

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DE LEVEDURAS
ISOLADAS DE MADEIRA EM DECOMPOSIÇÃO DO
ARQUIPÉLAGO DAS ILHAS GALÁPAGOS
(EQUADOR)**

María Cristina Guamán Burneo

Belo Horizonte

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DE LEVEDURAS
ISOLADAS DE MADEIRA EM DECOMPOSIÇÃO DO
ARQUIPÉLAGO DAS ILHAS GALÁPAGOS
(EQUADOR)**

María Cristina Guamán Burneo

Belo Horizonte

2013

María Cristina Guamán Burneo

**PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DE LEVEDURAS
ISOLADAS DE MADEIRA EM DECOMPOSIÇÃO DO
ARQUIPÉLAGO DAS ILHAS GALÁPAGOS
(EQUADOR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientadores: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva
Escola de Engenharia de Lorena
Universidade de São Paulo – Lorena

Prof. Dr. Javier Carvajal Barriga
Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Belo Horizonte

2013

*A mi querida familia,
por ser mi guía, mi apoyo, mi fuerza
y mi ejemplo de lucha y amor constante*

AGRADECIMENTOS

*Façamos da interrupção um caminho novo.
Da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sonho uma ponte, da procura um encontro!*

Fernando Sabino

Ao meu Senhor, pelo dom da vida, pelas oportunidades e pelas pessoas que tenho encontrado nesta minha caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG, pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao meu orientador, Carlos Rosa, pela paciência, pelos conselhos e pelo apoio. Além das orientações científicas, ele me ensinou, com seu exemplo, virtudes que serão sempre valiosas na minha vida profissional e pessoal.

À Escola de Engenharia de Lorena/ USP, pela oportunidade de aprender e poder realizar parte dos experimentos no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Biotecnologia.

Ao meu coorientador, professor Silvio Silvério, pela confiança, pelas sugestões, pela amizade e pelo incentivo no desenvolvimento do mestrado.

Ao professor e amigo Javier Carvajal, pelo estímulo e torcida durante minha vida acadêmica, pelos ensinamentos, pela força e pelo carinho durante estes anos.

À minha família, pelo amor de sempre. Apesar da distância, sempre pude contar com seu apoio, sua confiança, seus conselhos e sua força, o que me ajudou a continuar nos momentos difíceis, assim como seu carinho fez o meu caminho mais leve.

À Tássia (Fofis!), pelo grande apoio e pela amizade. Mais que minha colega de apartamento, tornou-se minha irmã, aquela pessoa que compartilha minhas alegrias, e com paciência e carinho me ajuda “arrumar minhas bagunças”.

Ao pessoal do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, pelo agradável convívio dentro e fora do laboratório, pela amizade e pelo incentivo durante todo este tempo. Em especial a minhas “curicas” Bárbara, Sil, MariZé, Mona, Larissa (Té), Camila (s), Rê, Fran e Iara. Obrigada à Adri, Fer Piló, Laurinha, Carla, Luiz e Lú, pela amizade e pelos conselhos.

Às minhas irmãs Mari Rocha, pela força, pela meiguice e pelo carinho. E a minha querida *hermanita del alma*, Raquel, por ser meu anjo protetor, porque apesar da distância nunca deixou de me aconselhar, de dar animo e ajudar no que fosse preciso, não tenho palavras para agradecer todo o que recebi de vocês neste tempo.

A Karine e Elisa, que acompanharam meu caminho e sempre me incentivaram a continuar.

Ao pessoal da dança, pela companhia, pela amizade, pelo apoio e pela alegria; vocês complementaram minha vida e fizeram-na mais feliz. Obrigada aos salseiros, em especial ao Clarindo, Stephie, Andréa, Agnaldo, Zé Marcos, Alessandra, Creuzinha, Ana Paula e Fernando, por terem se tornado minha família durante esta caminhada, por serem meus anjos, meus grandes amigos.

Ao pessoal da EEL/Lorena, em especial à Kelly, pelas dicas, pela paciência e, sobretudo, pela amizade. Ao meu grande amigo Paulo, pela acolhida, pelos conselhos, pelo apoio e pelo carinho. A Adriana, Ellen, Samira (s), Bruna, Otavio, Larissa e Jú, pelo agradável convívio durante minha estadia no laboratório. Aos amigos “lorenenses” Isabela, Dayelle, Babi, Mayara, Bela, Fernanda, Felipe e Priscila Arruda, pelos conselhos e pela amizade.

Aos intercambistas, pelas experiências compartilhadas, pela força e pelos momentos agradáveis, em especial a José Luis, Paola, Germana, Winnie e Sam.

Às amigas de sempre, Yani, Mapri, Nory e Dianita, e às minhas primas que tanto amo, MaGus e Anita, obrigada por fazerem da distância só um pretexto

para encontrar novos jeitos de conversar, de nos apoiar e de expressar o carinho que temos entre nós.

Ao SENESCYT (*Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador*), pelo financiamento do meu mestrado.

A todos aqueles que fizeram possível a realização deste trabalho, por me ensinar que os sonhos são simplesmente as pontes para a felicidade.

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis e pessoas incomparáveis.

RESUMO

O xilitol é um poliálcool de alto valor agregado devido ao poder adoçante semelhante ao da sacarose. Apresenta propriedades anticariogênicas e metabolismo insulina-independente, o que garante sua aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Além disso, o xilitol é utilizado na área clínica, principalmente no tratamento da osteoporose e de doenças respiratórias. A obtenção do xilitol por via biotecnológica utilizando resíduos agroindustriais é uma alternativa sustentável e economicamente viável, comparada com o processo químico tradicionalmente utilizado. Sendo assim, a extração por via biotecnológica se baseia na utilização de micro-organismos e, ou, enzimas que permitam a liberação da D-xilose a partir de hidrolisados hemicelulósicos. Um dos principais materiais lignocelulósicos que geram produtos de valor agregado, como o xilitol, é o bagaço de cana-de-açúcar, matéria-prima disponível em abundância no Brasil e em outros países. A bioconversão da D-xilose nesse poliálcool mediante o emprego de leveduras é possível, uma vez que o xilitol é um produto intermediário da via metabólica da D-xilose. O presente trabalho teve como objetivo a prospecção e a seleção de espécies de leveduras produtoras de xilitol para serem utilizadas em processos fermentativos, empregando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Foram testadas 140 leveduras provenientes de 35 amostras de madeira em decomposição coletadas nas ilhas *Floreña*, *Santa Cruz* e *Isabela*, pertencentes ao arquipélago das Ilhas Galápagos, Equador. Os meios de cultura utilizados para o isolamento dessas leveduras foram *Yeast Nitrogen Base* (YNB)-D-xilose, carboximetilcelulose e YNB-xilana. As espécies do gênero *Candida* (incluindo isolados relacionados aos clados *Yamadazyma*, *Kazachstania*, *Kurtzmaniella*, *Lodderomyces/Spathaspora*, *Metschnikowia* e *Saturnispora*) foram as mais frequentemente isoladas neste estudo. *Candida* (*Lodderomyces/Spathaspora*) *tropicalis* foi identificada como a espécie predominante, seguida por *Kazachstania unispora*, *Candida* (*Kurtzmaniella*) *natalensis*, *Zygowilliaopsis californica* e *Candida sinolaborantium*. Em testes de fermentação utilizando meio semi-sintético com D-xilose (50 g.L⁻¹), *C. tropicalis* CLQCA-24SC-125 foi a linhagem com maior produção de xilitol, com fator de rendimento ($Y_{p/s}$) de 0,67 g.g⁻¹ e produtividade (Q_p) de 0,34 g.L⁻¹.h⁻¹. Em

fermentações com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como substrato, essa levedura apresentou também a maior produção de xilitol, com o mesmo fator de rendimento de $0,67 \text{ g.g}^{-1}$ e produtividade de $0,38 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Uma nova espécie de *Lindnera*, representada pela linhagem CLQCA-24SC-025, foi a segunda com melhores resultados para produção de xilitol em hidrolisado de cana-de-açúcar, com $Y_{p/s}$ de $0,64 \text{ g.g}^{-1}$ e Q_p de $0,33 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Em fermentador de 2,4 L, utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado, *C. tropicalis* CLQCA-24SC-125 apresentou os melhores resultados, com produção de $37,2 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol em 96 horas de fermentação, com um $Y_{p/s}$ de $0,83 \text{ g.g}^{-1}$, Q_p de $0,39 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, eficiência total do 90,9% e $Y_{p/x}$ de $12,53 \text{ U.g}^{-1}$ de células. Esse resultado indicou que as condições empregadas de disponibilidade de oxigênio e agitação foram as melhores para essa levedura. Os resultados do presente estudo apontam o potencial biotecnológico das leveduras isoladas a partir de madeira em decomposição do arquipélago de Galápagos para produção de xilitol a partir de cultivos realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Xylitol is a polyol with high added value due to the sweetness similar to sucrose with anticariogenic properties and insulin metabolism independent that guarantee its application in food and pharmaceutical industries. In addition, it is mainly used in clinic treatment of osteoporoses and respiratory diseases. It is currently produced by chemical catalysis of the xylose from lignocellulosic residues. However, this process needs expensive purification steps to obtain pure xylitol. Alternatively, it can be produced by biotechnological methods, using micro-organisms or enzymes, which allowing the release of D-xylose from hemicellulosic hydrolysates. A major lignocellulosic material that generates value-added products, such as xylitol, is the sugarcane bagasse, raw material available in abundance in Brazil and other countries. Bioconversion of D-xylose in this polyalcohol by the use of yeasts is possible, since the xylitol is an intermediate product of the metabolic pathway of D-xylose. In this context, the present study aimed the screening and selection of yeast species to fermentation processes using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for xylitol production. A total of 140 yeast strains were isolated from 35 rotting wood samples collected in the islands *Florena*, *Santa Cruz* and *Isabela*, belonging to the Galápagos Archipelago, Ecuador. These samples were cultured in Yeast Nitrogen Base (YNB)-D-xilose, carboxymethyl cellulose and YNB-xylan media. Species of the genus *Candida* (including isolates related to the clades *Yamadazyma*, *Kazachstania*, *Kurtzmaniella*, *Lodderomyces/Spathaspora*, *Metschnikowia* and *Saturnispora*) were predominant in this study. *Candida (Lodderomyces/Spathaspora) tropicalis* followed by *Kazachstania unispora*, *Candida (Kurtzmaniella) natalensis*, *Zygowilliopsis californica* and *Candida sinolaborantium* were the most frequently isolated yeasts. In semi-synthetic fermentation assays using D-xylose (50 g.L⁻¹) culture medium, *C. tropicalis* CLQCA-24SC-125 show the highest xylitol production yield ($Y_{p/s}$: 0.67 g.g⁻¹) and a productivity (Q_p : 0.34 g.L⁻¹.h⁻¹). Furthermore, in fermentations with sugarcane bagasse hydrolysates as a substrate, this yeast showed the highest production of xylitol with the same yield of 0.67 g.g⁻¹ and a productivity of 0.38 g.L⁻¹.h⁻¹. Whereas, the second species

had better results for xylitol production in sugarcane hydrolysates it was a new *Lindnera* species, represented by strain CLQCA-24SC-025, with $Y_{p/s}$ of 0.64 g.g^{-1} and Q_p 0.33 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. In 2.4 L bioreactor using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates, *C. tropicalis* CLQCA-24SC-125 showed the best results, with a production of 37.15 g.L^{-1} in xylitol in 96 h of fermentation, with an $Y_{p/s}$ of 0.83 g.g^{-1} , Q_p of 0.39 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, total efficiency of 90.9% and $Y_{p/x}$ of 12,53 U.g^{-1} cells. This study demonstrates the biotechnological potential of yeasts isolated from decaying wood of the Galapagos Archipelago for xylitol production using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates.