



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

DISSERTAÇÃO MESTRADO

**Avaliação da produção de bioetanol por
linhagens de *Spathaspora passalidarum*
isoladas da Floresta Amazônica Brasileira**

Monaliza de Araújo Melo

Belo Horizonte
2013

Monaliza de Araújo Melo

Avaliação da produção de bioetanol por linhagens de *Spathaspora passalidarum* isoladas da Floresta Amazônica Brasileira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub – Laboratório de Engenharia Bioquímica e Biotecnologia (BiotecLab) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2013

Página com as assinaturas dos membros da banca examinadora, fornecida pelo Colegiado do Programa

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos de caminhada, muitas foram às pessoas importantes que contribuíram de maneiras diversas para o desenvolvimento desse trabalho.

Acima de tudo, agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para concluir o trabalho proposto.

Aos meus pais por acreditarem na minha capacidade e por todo o suporte (financeiro e emocional) para continuação dos estudos, que eles tanto priorizaram em minha vida.

Aos meus irmãos Célio Jr., Caio e Maíra, pelo apoio apesar de acharem esse trabalho em laboratório ‘coisa de doido’.

Ao meu namorado, Fabrício, pelo amor, companhia, pela paciência, tolerância e incentivo nos momentos de desespero e angústia.

A minha amada vó Maria, Tia Dani e Robson que me proporcionaram momentos de distração em meio à correria do mestrado e um dos maiores presentes nesse período: Heitor, a paixão da dindinha!

À minha cunhada Aline e a princesinha Laís pelo exemplo de confiança, garra e superação.

Às minhas amigas inseparáveis Pri, Fabi e Bebel por compreenderem a distância, mas continuarem companheiras fiéis acima de tudo.

Aos amigos da biologia, que me ajudaram a compreender que o amor pela biologia supera as dúvidas e problemas inerentes a profissão.

À toda família Cheab e aos demais amigos pelo apoio, em especial ao Wilson e Ana Maria.

Aos meus padrinhos Eliana e Helinho, em especial minha madrinha que participou e vibrou intensamente em todas as etapas do mestrado.

Agradeço as gurias do Bioteclab, Manu, Sheila, Nicole, Vanessa, Cíntia, Elis, Lígia, Alê, Ferzinha, Lilian, Chaline, Ilana, Carla, Daiane, aos ICs Karol, Marcelo, Gabi, Vanessa, Vinícius e aos professores Rosane e Plinho que me acolheram com carinho e contribuíram muito para a realização do trabalho. Em especial a Sabrina que além de abrir as portas de sua casa, ofereceu-me sua amizade, fundamental para suportar a saudade de casa.

Ao meu co-orientador Ayub por me receber em seu laboratório, e por toda a atenção, orientação e dedicação. Esses seis meses em Porto Alegre contribuíram muito para meu crescimento pessoal, profissional e permitiu-me enxergar a vida com outros olhos.

Aos meus colegas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, principalmente as companheiras de mestrado Bárbara, Sil, Mari Zé, Camila G. e Cris amigas que garantiram a diversão nas aulas e no lab, mas também ajudaram com as pedras do caminho.

A banca examinadora, Dr. Sílvio Silvério, Dr^a. Fátima de Cássia e Dr. César Faria, que aceitaram compartilhar seu conhecimento científico e contribuir para melhoria do trabalho.

A CAPES e ao departamento de microbiologia, pelo auxílio financeiro indispensável para o desenvolvimento da pesquisa.

É claro que não poderia faltar um agradecimento mais que especial dedicado a Raquel, minha mãe, amiga, companheira, exemplo e inspiração, uma das principais responsáveis por tudo que aprendi, sou e tenho construído em minha vida acadêmica. Quel, muito obrigado é pouco para você!

Ao meu orientador Carlos Rosa, que recebeu-me de braços abertos e sorriso no rosto. Obrigada por ter permitido a escolha da linha de pesquisa, pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho em outro estado, por sempre lembrar-me que é fundamental manter a calma, controlar a ansiedade e por toda a paciência nesses momentos finais do mestrado.

RESUMO

A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica tem sido intensamente estudada como uma das possibilidades para obtenção de energia renovável. A padronização de tratamentos eficazes para liberação e recuperação de altas taxas dos monômeros de açúcares e a procura por micro-organismos fermentadores de pentoses e tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico têm sido foco de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento econômico viável da tecnologia de obtenção de etanol lignocelulósico. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a capacidade de produção de etanol por linhagens de *Spathaspora passalidarum*, espécie de levedura fermentadora de D-xilose, isoladas de madeira em decomposição da Floresta Amazônica Brasileira, em diferentes condições de cultivo (condição de oxigenação moderada e limitante) e meios de fermentação, visando o emprego dessa levedura para produção de etanol de segunda geração. Além disso, foram determinadas algumas características como temperaturas máximas de crescimento e de fermentação, e tolerância ao etanol, que interferem na fisiologia das linhagens da levedura. As linhagens de *S. passalidarum* foram capazes de crescer entre as temperaturas de 38°C a 41°C, com capacidade de fermentar D-xilose a etanol nas temperaturas de 34°C a 39°C e com tolerância máxima de 4% (v/v) de etanol, com exceção da linhagem tipo que tolerou 6% (v/v). No que se refere à fermentação dos açúcares na condição moderada de oxigenação (agitação a 180 rpm com vedação rolha gaze), a eficiência de conversão dos açúcares a etanol ($Y_{p/s}$) e a produtividade (Q_p) variaram de 0,33 a 0,47 g/g e 0,21 a 0,43 g/L.h, respectivamente, enquanto para a fermentação em condições limitantes de oxigenação (agitação a 120 rpm com vedação anel de silicone e tampa de rosca) os valores variam entre 0,30 a 0,61 g/g para a eficiência de conversão dos açúcares a etanol e entre 0,10 a 0,22 g/L.h para a produtividade. As quantidades observadas de subprodutos da fermentação de D-xilose, como xilitol e glicerol, em ambas as condições de oxigenação avaliadas foram baixas, sendo o etanol o principal produto formado com concentrações de 9,6 a 18,1 g/L. Na fermentação em biorreator sob condição limitante de oxigenação, utilizando hidrolisado de casca de soja sem suplementação ou processo de destoxificação, foram encontrados valores de $Y_{ps} = 0,25$ g/g e $Q_p = 0,02$ g/L.h, com a produção máxima de 3,8 g/L de etanol. Os resultados desse trabalho mostram o potencial biotecnológico de linhagens de *S. passalidarum* para a obtenção de etanol lignocelulósico, em especial pela capacidade de fermentar xilose a etanol sob condições de anaerobiose.

ABSTRACT

The production of second generation ethanol from lignocellulosic biomass has been extensively studied as one of the possibilities for obtaining renewable energy. The standardization of effective treatments for recovery and release of high levels of sugar monomers, and the demand for pentoses-fermenting microorganisms capable to tolerate inhibitors present in lignocellulosic hydrolyzates have been the focus of research on the viable economic development of technology for obtaining lignocellulosic ethanol. In this context, the aim of the present work was to study the ability of ethanol production by *Spathaspora passalidarum* strains, a D-xylose-fermenting yeast species, isolated from rotting wood collected in the Brazilian Amazonian Forest, in different culture conditions (presence and absence of oxygen) and fermentation media, targeting the use of this yeast for the production of second generation ethanol. Furthermore, some characteristics as maximum temperatures for growth and fermentation and ethanol tolerance were determined, which interfere in the physiology of yeast strains. *Spathaspora passalidarum* strains were able to grow at temperatures between 38°C to 41°C and to ferment D-xylose to ethanol from 34°C to 39°C with a maximum ethanol tolerance of 4% (v/v), except for the type strain which tolerated 6% (v/v). Concerning to the fermentation of sugars in the presence of oxygen, ethanol yield ($Y_{p/s}$) and productivity (Q_p) ranged from 0.33 to 0.47 g/g and 0.21 to 0.43 g/L.h, respectively. In fermentation under oxygen-limited conditions, $Y_{p/s}$ values ranged from 0.30 to 0.61 g/g and Q_p from 0.10 to 0.22 g/L.h. The observed amounts of D-xylose fermentation by-products, such as xylitol and glycerol in both oxygenation conditions evaluated were low, being ethanol the main product formed with concentrations between 9.6 to 18.1 g/L. In a bioreactor fermentation assay under anaerobic condition using soybean hull hydrolyzate without supplementation and detoxification, values of $Y_{ps} = 0.25\text{g/g}$ and $Q_p = 0.02\text{ g/L.h}$ were found, with maximum ethanol concentration of 3.8 g/L. The results of this study show the biotechnology potential of *S. passalidarum* strains to obtain lignocellulosic ethanol, in particular for its ability to ferment xylose to ethanol under anaerobic conditions.