

EFEITO DO GLICEROL NA BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL POR *Candida guilliermondii*

Priscila Vaz de Arruda ¹, Débora Danielle Virgínio da Silva ² e Maria das Graças de Almeida Felipe ³

¹ Iniciação Científica, DEBIQ, FAENQUIL. Rod. Itajubá-Lorena Km 74,5 C P 116, CEP 12600-970, Lorena-SP. e-mail: priscilavaz_eb@yahoo.com.br

² Doutoranda/CAPES, DEBIQ, FAENQUIL. Rod. Itajubá-Lorena Km 74,5 C P 116, CEP 12600-970, Lorena-SP. e-mail: debora@debiq.fauenquil.br

³ Professora orientadora, DEBIQ, FAENQUIL. Rodovia Itajubá-Lorena Km 74,5 C P 116, CEP 12600-970, Lorena-SP. e-mail: mgafelipe@debiq.br

Palavras-chave: glicerol, xilitol, *Candida guilliermondii*.

Área do Conhecimento: II Ciências Biológicas

Resumo- Pesquisas para a obtenção microbiológica de xilitol, adoçante não cariogênico, permitido para obesos e diabéticos e mais recentemente indicado na prevenção de otites e osteoporose apontam para a viabilidade técnica de obtenção biotecnológica deste poliálcool. Porém os rendimentos deste bioprocessamento ainda são baixos quando comparado com outros processos biotecnológicos sendo que um dos fatores responsáveis é a formação de subprodutos deste metabolismo, como o glicerol. A fim de se avaliar a influência do glicerol sobre a formação de xilitol e contribuir para o melhor entendimento da via metabólica envolvida na bioconversão de xilose em xilitol, experimentos serão conduzidos com a levedura *Candida guilliermondii* empregando-se meio sintético contendo xilose e glicerol em diferentes proporções.

Introdução

O xilitol é um composto do grupo dos poliálcois, ou seja, é um álcool que apresenta, ligado a cada átomo de carbono de sua molécula, um grupo hidroxila, formado por um átomo de oxigênio e um de hidrogênio. Esse álcool tem a fórmula química C₅H₁₂O₅ (Figura 1) e pode ser encontrado em líquens, fungos, algas e legumes, e também como um intermediário do metabolismo de carboidratos em animais, inclusive no homem [1].

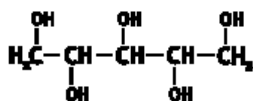


Figura 1: Esquema da molécula de xilitol [2].

Possui massa molar 152,15g/mol com poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de poliálcois comuns, com valor calórico reduzido (apenas 2,4 calorias por grama) [1].

O xilitol apresenta-se como um pó cristalino e branco, sem odor. Suas características químicas proporcionam sensação de frescor quando dissolvido na saliva, efeito explorado em pastilhas, chicletes e balas. Uma vantagem desse composto, em relação a outros adoçantes, é o fato de não apresentar sensação desagradável após o uso [3].

Além disto, não participa das reações de Maillard, que provocam escurecimento do produto [4].

Este poliálcool também tem efeito não-cariogênico. Essa propriedade deve-se ao fato desse poliálcool não ser metabolizado por microrganismos da biota bucal, principalmente a bactéria *Streptococcus mutans*, o que impossibilita a proliferação das bactérias e conseqüentemente impede a produção de ácidos que atacam o esmalte do dente. Também pode ser classificado como anticariogênico, por estimular a produção da saliva, que possui capacidade tamponante, o que, juntamente com o aumento na concentração de íons cálcio e fosfato, induz a remineralização, revertendo lesões de cáries recém-formadas [5,6]. Recentemente foi demonstrado que esse poliálcool pode ser usado na prevenção de otite média aguda [7] e de osteoporose [8].

Todas essas características apresentadas pelo xilitol têm garantido seu uso com demanda crescente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e odontológica. No Brasil, a sua utilização está voltada principalmente a produtos como creme dental, gomas de mascar e pastilhas.

A produção do xilitol em larga escala, atualmente, é obtida através de processo químico, que consiste na reação de hidrogenação catalítica de D-xilose, um açúcar comumente encontrado na parede de células vegetais na forma do polímero xilana. A D-xilose, é obtida através de hidrólise ácida ou enzimática da fração hemicelulósica de

materiais lignocelulósicos. Nesta hidrólise, as xilanas são quebradas em moléculas de xilose. Entretanto, por existirem polímeros de outros glicídios presentes na hemicelulose, o processo químico se estende a inúmeras etapas de separação e purificação devido ao aparecimento de vários subprodutos [9]. Isto, aliado às drásticas condições de temperatura e pressão, torna a hidrogenação catalítica um processo de custo relativamente elevado, encarecendo portanto o produto no mercado [10].

Tomando-se em vista todos estes problemas, vários estudos estão sendo realizados a fim de se encontrar rotas alternativas que possam viabilizar a produção de xilitol em larga escala. Um processo que vem ganhando grande importância ultimamente é a via biotecnológica, na qual a conversão da xilose presente em grande quantidade em materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, em xilitol depende da ação de microrganismos. As leveduras, em especial a *Candida guilliermondii*, são

consideradas boas produtoras de xilitol uma vez que possuem as principais enzimas responsáveis pela conversão de xilose em xilitol, que são a xilose redutase e xilitol desidrogenase [11]. A Figura 2 apresenta um esquema comparativo entre a via química e a via biotecnológica de obtenção do xilitol.

A via biotecnológica de obtenção do xilitol é influenciada por vários fatores, tais como obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico, temperatura, pH, concentração de nutrientes no meio de fermentação, presença de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, atividade das enzimas envolvidas na bioconversão de xilose em xilitol. Muitos dos parâmetros necessários ao desenvolvimento deste bioprocessos já estão estabelecidos, mas ainda são necessários estudos para melhor entendimento das vias metabólicas envolvidas nesta bioconversão; principalmente em relação à formação de sub-produtos deste metabolismo, como o glicerol.

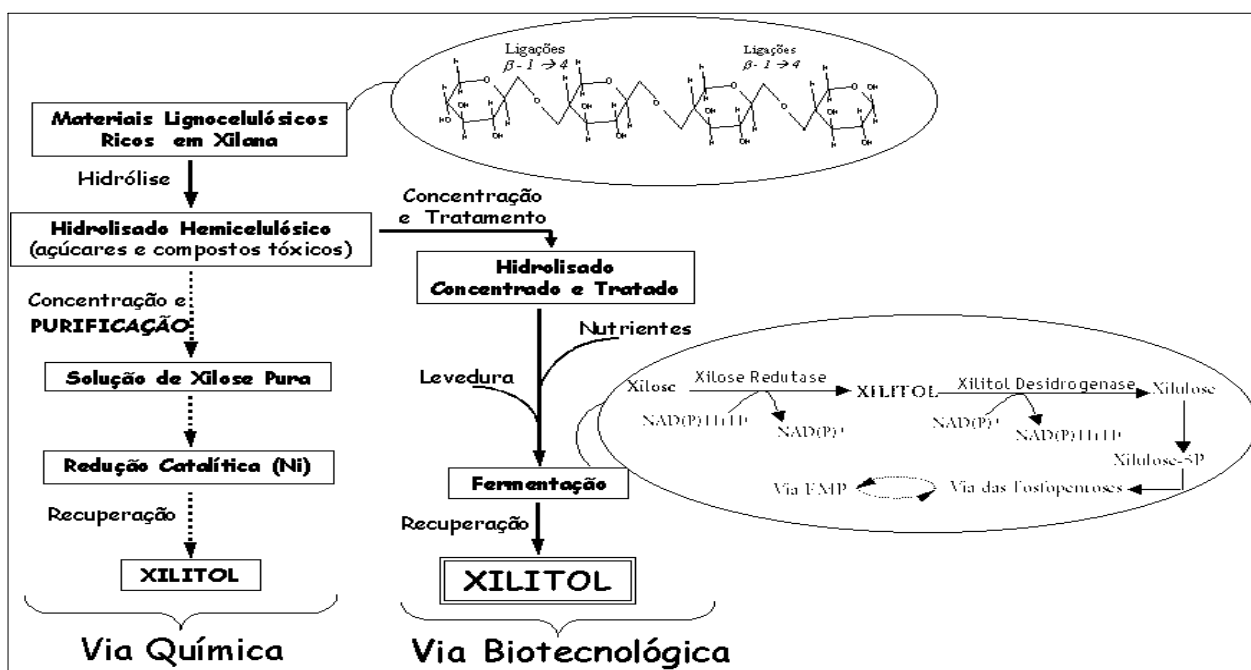


Figura 2: Esquema comparativo da obtenção de xilitol por via química e biotecnológica [12]

O glicerol é biossintetizado pela redução de dihidroxicetona fosfato a glicerol 3-fosfato, catalizado por 3-fosfato dihidrogenase (NAD^+), seguida pela desfosforilação do glicerol 3-fosfato a glicerol [13].

De acordo com Nevoigt e Stahl [14], o metabolismo de açúcares em leveduras pode facilmente levar à produção de etanol ou glicerol, dependendo das condições de cultivo. Os autores destacam a formação destes solutos compatíveis como um mecanismo no qual o microrganismo

evita a perda de água para o meio extracelular, enquanto que, no meio intracelular, o glicerol pode manter o equilíbrio redox do citosol, principalmente na ausência de oxigênio.

A formação de glicerol como subproduto da bioconversão de xilose em xilitol foi observada durante o cultivo de *Candida tropicalis* em meio sintético [15] e de *C. guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana [16,17] e hidrolisado de casca de aveia [18].

Segundo Rodrigues [17], a formação de glicerol neste bioprocesso está associada ao pH, sendo favorecida em pH = 7,5. Além disto, durante o cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana, foram observados a formação e posterior consumo do glicerol pela levedura, indicando sua utilização como fonte de carbono, principalmente quando a xilose já havia sido quase totalmente assimilada [19].

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência do glicerol sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*.

Materiais e Métodos

Microorganismo e Preparo do Inóculo

Os experimentos serão realizados com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 obtida de uma cultura estoque mantida a 4°C em agar extrato de malte. As células cultivadas em agar extrato de malte inclinado serão transferidas para o meio de cultivo do inóculo contendo xilose (50g/L), (NH₄)₂SO₄ (2g/L), CaCl₂·2H₂O (0,1g/L) e extrato de farelo de arroz (20g/L). O cultivo será realizado em frascos Erlenmeyer (125mL) contendo 50mL do meio, incubados a 200rpm, 30°C por 24h. A concentração inicial de inóculo nas fermentações será de 1,0g/L de células.

Condições de fermentação

As fermentações serão realizadas em frascos Erlenmeyer (125mL) contendo 50ml de meio composto por: xilose (50g/L), glicerol (variando de 0 a 3g/L), (NH₄)₂SO₄ (2g/L), CaCl₂·2H₂O (0,1g/L) e extrato de farelo de arroz (20g/L). Será também realizado um experimento controle em meio contendo glicerol (20g/L), (NH₄)₂SO₄ (2g/L), CaCl₂·2H₂O (0,1g/L) e extrato de farelo de arroz (20g/L). Todos os experimentos serão realizados com pH inicial de 5,5, a 200rpm, 30°C.

Métodos Analíticos

As concentrações de xilose, xilitol e glicerol serão determinadas por cromatografia líquida. O crescimento celular será acompanhado por medida de absorvância a 600nm e a concentração celular será calculada por uma curva padrão que correlacionada a absorvância à 600nm e peso seco das células.

Perspectivas

A partir dos resultados obtidos neste trabalho espera-se contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de xilitol por via biotecnológica através do melhor entendimento da via metabólica de conversão de xilose em xilitol e da formação de subprodutos deste metabolismo,

como o glicerol, bem como a sua interferência neste bioprocesso.

Referências Bibliográficas

- [1] Makinen, K. K. (2000). Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observatin made with xylitol, *Medical Hypothese s*, v. 54, n. 4, p. 603-613.
- [2] Lima, L. H. A., Berlinck, C. N. (2003). Xilitol, o adoçante do futuro. *Revista Ciência Hoje*, v. 33, n. 195, p. 66-69.
- [3] Bar, A. (1991). Xylitol. In: O'Brien Nabors, L., Gelardi, R. *Alternative Sweeteners*. New York:Marcel Dekker, p. 185-216.
- [4] Manz, U., Vanninen, E., Voirol, F. (1973). Xylitol - its properties and use as a sugar substitute in foods. In: Food Symposium on Sugar And Sugar Replacements, London, 10 October.
- [5] Alanen, P. Isokangas, P.; Gutmann, K. (2000). Xylitol Candies in Caries Prevention: Results of a Field Sutdy in Estonian Children. *Dental Oral Epidemiology*, v. 28, p. 218-224.
- [6] Makinen, K. K., Isotupa, K. P., Kivilompolo, T., MakineN, P. L., Toiveanen, J., Soderling, E. (2001). Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and *Mutans streptococci*. *Caries Research*, v. 35, n. 2, p.129-135.
- [7] Uhari, M., Tapiainen, T. Kontiokari, T. (2000). Xylitol in preventing acute otitis media. *Vaccine*, v. 8, n.19, p.144-147.
- [8] Matilla, P.T., Knuutila, M. L. E., Svanberg, M. J. (1998). Dietary Xylitol Supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism*, v. 47, p. 578-583.
- [9] Melaja, J., Hämäläinen, L. (1977). Process for Making Xylitol. US n.4.008.285. 15 fev.
- [10] Winkelhausen, E., Kyzmanova, S. (1998). Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol. *Journal of Fermentation and Biotechnology*, v. 86, n.1, p.1-14.
- [11] Silva, S.S., Vitolo, M., Pessoa Jr., A., Felipe, M. G. A. (1996). Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-Xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 187-191.
- [12] Silva, D. D. V., Felipe, M. G. A., Faria, F. P., Mancilha, I. M. (2004) Biotechnological production

of xylitol from lignocelulosic materials. *Bioforum Europe*, n.3 (In Press).

[13] Flores, C. L., Rodríguez, C., Petit, T., Gancedo, (2000). C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology. Reviews*, v. 24, p. 507-529.

[14] Nevoigt, E., Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 21, p. 231-241.

[15] Yahashi, Y., Horitsu, H., Kawai, K., Suzuki, T., Takamizawa, K. (1996). Production of xylitol from D-Xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 81, n. 2, p. 148-152.

[16] Matos, G. S., Felipe, M. G. A., Silva, S. S. (2003). Formação de xilitol, etanol e glicerol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Anais do XIV SINAIFERM 2003. 1 CD-Rom.

[17] Rodrigues, R. C. L. B., Felipe, M. G. A., Roberto, I. C., Vitolo, M. (2003). Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate at controlled pH values. *Bioprocess and Biosyst Engineering*, v. 26, p. 103-107.

[18] Felipe, M. G. A., Haully, M. C. O., Canettieri, E. V., Cândido, E. J., Tamanini, C. (2003). Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003. Anais do XIV SINAIFERM 2003. 1 CD-Rom.

[19] Silva, D. D. V., Felipe, M. G. A., Morales, M. L. V., RODRIGUES, R. C. L. B. (2004). Favorecimento de la producción de xilitol a partir de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña em presencia de glucosa durante el cultivo de inoculo de *Candida guilliermondii*. In: *VIII Congreso Internacional Sobre Azúcar Y Derivados de La Caña 2004*, Memorias Diversificación 2004. 1 CD-Rom.