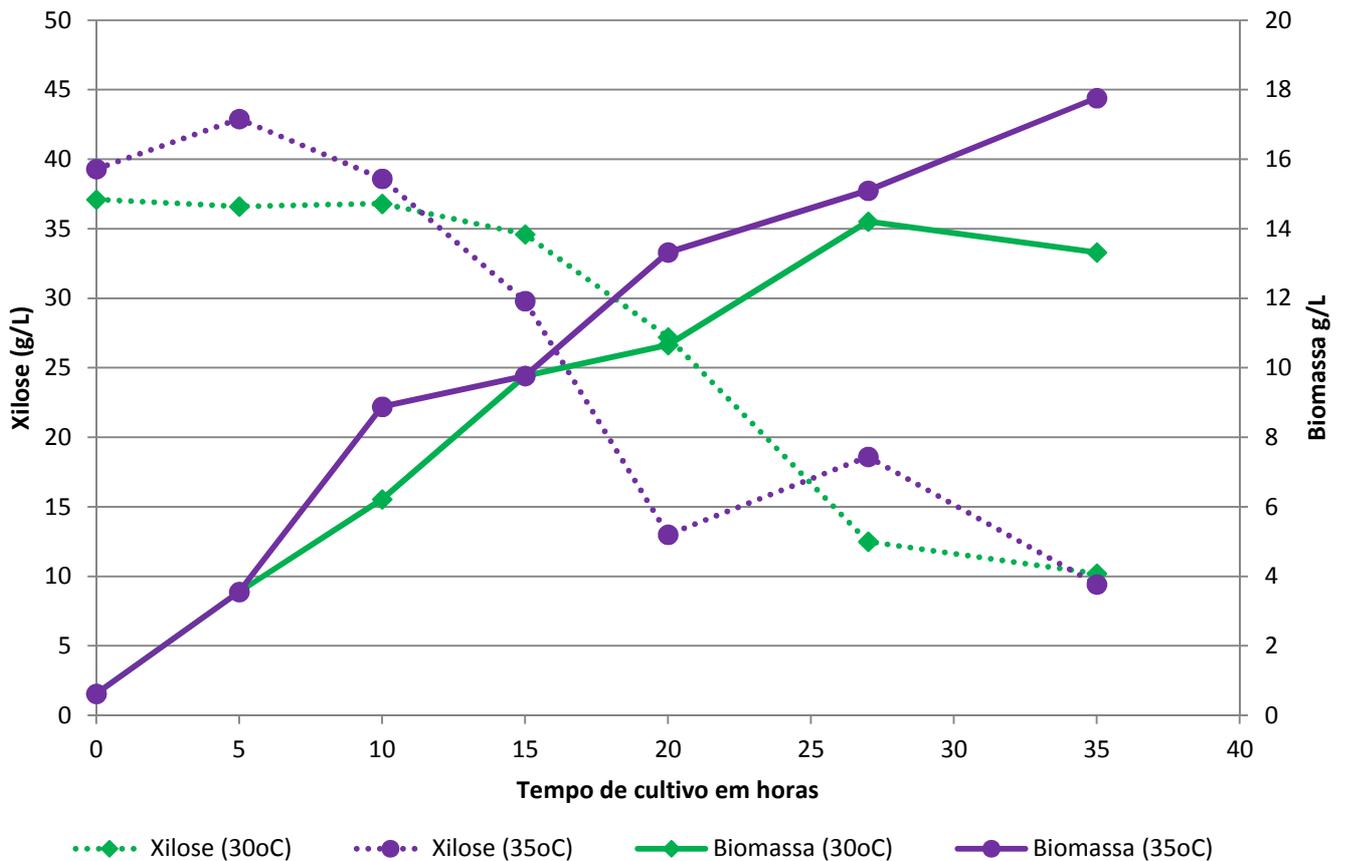


Figura 22: Influência da temperatura na produção de biomassa por FB07C04R0a em meio contendo 80% do hidrolisado hemicelulósico e 30g/L de xilose. As temperaturas ensaiadas foram 30°C e 35°C

Outros trabalhos foram realizados com produção de biomassa utilizando hidrolisado lignocelulósico como fonte de carbono: Almeida e Silva e colaboradores (2003) trabalharam com *Paecylomyces variotti* (um fungo filamentosos) em batelada, utilizando fermentador e obtiveram 12,6g/L (89h de cultivo) de biomassa em hidrolisado contendo 25,6g/L de xilose. Estes mesmos autores trabalharam com o mesmo microrganismo (1995) e obtiveram produtividade em biomassa (Q_x) de 0,26g/L.h e rendimento ($Y_{x/s}$) 0,44g/g. (72 horas de cultivo).

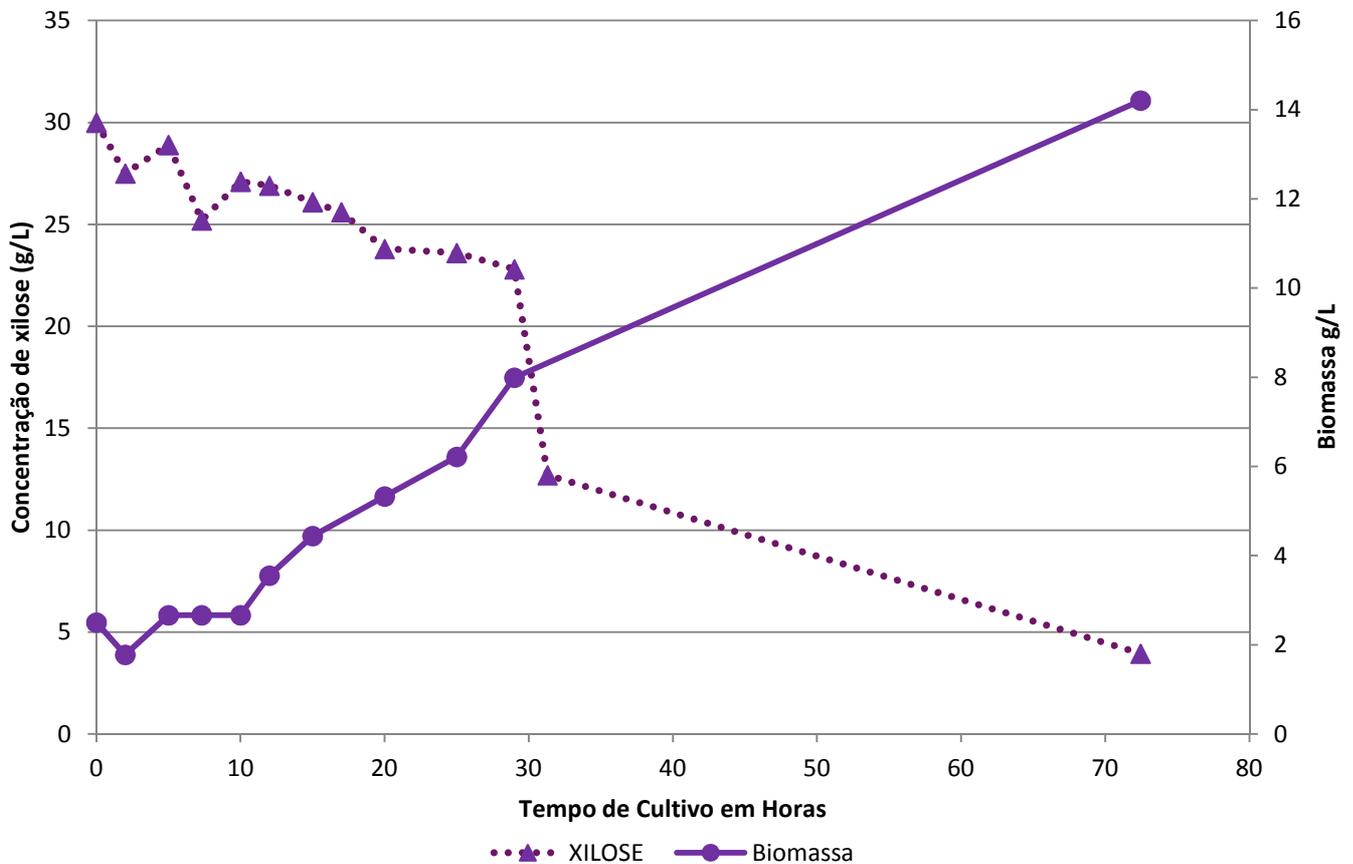


Figura 23: Produção de biomassa e consumo de xilose por FB07C04R0a em meio hidrolisado. Fermentação em batelada simples utilizando fermentador instrumentado BIOFLO110.

Trabalhando com leveduras em frascos cônicos, Duarte e colaboradores (2008) cultivaram *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces marxianus*, obtendo $Q_x = 0,56/0,20$ e $Y_{x/s} = 0,61/0,41$ respectivamente, em 24 horas. Carvalheiro e colaboradores (2006) cultivaram *Debaryomyces hansenii* e obtiveram $Q_x = 0,48$ e $Y_{x/s} = 0,64$. du Preez, 1989, cultivou *Candida utilis* (60h de cultivo) e *Geotrichum candidum* (100h de cultivo) em frascos cônicos, com meio contendo 40g/L de xilose (e 2,5g/L de glicose) e obtiveram 13 e 19,5g/L de biomassa microbiana, respectivamente.

Cultivos em batelada utilizando fermentador foram realizados por Pessoa Jr e colaboradores (1996) com *Candida tropicalis*, obtendo $Q_x = 0,196\text{g/L.h}$ e $Y_{x/s} = 0,3\text{g/g}$.

4.4 – Conclusão

Os esforços na área de pesquisa e desenvolvimento na utilização dos resíduos lignocelulósicos têm se concentrado na extração da celulose e em sua conversão em produtos de valor comercial. Isto se deve à representação em torno de 60% deste polímero na biomassa vegetal. Entretanto, as biocatálises envolvendo a fração hemicelulósica estão em progresso constante, em diversas áreas, incluindo descoberta e caracterização de hemicelulases, desenvolvimento de leveduras produtoras de etanol e desenvolvimento de microrganismos para processos alternativos de bioconversão (DUMON *et al*, 2012). Neste sentido, a levedura FB07C04R0a (99% de similaridade com *Meyerozyma caribbica*), em meio hidrolisado hemicelulósico, pode ser explorada biotecnologicamente para produção de biomassa microbiana e xilitol, a partir do hidrolisado hemicelulósico.

A levedura acumulou 14,21g/L de biomassa em 72h em cultivo tipo batelada simples (utilizando fermentador instrumentado). Em experimentos com frascos cônicos, a levedura acumulou em torno de 12,43g/L após 27 horas de cultivo ($Q_x = 0,44 \text{ g/L}^{-1}\text{h}^{-1}$), tolerando até 90% de hidrolisado hemicelulósico.

Outras leveduras isoladas (4.3.1.1) também podem ser exploradas para produção de uma variedade de compostos de interesse utilizando, como fonte de carbono, a fração hemicelulósica da biomassa vegetal. A depender da estrutura do parque industrial e dos produtos alvo, estas leveduras também poderão ser exploradas em substratos mistos, utilizando as frações celulósicas e hemicelulósicas da biomassa.

Potencialidade Biológica
das Leveduras Isoladas

C34P1e21R 46BR
1111 ① 20/9/8 5/9/7
L0
①

5 – POTENCIALIDADE BIOLÓGICA DAS LEVEDURAS ISOLADAS

Teoricamente qualquer material lignocelulósico pode ser bioconvertido em ampla variedade produtos de interesse econômico, de alto ou baixo valor agregado. Desta forma é possível explorar resíduos lignocelulósicos disponíveis em nossa região. Para cada resíduo os parâmetros devem ser estudados, tais como quantidade e tipo de resíduo disponível, resistência à hidrólise, logística de colheita e transporte ao local de processamento e maquinaria do laboratório, indústria ou biofábrica nos quais serão processados. A metodologia de extração dos carboidratos do resíduo lignocelulósico dependerá da biomassa vegetal disponível e a bioconversão no produto de interesse dependerá do microrganismo utilizado. Algumas características são comuns aos microrganismos de interesse neste tipo de aproveitamento: resistência aos inibidores do hidrolisado hemicelulósico, capacidade de metabolizar amplo espectro de açúcares, resistência às condições de fermentação, tais como altas temperaturas, baixos índices de pH e alta osmolaridade do meio. Um microrganismo ideal deve ter capacidade de importar pentoses e integrá-las ao seu metabolismo. Desta forma o bioprocessamento aproveitará a fração hemicelulósica da biomassa vegetal, fato crucial para a sustentabilidade da biofábrica ou biorefinaria.

Dependendo do objetivo em questão e das características desejáveis, pode-se reorganizar os filtros de seleção, sem necessidade de ensaios adicionais, e escolher outras leveduras para serem identificadas e exploradas.

Neste trabalho o isolamento de leveduras de diferentes ambientes lignocelulósicos naturais promoveu a construção de um banco de células com potencialidades diferentes para a bioconversão da biomassa. De acordo com os objetivos traçados e com os filtros de seleção escolhidos, foram selecionadas 57 leveduras, entre as 237 isoladas. As leveduras selecionadas possuem boa parte das características citadas anteriormente, podendo ser exploradas neste sentido.

Além dos resultados anteriormente expostos neste trabalho, existiram outros que, embora não explicitados até então, representam potencialidades biotecnológicas adicionais das leveduras isoladas, na utilização de resíduos lignocelulósicos.

5.1. – Produção de etanol celulósico

Com base nos resultados dos ensaios de assimilação de açúcares realizados previamente (**capítulo 4**), foram escolhidas 32 leveduras para ensaios fermentativos. Estas leveduras selecionadas foram isoladas de diferentes fontes utilizadas neste trabalho e os ensaios fermentativos tiveram como objetivo verificar a produção de etanol.

As leveduras com resultado positivo para o ensaio de fermentação de glicose (e que tiveram resultado positivo no ensaio de assimilação para xilose, arabinose e hidrolisado hemicelulósico) foram submetidas ao ensaio de fermentação de xilose com adaptação. O meio de cultura líquido foi constituído de solução nitrogenada enriquecida, acrescida de concentrações crescentes de xilose e decrescentes de glicose nos pré inóculos e xilose 5% no meio fermentativo.

Nenhuma levedura, entre as selecionadas, foi capaz de fermentar xilose em meio sintético.

Para verificar a possível produção de etanol utilizando o hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono, as leveduras selecionadas foram submetidas ao ensaio em fermentômetro. O ensaio foi conduzido em frascos de 500mL de volume útil com 220mL de meio contendo 80% de hidrolisado hemicelulósico (6,06g/L de xilose e 1,20g/L de glicose) e pH 6,0. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e travas de fermentação contendo selo d'água e foram incubados a 30°C e 150rpm de agitação. Este sistema tem a finalidade de reduzir a transferência de oxigênio, limitando-o no interior dos frascos após o consumo pelo microrganismo. Para acompanhar a evolução de CO₂ os sistemas foram pesados antes da incubação e o peso foi acompanhado a cada 2 horas de cultivo.

O resultado do ensaio fermentativo em meio hidrolisado hemicelulósico consta na **Figura 24**. Ao final do período de incubação as leveduras consumiram toda a glicose do meio. Em relação ao consumo de xilose, FB07C04R0a consumiu 61,56% , RU04C01R11, 73,27%; LOP2C24R0, 76,4% e FB09C05R0: 72,77%.

Observando a evolução de CO₂ no gráfico, pode-se concluir que as leveduras fermentaram pelo menos um dos substratos presentes no hidrolisado. Como nenhuma das leveduras foi capaz de fermentar xilose, mas sim, glicose, nos ensaios anteriores, deduz-se que as células fermentaram a glicose residual do meio ou outras hexoses presentes. Este fato demonstra a potencialidade das leveduras isoladas em produzir etanol a partir da fração celulósica da biomassa vegetal.

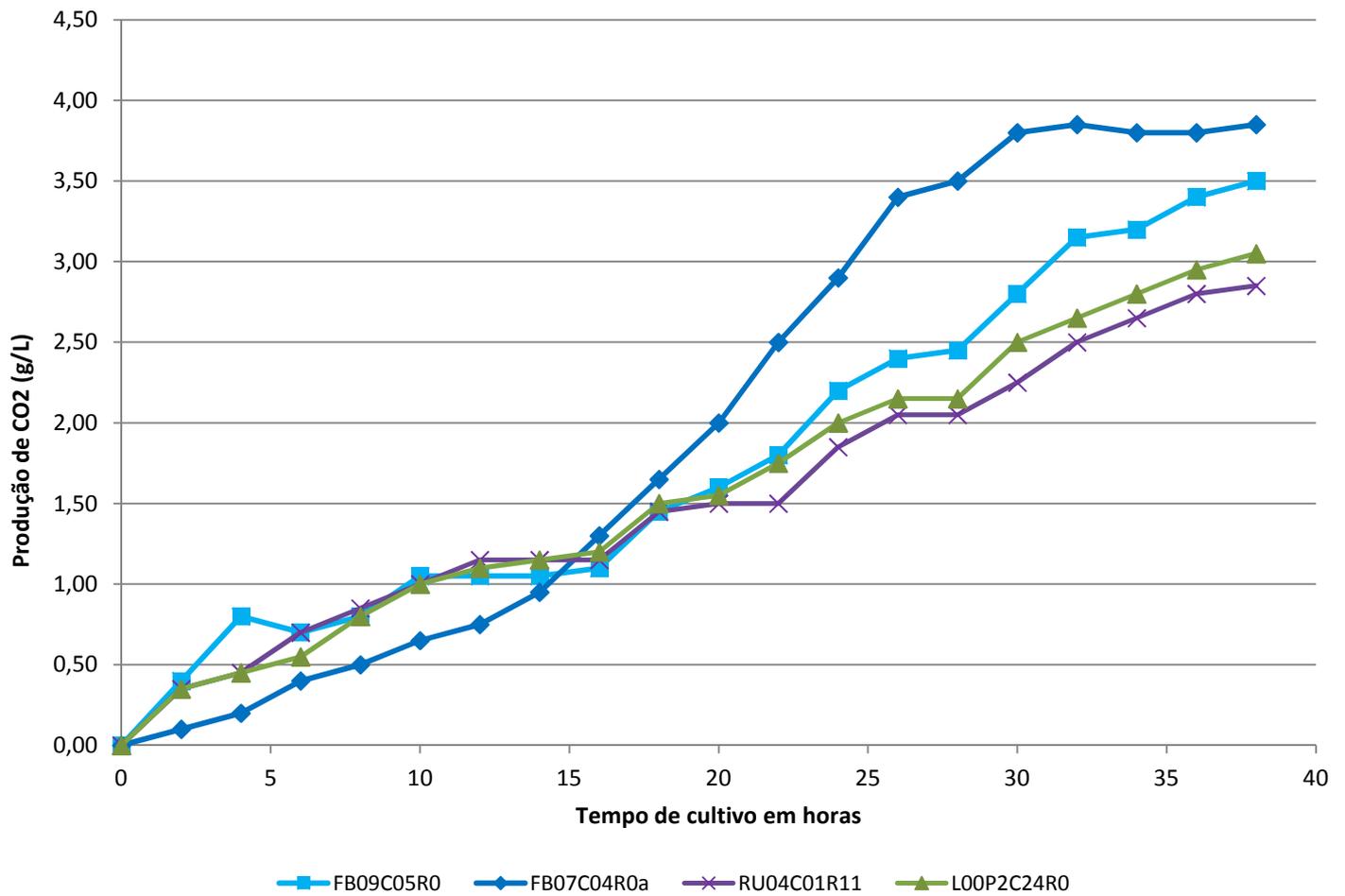


Figura 24: Evolução de CO₂ em cultivos com transferência de oxigênio limitada, em frascos cônicos lacrados com fermentômetros, utilizando meio hidrolisado hemicelulósico.

5.2 – Produção de xilitol

Outra característica importante detectada durante os experimentos foi a produção de xilitol. Embora os métodos analíticos disponíveis não tenham sido capazes de quantificar xilitol em algumas amostras, foram eficazes na detecção do poliálcool. Devido às características da coluna cromatográfica utilizada, os tempos de retenção da pentose xilose e do poliálcool xilitol foram muito próximos. Dependendo das concentrações dos compostos, em algumas amostras foi possível quantificar os dois, que foram detectados como substâncias distintas pelo HPLC, enquanto que em outras amostras foi possível apenas detectar a presença da pentose e do poliálcool, sem quantificá-los (ver **Figura 25**).

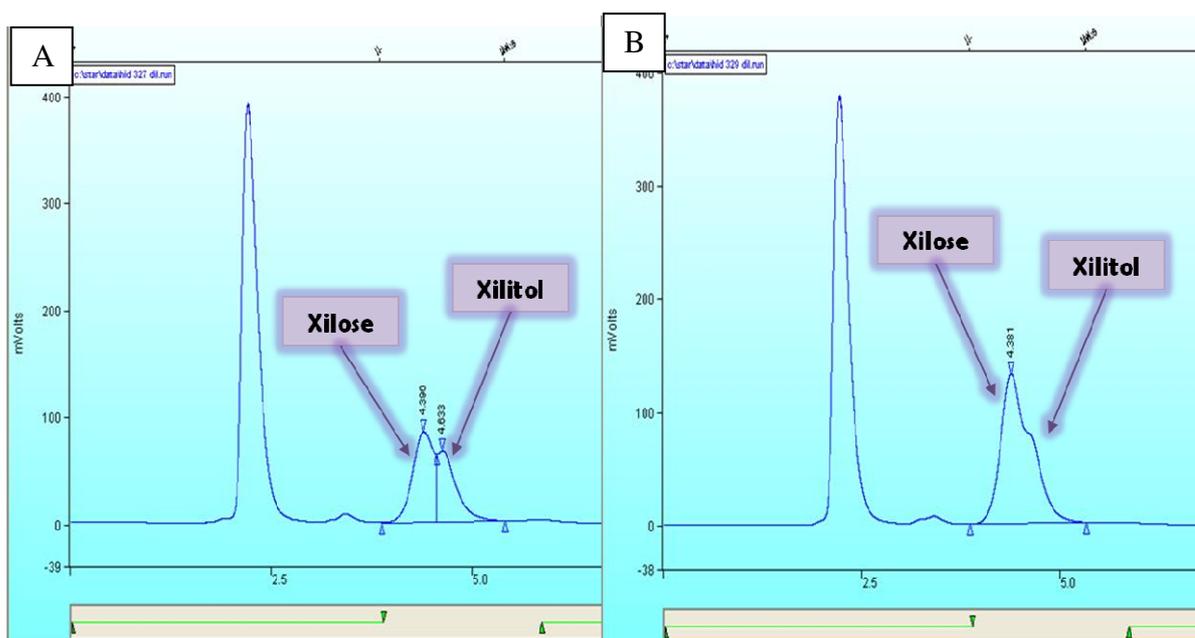


Figura 25: Cromatogramas exibindo picos referentes à pentose (xilose) e ao poliálcool xilitol. **A:** picos distintos possibilitando quantificação; **B:** picos geminados indicando duas substâncias diferentes.

Também foi possível detectar xilitol por cromatografia em camada delgada, nos experimentos com meio sintético. As amostras contendo xilitol foram submetidas à incidência de luz ultravioleta (após a corrida cromatográfica) em diferentes comprimentos de onda. (**Figura 26** e **Figura 27**).

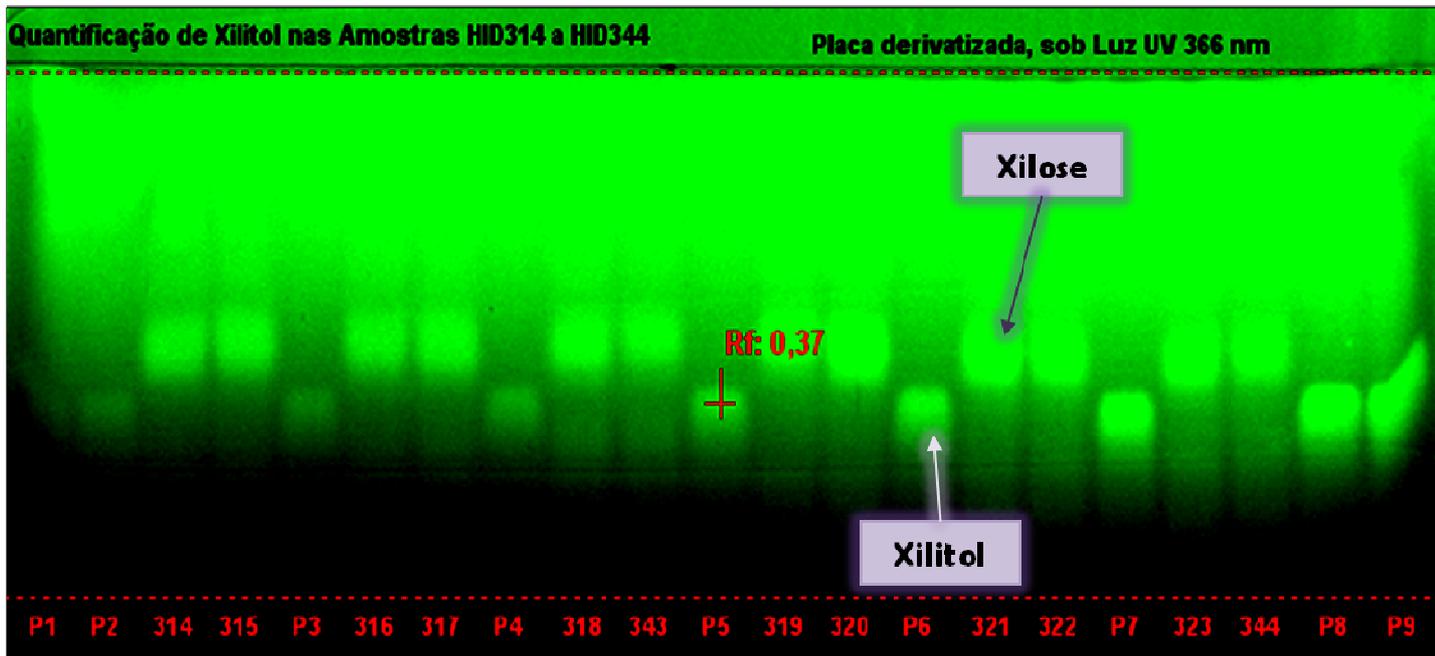


Figura 26: Placa cromatográfica, sob luz ultravioleta (366nm) com amostras de xilose e xilitol formando bandas com diferentes fatores de migração. O meio de cultura utilizado foi sintético, contendo apenas xilose como fonte de carbono.

Embora o método em camada delgada seja sensível e eficaz para separar e quantificar as duas substâncias, existiram diferenças de detecção quando comparado às análises por cromatografia líquida. Além disso, ocorreram reações cruzadas (com falso positivo) quando o meio de cultivo utilizado foi o hidrolisado hemicelulósico.

Com base nestes dados, foi possível detectar produção de xilitol, por cromatografia em camada delgada, produzido em meio sintético, contendo apenas xilose como fonte de carbono. Através das análises em HPLC, foi possível detectar o poliálcool (e quantificar em algumas amostras) em ambos os meios sintético e hidrolisado hemicelulósico.

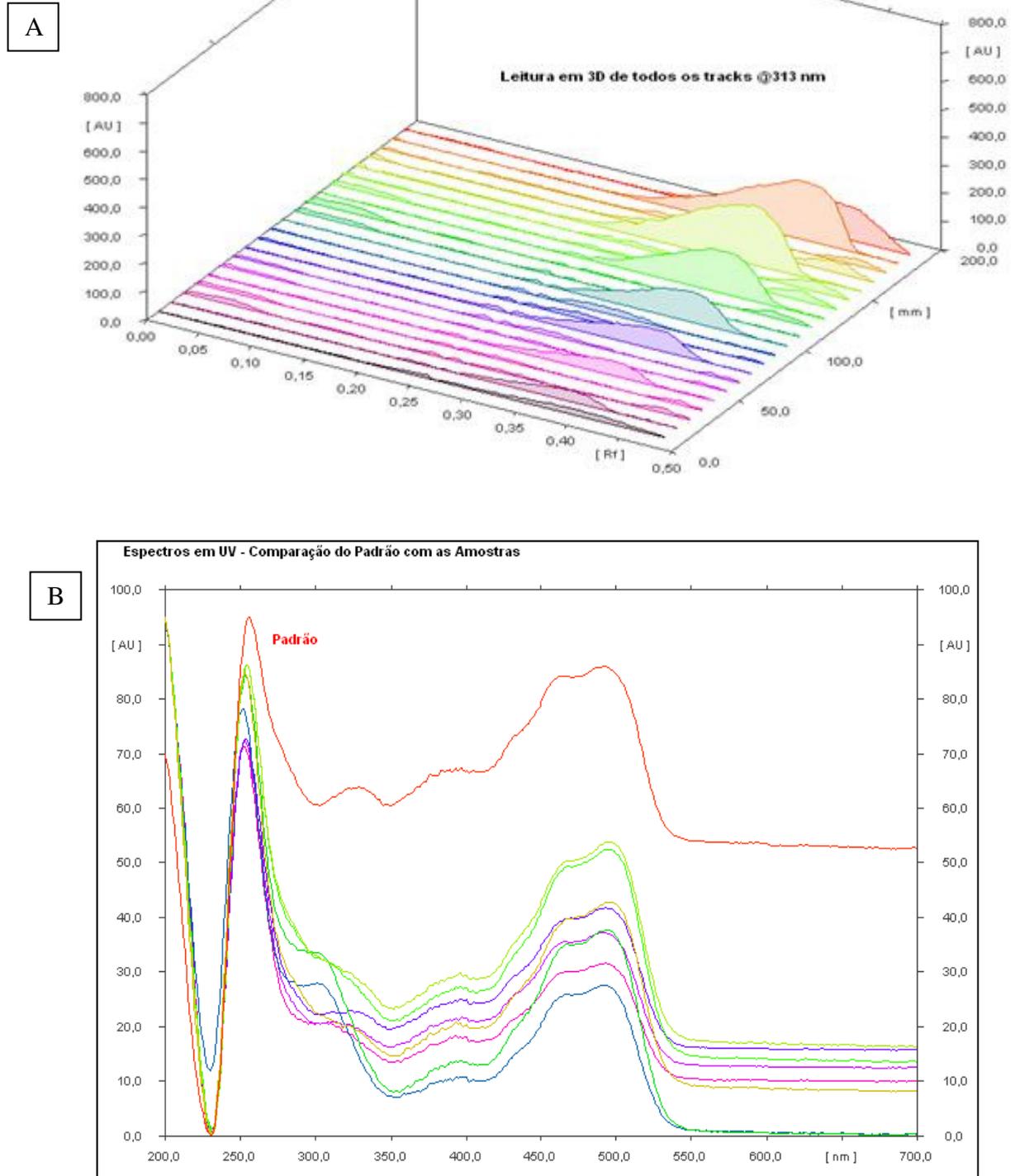


Figura 27: Análise das amostras contendo xilitol em scanner com luz ultravioleta. **A:** Leitura tridimensional das amostras. Os picos maiores representam diferentes concentrações da amostra padrão. **B:** Incidência de diferentes comprimentos de onda nas bandas contendo xilitol. A linha superior (vermelha) representa amostra padrão.

A maior parte das leveduras selecionadas neste trabalho (consultar a árvore filogenética, **Figura 15**) teve alta similaridade com duas espécies muito próximas: *Meyerozyma caribbica* e *Meyerozyma guilliermondii*. Esta última vem sendo relatada na literatura como boa produtora de xilitol. Cinco leveduras que apresentaram similaridade com esta espécie foram submetidas ao ensaio para produção de xilitol, em meio sintético. Entre estas, três foram capazes de produzir o poliálcool: FB08C01R0 (isolada de fezes de bovinos); LOP2C24R0 (isolada de inseto imaturo) e RU03C01R0 (isolada da saliva de bovinos). A levedura FB07C04R0a (99% de similaridade com *Meyerozyma caribbica*) também foi capaz de produzir diferentes concentrações de xilitol (entre 4,89 e 14,8g/L) em meio hidrolisado hemicelulósico. O poliálcool foi detectado, por cromatografia líquida, em diferentes ensaios realizados com esta levedura cultivada em meio contendo concentração de xilose igual ou maior a 30g/L: experimentos de superfície de resposta, experimentos com ambas as temperaturas de incubação (30 e 35°C) e no ensaio utilizando fermentador instrumentado .

5.3 – Produção de pigmentos

Durante os experimentos realizados surgiram novas perspectivas de exploração das leveduras isoladas, para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos. A levedura FB09C05R0 (99% de similaridade com *Pichia kudriavzevii*) produziu dois tipos de pigmentação: um deles, de cor salmão, está evidente na **Figura 28a**. O outro pigmento, menos denso que o primeiro e de cor amarelo, está presente embora pouco evidente nesta figura. A levedura LOP2C24R0 (100% de similaridade com *Meyerozyma guilliermondii*) produziu pigmento amarelo forte (**Figura 28b**). Os pigmentos, além de aplicação industrial, podem ter funções nutricionais importantes, a exemplo dos carotenóides.

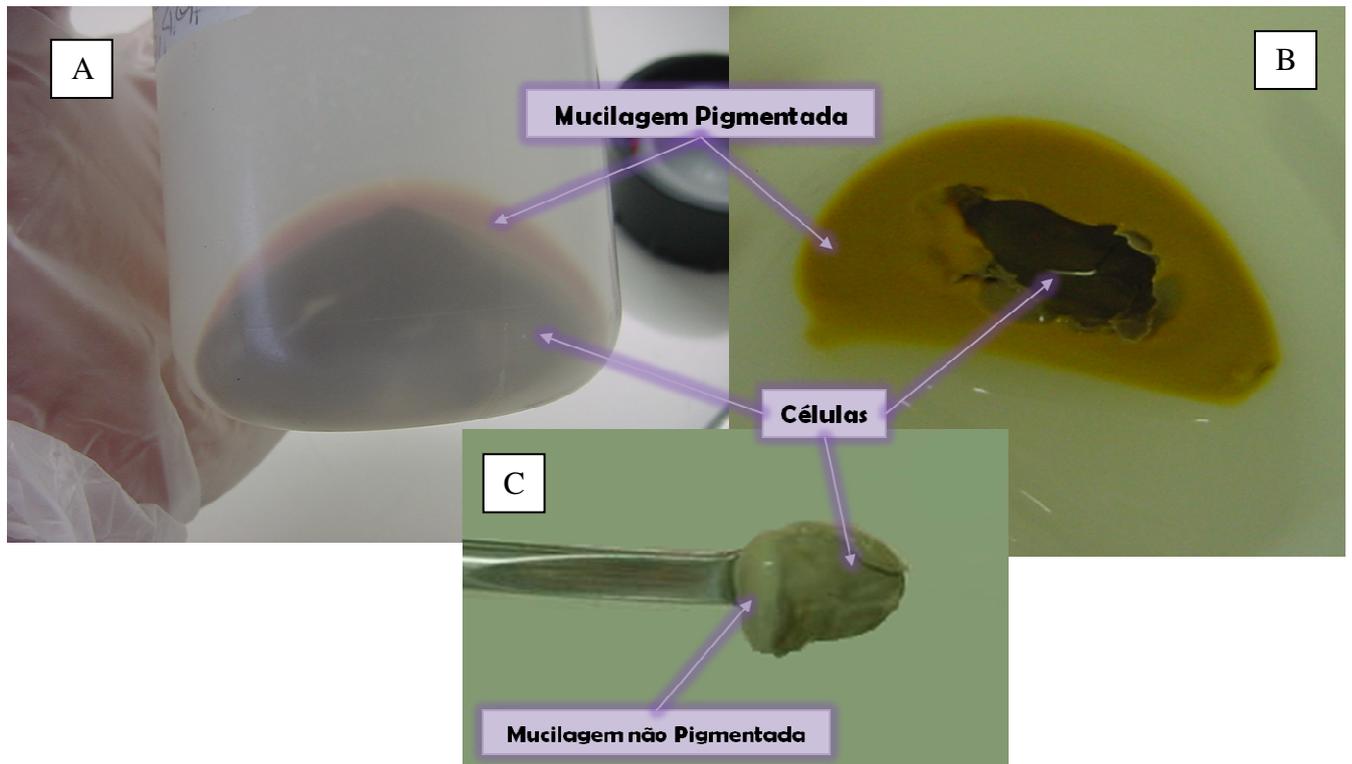
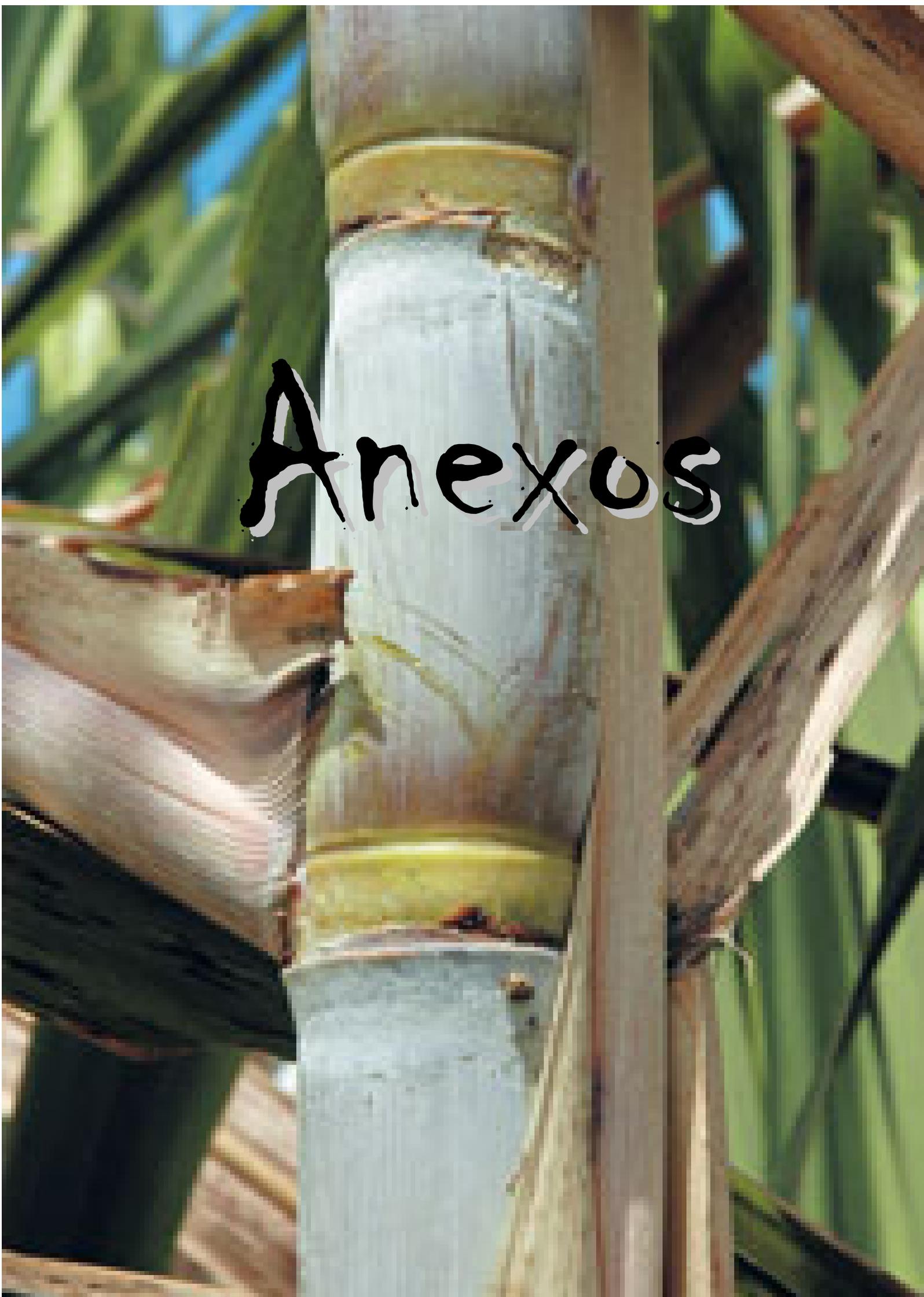


Figura 28: Biomassa microbiana de três diferentes leveduras após a centrifugação, demonstrando mucilagem menos densa, com pigmentações diferentes, bem como mucilagem sem pigmentação. O cultivo foi realizado em meio contendo hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono.

5.4 – Potencialidade para produção de aroma

O aroma do hidrolisado hemicelulósico sem fermentação é, naturalmente agradável, assemelhando-se àqueles produtos açucarados da cana-de-açúcar. Entretanto, algumas leveduras modificaram o aroma do meio durante a fermentação. Todas mantiveram aroma agradável, transmitindo a impressão substância mais ou menos doce.

A produção de aroma a partir da biomassa pode, portanto, apresentar-se como outra alternativa de exploração biotecnológica das leveduras isoladas.

A close-up photograph of a wooden post with a white cylindrical object attached to it. The white object has a textured surface and is secured with a yellowish-brown band. The background shows a wooden structure and green foliage. The word "Anexos" is written in a stylized, black and white font across the center of the image.

Anexos

6 – ANEXOS

6.1 – Soluções e meios de cultura

6.1.1 – Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar

Foram pesados 100g do bagaço desidratado da cana-de-açúcar. Ao bagaço foram adicionados 400mL de ácido sulfúrico a 3% (v/v). A mistura foi incubada por 24h e em seguida autoclavada por 40min a 121°C. O caldo hidrolítico foi separado do bagaço através de filtração por pressão e o pH foi ajustado para 5,5 com hidróxido de cálcio 1M. O caldo hidrolítico foi neutralizado centrifugado a 7.500rpm, por 20 minutos, a 4°C para a retirada do sal. O hidrolisado foi utilizado imediatamente ou congelado para posterior utilização.

6.1.2 – Soluções

6.1.2.1 – Solução nitrogenada enriquecida

Extrato de Leveduras	1,5g/L
Ureia	1,25g/L
KH ₂ PO ₄	1,1g/L
Solução de sais e ácido cítrico pH 5,5.	40mL/L

6.1.2.2 – Solução de sais e ácido cítrico

MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25 g/L
Ácido cítrico	12,5 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,9 g/L
MnSO ₄	0,19 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,035 g/L
H ₃ BO ₃	0,05 g/L
KI	0,009 g/L
Al ₂ (SO ₄) ₃	0,013 g/L

6.1.2.3 – Tampão H

Triton X-100	2%
SDS	1%
NaCl	100mM
Tris-HCl pH 8,0	10mM
EDTA	1mM

6.1.2.4 – Mix para PCR

DNTP	0,25mM
MgCl ₂	1,5mM
Primer	0,4ng
Taq Polimerase	0,06u/μL
Amostra	3μL

6.1.3 – Meios de cultura.

6.1.3.1 – Meio hidrolisado hemicelulósico para o isolamento de leveduras

YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i> – Difco)	6,7g/L
Hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar pH 5,5.	1% de açúcar redutor

6.1.3.2 – Meio hidrolisado hemicelulósico para ensaios fermentativos

Hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar	80% do volume total
Ureia	1,25g/L
KH ₂ PO ₄	1,1g/L
Extrato de leveduras	1,5g/L
Solução de sais e ácido cítrico pH 5,5.	40mL/L

6.1.3.3 – Meio para ensaios de assimilação

YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i> – Difco)	6,7g/L
Açúcar pH 5,5.	10g/L

6.1.3.4 – Meios sintético fermentativo

Xilose	50g/L
Ureia	1,25g/L
KH ₂ PO ₄	1,1g/L
Extrato de leveduras	1,5g/L

Solução de sais e ácido cítrico pH5,5.	40mL/L
---	--------

6.1.3.5 – Meio para manutenção das células

Xilose	5g/L
Peptona	5g/L
Extrato de leveduras	2g/L
pH5,5.	

6.1.3.6 – Meio para reativação das células

Xilose	20g/L
Ureia	1,25g/L
KH ₂ PO ₄	1,1g/L
Extrato de leveduras	2,0g/L
Solução de sais e ácido cítrico	40mL/L
pH5,5.	

Para confeccionar os meios sólidos foram adicionados 15g/L de agar-agar.

6.2 – Metodologias

6.2.1 – Extração de DNA total (modificado de HARJU et al, 2004)

1. Crescer as leveduras em meio YPD (Extrato de levedura1%; peptona2%; glicose2%) a 30°C por 24h. (Usar tubo tipo Falcon com 4 ou 5mL de meio);
2. Coletar 2mL de suspensão e centrifugar as células por 5 minutos a 12.000rpm;
3. Descartar o sobrenadante e adicionar 200µL de tampão H.
4. Ressuspender;
5. Incubar no gelo por 2 minutos;
6. Incubar a 95°C por 1 minuto;
7. Repetir os passos 5 e 6;
8. Agitar em Vortex por 30 segundos;
9. Adicionar 200µL de clorofórmio e agitar em vortex por 2 minutos;
10. Centrifugar a 12.000rpm por 6 a 10 minutos em temperatura ambiente , recuperar 200µL de sobrenadante e adicionar 400µL de etanol 100% gelado. Misturar por inversão;
11. Incubar a -20°C por 5 minutos;
12. Centrifugar a 12.000rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
13. Descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com 500µL de etanol 70%;
14. Centrifugar por 12.000rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
15. Remover o sobrenadante;
16. Secar o *pellet*;
17. Ressuspender em 25-50 µL de Água, adicionar RNase se for necessário e incubar por 20 minutos a 37°C.

6.2.2 – PCR

Etapa	Ciclos	Temperatura (oC)	Tempo
Denaturação inicial	1	95	5 min
Denaturação	30	94	30 seg
Anelamento	30	55	30 seg
Extensão	30	72	30seg
Finalização da extensão	1	72	10 min



Referências Bibliográficas

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA E SILVA, J. B.A; LIMA, U. A.; TAQUEDA, M. E. S.; GUARAGNA, F. G. Use of response surface methodology for selection of nutrient levels for culturing *Paecilomyces variotii* in eucalyptus hemicellulosic hydrolyzate. **Bioresource Technology**, 87,1, p. 45–50, 2003.

ALMEIDA E SILVA, J. B.A; MANCILHA, I. M; VANNETTI, M. C.; TEIXEIRA, M. A. Microbial protein production by *Paecilomyces variotii* cultivated in eucalyptus hemicellulosic hydrolyzate. **Bioresource Technology**, 52, 02, p.197–200, mar, 1995.

AVISE, J. C.. Molecular Markers, natural history, and evolution. 2.ed. Sunderland, Massachusetts, USA. Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2004. 684p.

BARNETT, J.;PAYNE, R.; YARROW, D. Yeasts: **Characterization and identification**. 02.ed. Cambridge University press 1990 1001p

BASUKRIADI, A; SJAMSURIDZAL, W; PUTRA, B. B. Molecular Identification and Diversity of Yeasts Associated with *Apis cerana* Foraging on Flowers of *Jatropha integerrima*. **Microbiology Indonesia**, 4, 01, P.44-48. 2010.

BASUKRIADI, A; SJAMSURIDZAL, W; PUTRA, B. B. Molecular Identification and Diversity of Yeasts Associated with *Apis cerana* Foraging on Flowers of *Jatropha integerrima*. **Microbiology Indonesia**, 4, 01, P.44-48. 2010.

BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy**, 35, 7, p. 3241-3246, Jul. 2011.

CAI, B, et al. Statistical optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of corncob for xylose recovery and ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, 36, p. 250-257, Jan. 2012.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ O. Fuel ethanol production: Process design trends and integration oppoutunities. **Bioresouce Technology**, 98, p. 2415-2457, 2007.

CARVALHEIRO, F. Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 33, p. 646–654. 2006.

CASSALES, A, et al. Optimization of *soybean hull* acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, 35, 11, p 4675-4683, nov. 2011.

CASTRO, A. M; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33, 1, p. 181-188, 2010.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Química Verde no Brasil: 2010-2013**. 1ed. Brasília, DF,2010, 438p.

CHANDELA, A. K., et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, 98, 10, p. 1947–1950, jul. 2007,

CHANG, K, et al. Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. **Biomass and Bioenergy**, 35, 1, p. 90-95 jan. 2011.

CHOI, M; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass and Bioenergy**, 25, 2, p. 221–226, aug. 2003

DELABONA, P. S., et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, 37, p.243-250, 2012.

DENG, W, et al. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. **Molecular Biology Reports**, 35, p. 265-274, 2008.

DHALIWAL S. et al. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, 102, 10, p. 5968-5975, may. 2011.

DU PREEZ, J. C.; M. BOSCH; B. A. Prior. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved-oxygen levels. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 30, p. 53–58, 1989.

DUARTE, L. C. Yeast biomass production in brewery's spent grains hemicellulosic hydrolyzate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 148, 1-3, p. 119-29, mar. 2008.

DUMON, C., et al. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. **Process Biochemistry**, 47, 3, p. 346–357, mar. 2012.

ERDEI, B, et al. Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal. **Biotechnology for Biofuels**, 3, 16, jul. 2010.

FAGBEMI, A. O; IAJAH, U. J. J. Microbial population and biochemical changes during production of protein-enriched fufu. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 22, p. 653-640. 2006.

GABRIEL, F; Noel, T; ACCOCEBERRY, I. Fatal invasive trichosporonosis due to *Trichosporon loubieri* in a patient with T-lymphoblastic lymphoma. **Medical Mycology**, 49, 3, p.306-310. Apr. 2011.

GIRMENIA et al. Invasive Infections Caused by *Trichosporon* Species and *Geotrichum capitatum* in Patients with Hematological Malignancies: a Retrospective Multicenter Study from Italy and Review of the Literature. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 4,p.1818 - 1828, jun. 2010.

GROHMANN, K.; CAMERONA, R. G.; BUSLIGB, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, 54, 2, p. 129–141, 1995.

GUSMÃO, D. S., et al. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102, 8, p. 919-24, dec. 2007.

HAHN-HAGERDAL, B; GALBE, M; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residue of today. **Trends in Biotechnology**,24, 12, p. 549-556, 2006.

HAHN-HAGERDAL, B; KARHUMAA, K;FONSECA, C; SPENCER-MARTINS, I; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74, p. 937-953, 2007.

HAMMONS, D. L.; KURTURAL, S. K.; NEWMAN, M. C.; POTTER, D. A. Invasive Japanese beetles facilitate aggregation and injury by a native scarab pest of ripening fruits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 106, 10, p. 3686-3691, 2009.

HANIF, N. Q., et al. Reduction of ochratoxin A in broiler serum and tissues by *Trichosporon mycotoxinivorans*. **Research in Veterinary Science**, 93,2 p.795-797. 2011.

HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; PETERSON, K. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. **BMC Biotechnology**.4,8.2004

HICKEY, Patrick W, et al. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a Novel Respiratory Pathogen in Patients with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 47, 10, p. 3091-3097, jun. 2010.

HIDALGO, C. Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). **Food Microbiology**, 30, 1, p. 98-104, may. 2012.

HOUSEKNECHT J. L, et al. Yeasts in the *Sugiyamaella* clade associated with wood-ingesting beetles and the proposal of *Candida bullrunensis*. sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 61, 7, p. 1751-1756, jul. 2011.

HSU, C., et al. Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase-producing *Streptomyces* for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, 35, 5, p. 1878-1884, may. 2011.

HUANG, C. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresourcse Technology**, 102, 3, p. 3322-3329, Feb. 2011

HUIMIN,Z.; UNNI, N.; MICHAEL, R.; RYAN, W Production of xylitol from a mixture of hemicellulosic sugars. **Patente**, classificação internacional C12p7/18. Disponível em: <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20110721&DB=&loc ale=en EP&CC=WO&NR=2011088302A1&KC=A1&ND=2> acessado em 09/10/2012.

ISONO, N., et al. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 113, 01, p. 76-78, jan. 2012.

IYO, A. H; ANTAI, S. P. Protein enrichment of lignocelluloses resulting from the growth of two *Streptomyces* strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 7, p624-625, 1991.

JEYARAM, K, et al. Molecular identification of yeast species associated with Hamei: A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. **International Journal of Food Microbiology**, 124, 2 p.115-125. 2008.

KAUR, U., et al. Ethanol production from alkali and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **Industrial Crops and Products**, 37, 1, p. 219–226, may. 2012.

KORABECNA, M. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): Its biological meaning and application in medical mycology. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, 01, p. 783-787, 2007

KURTZMAN, C. P. Eleven new species of *Sugiyamaella* and *Candida* from forest habitats. **FEMS Yeast Research**, 7, 6, p. 1046-1063, sep. 2007.

LAOPAIBOON, P., et al. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, 101, 3, p. 1036–1043, feb. 2010.

LEE, J. M., et al. Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. **Biomass and Bioenergy**, 35, 1, p. 626-636, jan. 2011.

LEE, J. M., et al. Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. **Biomass and Bioenergy**, 35, 1, p. 626-636, jan. 2011.

LING, H., et al. Statistical optimization of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. **New Biotechnology**, 28, 6, p. 673–678, oct. 2011.

LIU, S; LU, H; HU, R; SHUPE, A; LIN, L; LIANG, B. A sustainable Woody biomass biorefinery. **Biotechnology Advances**, 30, 4, p. 785-810, jul-aug, 2012

LIU, Z., et al. Isolation and cationization of hemicelluloses from pre-hydrolysis liquor of kraft-based dissolving pulp production process. **Biomass and Bioenergy**, 35, 5, p. 1789-1796, may. 2011.

LOURENÇO, M. 2010. Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol. **Dissertação (Mestrado)**. Microbiologia agrícola, Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP.

MAGANTI, H.; BARTFAI, D.; XU, J. Ecological structuring of yeasts associated with trees around Hamilton, Ontario, Canada. **FEMS Yeast Research**, 12, 1, p. 9–19, feb. 2012.

MICHEL, A. C. S. Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja. 2007. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

MILLS, T. Y; SANDOVAL, N. R; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for biofuels**, 02, 26, p. out, 2009.

MOLNAR O, et al. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. **Systematic and Applied Microbiology**, 27, 6, p.661-671, nov. 2004.

MUSSATO, S. I; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38, 4, p. 401-413, out/dez. 2002.

NIGAM, P; SINGH, D. Solid state fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal of Basic Microbiology**, 34, p 405-414, 1994.

NYGARD, Y., et al. Bioconversion of D-xylose to D-xylonate with *Kluyveromyces lactis* **Metabolic Engineering**, 13, 4, p.383-391. Jul. 2011.

OBEROI, H. S., et al. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 39, 4, p. 557-566. 2011.

OBOH, G. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp* solid media fermentation techniques. **Electronic Journal of Biotechnology**, 9, p. 46-49. 2006.

OBOH, G; ELUSIYAN, C. A. Changes in the nutrient and anti-nutrient content of micro-fungi fermented cassava flour produced from low and medium-cyanide variety of cassava tubers. **African Journal of Biotechnology**, 6, p. 2150-2157. 2007.

ORZOCO, A. L, et al. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, 81, p. 247-252. 2008.

PANDEY, A; SOCCOL, C. R. Bioconversion of Biomass: A case study of lingo-cellulosics bioconversions in solid state fermentation. **Brazilian Archives of biology and Technology**, 41, 379-390, 1998.

PANDEY, A; SOCCOL, C. R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 74, 1, p. 69–80, aug, 2000.

PAPALEXANDRATOU, Z.; VUYST, L. Assessment of the yeast species composition of *Cocoa bean* fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Yeast Research**, 11, 7. 564-574. nov. 2011.

PENG, F; PENG, P; XU, F; SUN, R. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, 30, 4, p. 879-903, jul-aug, 2012

PENG, L.; CHEN, Y. Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, 35, 4, 1600-1606, apr. 2011.

PESSOA JR., MANCILHA, I.M., SATO, S. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. **Journal of Biotechnology**, 51, 1, 83–88 Out. 1996.

POLITIS I, et al. Use of *Trichosporon mycotoxinivorans* to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. **British Poultry Science**, 46, 1, p. 58-65, feb. 2005.

RAO, R. S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of xylitol-producing yeasts from the gut of colleopteran insects. **Current Microbiology**, 55, 5, p. 441-446, nov. 2007.

RIVERA, F. N. Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus erichson* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, 98, 02, p. 911-921, out. 2009.

RODRIGUEZ-VAZGUEZ, R; DIAZCERVANTES, D. Effect of chemical solutions sprayed on sugarcane bagasse pith to produce single cell protein – physical and chemical analysis of pith. **Bioresource Technology**, 47, p. 159-164, 1994.

SASSNER, P; GALBE, M; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, 32, p. 422-430, 2008.

SAUCEDO-LUNA, J., et al. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 38, 6, p.725-732. Jun. 2011.

SHARMAN, M. J., et al, Clinical resolution of a nasal granuloma caused by *Trichosporon loubieri*. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 12, 4, p. 345-350. Apr. 2010.

SHENOY, D, et al. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. **Biomass and Bioenergy**, 35, p. 4107-4111. 2011.

SHOKRI, H, et al. Isolation and identification of yeast flora from genital tract in healthy female camels (*Camelus dromedarius*). **Veterinary Microbiology**, 144, 1–2, Jul. p.183-186. 2010.

SING, A; MISHRA, P. Microbial production of single cell protein (SCP) and single cell oil (SCO). **Progress in Industrial Microbiology**, 52, 02, p. 197-200, 1995.

SPRINGER, T. L. Biomass yield from an urban landscape. **Biomass and Bioenergy**, 37, p. 82-87. 2012.

SUN, Z.; LIU, S. Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridia acetobutylicum* ATCC824. **Biomass and Bioenergy**, 39, p. 39-47, apr. 2012.

SUNG-OUI, S, et al. The beetle gut. a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycological Research**, 109, 3, p. 261-265, 2005.

SUNG-OUI, S, et al. The status and characterization of *Enteroramus dimorphus*: a xylose-fermenting yeast attached to the gut of beetles. **Mycologia**, 96, 4, p. 756-760, 2004.

UBALUA, A. O. Cassava wastes: Treatment options and value addition alternatives. **African Journal of Biotechnology**, 6, p. 2065-2073. 2007.

UGWUANYI, J. O; McNEIL, B; HARVEY, L. M. In: **Biotechnology for agro-industrial residues utilization**. Production of protein-enriched feed using agro-industrial residues as substrates. 2009 p. 77-100.

VARGAS BETANCUR, G; PEREIRA JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, 13, 3, jul. 2009.

WHITFIELD, M. B.; CHINN, M. S.; VEAL, M. W. Processing of materials derived from sweet sorghum for biobased products. **Industrial Crops and Products**, 37, 01, p. 362–375, may. 2012.

WILLIAMS, T. C. The Microflora of the Huhu Grub. Thesis Thesis Master University of Waikato, 2011, Available at: <<http://hdl.handle.net/10289/5336>> Date: 2011.

ZALDIVAR, J.; J. NIELSEN; L. OLSSON. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied. Microbiology and. Biotechnology**. 56, p. 17–34, 2001.

ZARAGOZAA, C., et al. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. **Revista Iberoamericana de Micología**, 28, 2, p. 79-82. apr–jun. 2011.

ZHANG, Z, et al. Biorrefining: Thermochemical and enzymatic biomass conversion. **Biotechnology Advances**, 30, 4, p. 783-784, 2012a.

ZHANG, Z; DONALDSON, A. A; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**, 30, 4, p. 913-919, 2012b.

ZHAO, J.; ,MOU, Y.; SHAN, T.; LI, Y.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, J. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Molecules**, 15.p. 7961-7970. 2010.