

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA

CULTIVO DE LEVEDURAS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO  
PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA

MANAUS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA

RELATORIO PARCIAL

PIB-B/0015/2012

CULTIVO DE LEVEDURAS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO  
PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA

Orientador: Prof. MSc Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos

MANAUS

2012

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Variáveis e níveis do planejamento experimental DCCR                                                                                | 7  |
| <b>Tabela 2:</b> Planejamento fatorial para fermentação de hidrolisado hemicelulósico em frascos cônicos.                                            | 8  |
| <b>Tabela 3:</b> Variáveis e níveis do planejamento experimental DCCR, proposto em alternativa ao planejamento inicial.                              | 8  |
| <b>Tabela 4:</b> Detalhamento dos ensaios constituídos conforme Planejamento DCCR para fermentação de hidrolisado hemicelulósico em frascos cônicos. | 8  |
| <b>Tabela 5:</b> Resultado dos ensaios de produção de biomassa usando <i>M. guilliermondii</i> .                                                     | 10 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Curvas de crescimento dos 17 ensaios.                                                                                                                                  | 10 |
| <b>Figura 2:</b> Gráfico de Pareto de efeitos padronizados. Notar que “inóculo” é a única variável com efeito significativo (seta). Valores significativos somente acima de $p$ (0,05). | 11 |
| <b>Figura 3:</b> Perfis / predição de valores desejáveis com fins de otimização do processo.                                                                                            | 12 |

## Sumário

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| Introdução .....                 | 6  |
| Material e Métodos .....         | 8  |
| Resultados e Discussão .....     | 10 |
| Conclusões e Recomendações ..... | 13 |
| Referências .....                | 14 |

## Introdução

A demanda mundial por alimentos tem crescido consideravelmente, incentivando a pesquisa por fontes não convencionais de proteína (Rajoka et al., 2011). Atualmente, diversas áreas agricultáveis têm sido utilizadas para o plantio de matéria prima para produção de ração destinada a animais, competindo com o plantio de alimentos destinado a população humana. Ante a um quadro de escassez, a biomassa microbiana pode ser aproveitada com sucesso, quer para alimentação animal, quer para alimentação humana. A despeito deste potencial, a utilização da biomassa microbiana tem como gargalo os elevados custos envolvidos em sua obtenção. A busca por substratos e processos que visem minimizar os custos na obtenção de biomassa microbiana é, portanto, uma atividade importante (Duarte et al., 2008).

Ao longo das últimas décadas, pesquisas têm demonstrado que a biomassa lignocelulósica é uma alternativa interessante para obtenção de diversos produtos como biocombustíveis, biopolímeros, ácidos orgânicos e suplementos protéicos (Xu et al., 2003; Pandey et al., 2000; Saha, 2003). Este substrato é derivado da utilização de recursos vegetais, e constitui resíduo de diversos ramos da atividade agroindustrial como indústria madeireira, de papel e celulose, sucro-alcooleira, plantio e beneficiamento de forrageiras como milho, sorgo, mandioca e soja (Pandey et al., 2000; Goldemberg, 2008). Mais recentemente, a biomassa lignocelulósica tem sido usada também como fonte de carbono para produção de lipídios aplicáveis na obtenção de biodiesel (Meng et al., 2009). Considere-se, portanto, a utilização de lignocelulose promissora tanto para obtenção proteínas quanto para obtenção de lipídios.

Estudos recentes apontam que a utilização de fragmentos de madeira para hidrólise é uma opção atraente (Silva et al., 2011). O Brasil é o terceiro maior produtor de madeira tropical do mundo, estando atrás apenas dos países asiáticos Malásia e Indonésia (Humell et al., 2010). Dentro do mercado brasileiro, a região amazônica responde por 75% da produção (Amaral et al., 1998). Segundo Lucas Filho et al. (2010), estima-se que 50% de todo estoque de madeira tropical do mundo encontra-se nesta região.

Segundo Humell et al. (2010), em 2009 o estado do Amazonas produziu 367 mil metros cúbicos de madeira em toras. Admitindo os mesmos percentuais observados para

toda a Amazônia legal, cerca de 60% da madeira extraída é categorizada como entulho, das quais cerca de 15% são queimadas ou abandonadas. Estes resíduos podem ser utilizados para obtenção de hidrolisado hemicelulósico, a partir do qual podem ser produzidas diversas substâncias com valor de mercado. O aproveitamento de resíduos de indústrias madeireiras do Amazonas pode conduzir a obtenção de um substrato de baixo custo para cultivo de microrganismos com potencial biotecnológico.

Leveduras são microrganismos do reino Fungi geralmente unicelulares com reprodução assexuada por brotamento (Stajich et al., 2009). Várias espécies apresentam potencial biotecnológico, com aplicações na panificação, produção de bebidas, biocombustíveis e suplementos alimentares. A utilização de linhagens de leveduras hábeis em crescer usando hidrolisados hemicelulósicos como fontes de carbono pode conduzir a obtenção de bioprocessos com custos relativamente baixos.

A utilização de leveduras para produção de biomassa usando hidrolisado hemicelulósico de resíduos da indústria madeireira pode constituir agregação de valor a este subproduto, podendo elevar os lucros obtidos por metro cúbico de madeira extraída.

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de hidrolisado hemicelulósico de resíduos de madeira para ser utilizado como substrato de leveduras, determinando desta forma condições ótimas para cultivo das mesmas no substrato em questão, caracterizando assim a cinética do crescimento microbiano. Avaliando a viabilidade celular e as condições ótimas para obtenção de maior rendimento de biomassa.

## Material e Métodos

O bagaço de cana de açúcar foi obtido junto a Agropecuária Jayoro, localizada no município de Presidente Figueiredo, a 120 km de Manaus. Os resíduos foram triturados, lavados, para a remoção de partículas de sujeira, e desidratados em estufa a 70 °C até obtenção de peso constante.

A hidrólise ácida foi efetuada se misturando bagaço de cana de açúcar desidratado e triturado a ácido sulfúrico, com razão sólido : líquido de 1:5. A mistura permaneceu à temperatura ambiente por 24 horas, sendo autoclavada a seguir por 40 minutos (121 °C). Após o tratamento térmico, o material foi prensado e a fase sólida descartada. A fase líquida teve o pH ajustado para 5,0 pela adição de hidróxido de cálcio.

Um isolado de *Meyerozyma guilliermondii*, preservado pelo método Castellani na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas), foi reativado em Ágar Sabouraud (peptona 10 g/L; glicose 40 g/L, pH 5,0) em 72 horas a 28 °C. A seguir, foram cultivadas em meio líquido composto de extrato de levedura (1,5 g/L), uréia (1,25 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1 g/L), glicose (10 g/L) e xilose (30 g/L), por 72 horas a 120 rpm e 30 °C para produção de biomassa utilizada como inóculo nos cultivos em hidrolisado hemicelulósico.

Os experimentos foram conduzidos em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido composto por hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, suplementado com extrato de leveduras (1,5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,25 g/L) e uréia em concentrações variáveis. Foi utilizado o delineamento central composto rotacional (DCCR), proposto pelo software Statistica 6.0 (Statsoft ®), com três variáveis em 5 níveis, conforme apresentado na tabela 1.

**Tabela 1:** Variáveis e níveis do planejamento experimental DCCR.

| Variáveis                   | Níveis das variáveis |     |     |     |            |
|-----------------------------|----------------------|-----|-----|-----|------------|
|                             | - $\alpha$           | -1  | 0   | +1  | + $\alpha$ |
| Tamanho do inóculo (g/L)    | 1,65                 | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 8,35       |
| Concentração de Ureia (g/L) | 0,33                 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 3,67       |
| Temperatura (°C)            | 25                   | 25  | 30  | 35  | 35         |

Um total de 17 ensaios, compostos conforme tabela 2, foram realizados ao longo de 120 horas, mantidos sob agitação a 120 rpm. A cada 12 horas uma alíquota de 100 µL foi coletada de cada frasco e diluída 10 vezes, sendo analisado a densidade ótica a

600nm para estimar o crescimento celular ao longo dos cultivos. As amostras foram preservadas congeladas, a fim de serem analisadas posteriormente.

**Tabela 2:** Planejamento fatorial para fermentação de hidrolisado hemicelulósico em frascos cônicos.

| Ensaio | Inóculo (g/L) | [Uréia] (g/L) | Temperatura (°C) |
|--------|---------------|---------------|------------------|
| 1      | 3,00          | 1,00          | 25,00            |
| 2      | 3,00          | 3,00          | 35,00            |
| 3      | 7,00          | 1,00          | 35,00            |
| 4      | 7,00          | 3,00          | 25,00            |
| 5 ©    | 5,00          | 2,00          | 30,00            |
| 6      | 3,00          | 1,00          | 35,00            |
| 7      | 3,00          | 3,00          | 25,00            |
| 8      | 7,00          | 1,00          | 25,00            |
| 9      | 7,00          | 3,00          | 35,00            |
| 10 ©   | 5,00          | 2,00          | 30,00            |
| 11     | 1,65          | 2,00          | 30,00            |
| 12     | 8,35          | 2,00          | 30,00            |
| 13     | 5,00          | 0,33          | 30,00            |
| 14     | 5,00          | 3,67          | 30,00            |
| 15     | 5,00          | 2,00          | 25,00            |
| 16     | 5,00          | 2,00          | 35,00            |
| 17 ©   | 5,00          | 2,00          | 30,00            |

Legenda: (c) Ponto central

Um segundo planejamento fatorial, proposto como ajuste ao longo da execução do projeto, foi constituído conforme tabelas 3 e 4.

**Tabela 3:** Variáveis e níveis do planejamento experimental DCCR, proposto em alternativa ao planejamento inicial.

| Variáveis                   | Níveis das variáveis |     |     |     |            |
|-----------------------------|----------------------|-----|-----|-----|------------|
|                             | - $\alpha$           | -1  | 0   | +1  | + $\alpha$ |
| Tamanho do inóculo (g/L)    | 2,17                 | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 7,82       |
| Concentração de Uréia (g/L) | 0,80                 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,20       |

**Tabela 4:** Detalhamento dos ensaios constituídos conforme Planejamento DCCR (tabela 3) para fermentação de hidrolisado hemicelulósico em frascos cônicos.

| Ensaio | Inóculo (g/L) | [Uréia] (g/L) |
|--------|---------------|---------------|
| 1      | 3,00          | 1,00          |
| 2      | 3,00          | 2,00          |
| 3      | 7,00          | 1,00          |
| 4      | 7,00          | 2,00          |
| 5 ©    | 5,00          | 1,50          |
| 6      | 2,17          | 1,50          |
| 7      | 7,80          | 1,50          |
| 8      | 5,00          | 0,80          |
| 9      | 5,00          | 2,20          |
| 10 ©   | 5,00          | 1,50          |

## Resultados e Discussão

Os ensaios foram conduzidos conforme o planejado. As curvas de crescimento dos 17 ensaios são apresentadas na figura 1.

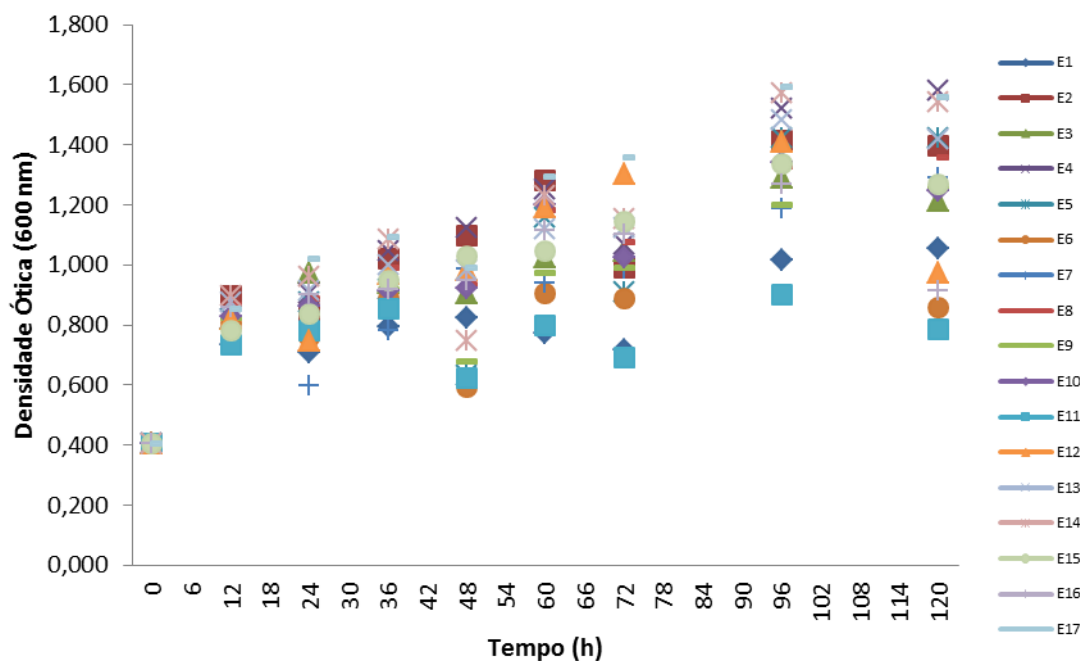


**Figura 1:** Curvas de crescimento dos 17 ensaios. Observar as legendas a direita do gráfico.

Os ensaios 4, 17 e 14 apresentaram as maiores densidades óticas, sendo provavelmente estes os de maior crescimento celular. A caracterização bioquímica da biomassa microbiana e a análise estatística dos dados serão executadas em etapas posteriores.

A análise estatística do ensaio indicou que nenhum dos fatores foi significativo, o que provavelmente resulta de erros na execução do planejamento fatorial inicialmente estabelecido. Diante de tal fato, um novo delineamento foi proposto, conforme previamente exposto nas tabelas 3 e 4.

O novo experimento, constituído por 10 ensaios, foi executado conforme planejado, tendo seus resultados expostos na tabela 5.

A análise estatística indicou que o fator “Inóculo” foi o único com efeito significativo, não havendo significância do fator “Concentração de uréia” nem interferência entre os dois fatores, conforme gráfico de Pareto apresentado na figura 2.

Este resultado é consonante com o de Betancur (2010), o qual encontrou que “inóculo” foi o único fator significativo para a produção de biomassa em hidrolisado

hemicelulósico de cana-de-açúcar ao longo do processo fermentativo para produção de etanol.

**Tabela 5:** Resultado dos ensaios de produção de biomassa usando *M. guilliermondii*.

| Ensaio | Biomassa obtida (g/L) |
|--------|-----------------------|
| 1      | 5,00                  |
| 2      | 4,98                  |
| 3      | 5,60                  |
| 4      | 5,58                  |
| 5 ©    | 3,50                  |
| 6      | 3,64                  |
| 7      | 7,28                  |
| 8      | 3,06                  |
| 9      | 3,30                  |
| 10 ©   | 3,16                  |

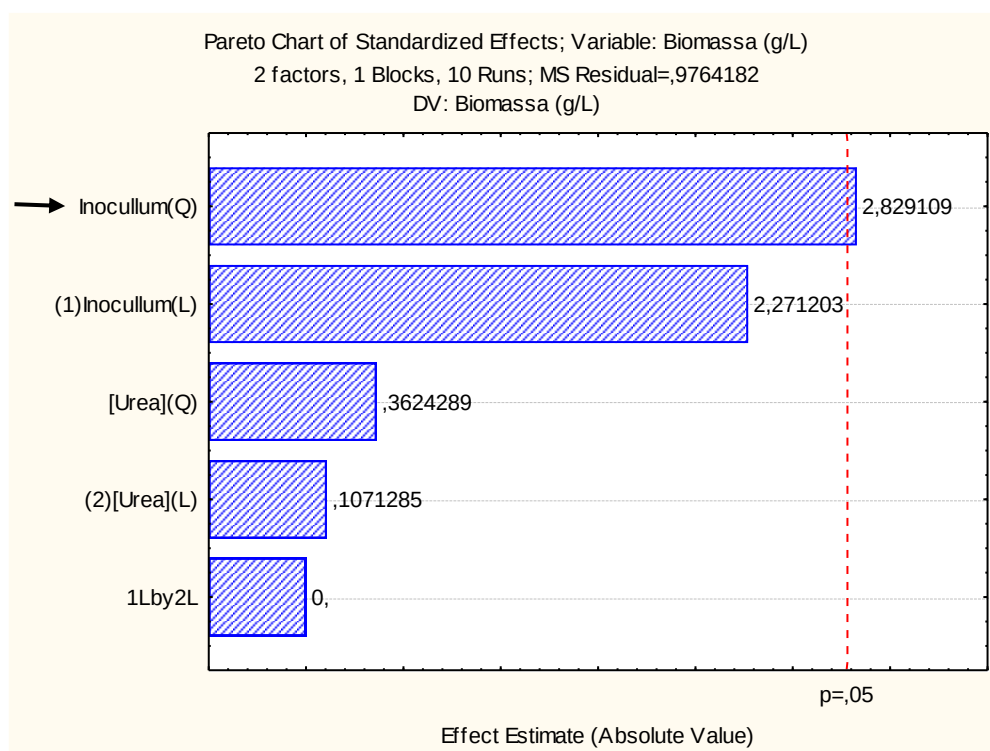


**Figura 2:** Gráfico de Pareto de efeitos padronizados. Notar que “inóculo” é a única variável com efeito significativo (seta). Valores significativos somente acima de  $p$  (0,05).

A predição de otimização indicou que os valores ótimos para obtenção de biomassa seriam 2,70 g/L de inóculo e 2,0 g/L de uréia (figura 3). Tendo em vista o fim do cronograma do projeto, a validação destes valores será executado em um outro momento.

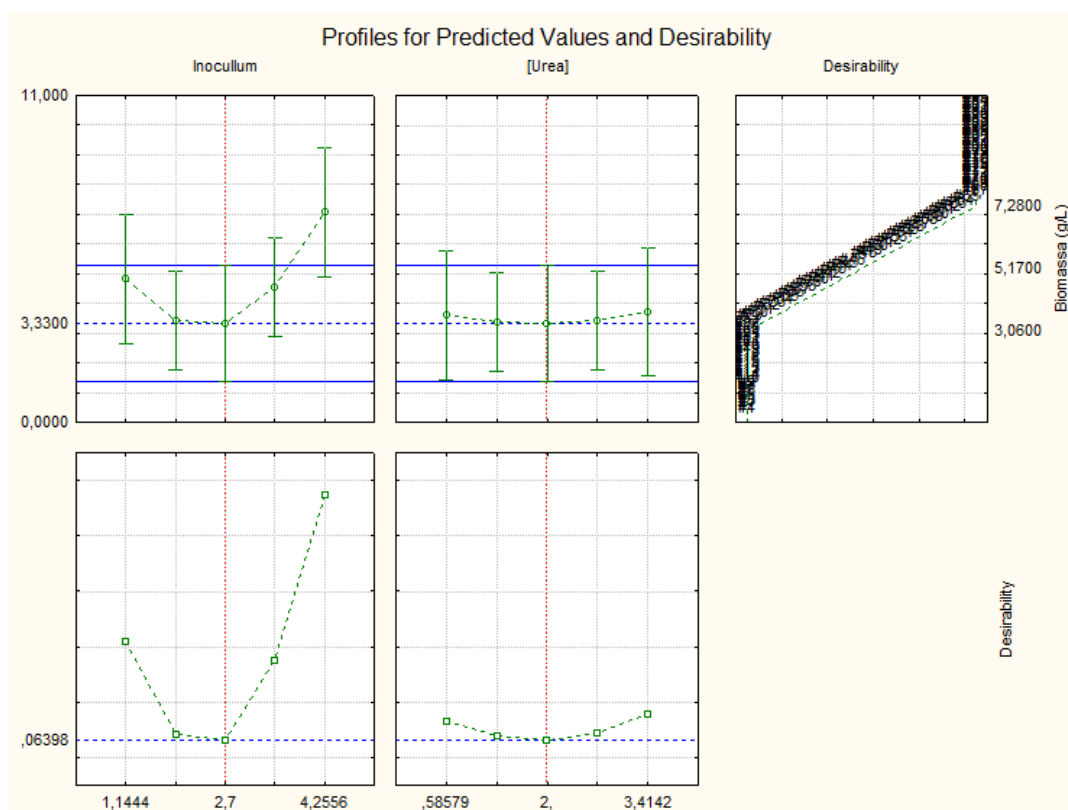


**Figura 3:** Perfis / predição de valores desejáveis com fins de otimização do processo.

## Conclusões e Recomendações

O tamanho do inóculo é o único fator preponderante para a produção de biomassa por *Meyerozyma guilliermondii* nas condições avaliadas.

Diferentemente de ensaios anteriores, esta linhagem apresentou baixa produtividade, o que indica que pode ter ocorrido um comprometimento da linhagem ao longo do período de estocagem.

Diversos trabalhos científicos indicam o potencial de *Meyerozyma guilliermondii* (sinônimas *Pichia guilliermondii* e *Candida guilliermondii*) na produção de etanol, xilitol e biomassa microbiana como suplemento proteico. Novos esforços devem ser empreendidos no sentido de atestar a aplicabilidade industrial da linhagem utilizada neste projeto.

## Referências

- Amaral, P.; Veríssimo, A.; Barreto, P.; Vidal, E. 1998. **Floresta para Sempre: um Manual para Produção de Madeira na Amazônia**. Belém: Imazon. 130 pp.
- Betancur, G. J. V. 2010. **Otimização do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração**. Tese de Doutorado em Ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 174 pp.
- Duarte, L. C.; Carneiro F.; Lopes, S.; Neves, I.; Gírio, F. M. 2008. Yeast Biomass Production in Brewery's Spent Grains Hemicellulosic Hydrolyzate. **Appl Biochem Biotechnol**. 148: 119–129. DOI 10.1007/s12010-007-8046-6.
- Goldemberg, J. 2008. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**. 1:6-13. DOI:10.1186/1754-6834-1-6
- Hummel, A. C.; Alves, M. V. S.; Pereira, D.; Veríssimo, A. V.; Santos, D. 2010. **A atividade madeireira na Amazônia brasileira: produção, receita e mercados**. Belém, PA: Serviço Florestal Brasileiro (SFB); Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia (Imazon), 20 pp.
- Lucas Filho, F. C.; Pio, N. S.; Ferreira, D. R. 2010. Método QFD como Ferramenta para Desenvolvimento Conceitual de Produtos de Madeiras da Amazônia. **Acta Amazonica**. Vol. 40(4):675 – 686.
- Matos, I. T. S. R. 2010. **Seleção de leveduras amazônicas capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico e fermentar D-xilose**. Dissertação de Mestrado em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 68 pp.
- Meng, X.; Yang, J.; Zhang, L.; Nie, Q., Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**. 34: 1–5. DOI 10.1016/j.renene.2008.04.014
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. 74: 69–80.
- Rajoka, M. I.; Ahmed, S.; Hashmi, A. S.; Athar, M. 2011. Production of microbial biomass protein from mixed substrates by sequential culture fermentation of *Candida utilis* and *Brevibacterium lactofermentum*. **Ann Microbiol**. DOI 10.1007/s13213-011-0357-8
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial and Microbiology and Biotechnology**. N° 30, p. 279–291.

Silva, N. L. C.; Betancur, G. J. V.; Vasquez, M. P.; Gomes, E. B.; Pereira Jr, N. 2011. Ethanol Production from Residual Wood Chips of Cellulose Industry: Acid Pretreatment Investigation, Hemicellulosic Hydrolysate Fermentation, and Remaining Solid Fraction Fermentation by SSF Process. **Appl Biochem Biotechnol**. 163: 928–936. DOI 10.1007/s12010-010-9096-8

Stajich, J. E.; Berbee, M. L.; Blackwell, M.; Hibbett, D. S.; James, T. Y. Spatafora, J. W.; Taylor, J. W. 2009. The Fungi. **Current Biology**. V. 19, N° 18: 840-845.

Xu, C. P.; Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Choi, J. W.; Yun, J. W. 2003. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. **Process Biochemistry**. 38: 1025-1030.

Zhao, L., Yu, J., Zhang, X., Tan, T. 2008. The Ethanol Tolerance of *Pachysolen tannophilus* in Fermentation on Xylose. **Appl Biochem Biotechnol**. DOI: 10.1007/s12010-008-8308-y.