

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE XILOSE NA PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE MALTE

Solange Inês Mussatto¹, Ane Cristina Silva Vaz², Inês Conceição Roberto³

¹Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia. Rodovia Itajubá-Lorena Km 74,5, 12600-970, Lorena-SP. E-mail: solange@debiq.faenquil.br

² Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia. Rodovia Itajubá-Lorena Km 74,5, 12600-970, Lorena-SP. E-mail: aninhavaz28@hotmail.com

³ Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia. Rodovia Itajubá-Lorena Km 74,5, 12600-970, Lorena-SP. E-mail: ines@debiq.faenquil.br

Palavras-chave: bagaço de malte, hidrolisado hemicelulósico, xilose, fermentação, xilitol.

Área do Conhecimento: V – Ciências Agrárias

Resumo- Bagaço de malte (principal subproduto da indústria cervejeira) foi submetido a um processo de hidrólise com ácido sulfúrico diluído visando produzir um hidrolisado contendo xilose como açúcar principal. O hidrolisado obtido (contendo 20 g/l de xilose) foi concentrado de forma a aumentar o teor desta pentose em 2,5 e 4 vezes. Os hidrolisados com diferentes concentrações de xilose foram empregados como meio de fermentação pela levedura *Candida guilliermondii*, para produção de xilitol. Os resultados revelaram que o hidrolisado de bagaço de malte apresenta grande potencial para produção biotecnológica de xilitol, uma vez que elevados fatores de conversão de substrato em produto (0,61; 0,70 e 0,86 g/g) foram obtidos nos processos fermentativos. A produção de xilitol foi influenciada pela concentração inicial de xilose no meio, e os melhores resultados do processo fermentativo ($Y_{P/S} = 0,86$ g/g e $Q_P = 0,56$ g/l.h) foram obtidos empregando uma concentração inicial desta pentose de 50 g/l.

Introdução

O bagaço de malte é considerado como o mais importante subproduto da indústria cervejeira, pois representa cerca de 85% dos subprodutos obtidos neste processo [1]. Somente no Brasil (que representa o 4º maior mercado produtor de cervejas do mundo) [2], estima-se que a geração anual média de bagaço de malte é de 1,7 milhões de toneladas. Apesar de ser produzido em grandes quantidades durante todo o ano, este material tem sido muito pouco aproveitado, sendo sua principal aplicação como ração para animais. No entanto, devido ao bagaço de malte ser um material rico em proteínas e fibras [3], o desenvolvimento de novas técnicas para aproveitamento deste subproduto agro-industrial é de grande interesse.

A utilização do bagaço de malte em processos de bioconversão tem sido muito pouco explorada até agora. Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de se produzir várias misturas de oligossacarídeos com diferentes pesos moleculares, a partir deste material, em função da temperatura e do tempo de reação empregados no processo de hidrólise [4]. Carvalho e colaboradores [5] hidrolisaram o bagaço de malte com ácido diluído e verificaram que o hidrolisado produzido, rico em açúcares, proporcionou

elevados rendimentos em biomassa quando fermentado pela levedura *Debaryomyces hansenii*.

No presente trabalho, o bagaço de malte foi submetido a um processo de hidrólise com ácido diluído e o hidrolisado hemicelulósico obtido foi empregado como meio de fermentação para produção de xilitol, um edulcorante alimentar de importantes propriedades clínicas e que pode inclusive ser consumido por pessoas diabéticas [6]. Os ensaios fermentativos foram realizados empregando diferentes concentrações iniciais de xilose, uma vez que vários trabalhos têm evidenciado que a eficiência de conversão de xilose em xilitol é diretamente proporcional à concentração inicial deste açúcar no meio [7-9].

Material e Métodos

O bagaço de malte utilizado foi fornecido pela Microcervejaria da Faenquil. Primeiramente o bagaço foi lavado com água para remoção dos resíduos do processo cervejeiro, sendo em seguida secado em estufa elétrica a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ até apresentar um teor de umidade de aproximadamente 10%.

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido por catálise ácida em um reator de aço-inox de 50 litros, munido de aquecimento por resistência elétrica. As reações foram realizadas com H_2SO_4

(98% p/p) na concentração de 100 mg/g de matéria seca, a 121°C por 17 minutos, mantendo uma relação sólido:líquido de 1:8 (g:g). Ao final das hidrólises o material foi centrifugado, e a fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) foi conservada a 4°C. A concentração de xilose no hidrolisado obtido foi de 20 g/l.

Com o objetivo de aumentar a concentração de xilose a valores 2,5 e 4 vezes maiores que o inicial, o hidrolisado foi concentrado sob vácuo em evaporador com capacidade de 4 litros, a uma temperatura de aproximadamente $70 \pm 5^\circ\text{C}$. Posteriormente, para serem empregados como meio de fermentação, os hidrolisados (diluído e concentrados) tiveram o pH ajustado para 6,5 pela adição de NaOH (pastilhas), sendo o precipitado removido por centrifugação a 1100xg por 15 minutos.

Para preparo do inóculo foi utilizada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037. A cultura foi mantida repicada em tubos de ensaio contendo ágar malte inclinado e conservada em geladeira a 4°C.

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada de células, proveniente do repique em meio de manutenção, para tubos de ensaio contendo água destilada estéril. Aliquotas de 2 ml desta suspensão celular foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml do meio a base de (g/l): xilose (20,0); sulfato de amônio (3,0), cloreto de cálcio dihidratado (0,10) e extrato de farelo de arroz (20% v/v). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 30°C por 24 horas. Após este tempo as células foram separadas por centrifugação a 1100xg por 20 minutos, e ressuspensas diretamente nos hidrolisados (diluído e concentrados) previamente preparados. As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 ml empregando 100 ml de meio de fermentação (hidrolisados em pH 6,5), inoculado com uma concentração celular inicial de 1 g/l.

O acompanhamento das fermentações foi realizado retirando-se amostras para determinação da concentração celular, glicose, xilose e xilitol. O crescimento foi acompanhado por medida das absorbâncias a 600 nm em espectrofotômetro, sendo a concentração celular determinada utilizando-se uma equação obtida da regressão linear dos dados de uma curva de calibração entre peso seco e absorbância.

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e derivados da lignina foram determinadas conforme descrito previamente [10, 11].

Durante o processo de hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, vários compostos que são tóxicos aos microorganismos são também formados além dos açúcares, e estes incluem o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e compostos derivados da lignina. A Tabela 1 apresenta a composição dos hidrolisados de bagaço de malte utilizados neste trabalho. Observa-se nesta tabela que durante a etapa de concentração, os açúcares glicose, xilose e arabinose tiveram seus teores aumentados proporcionalmente ao fator de concentração empregado. Dentre os compostos tóxicos ao microrganismo somente os derivados da lignina foram concentrados proporcionalmente ao fator de concentração utilizado.

Tabela 1- Concentração de açúcares e compostos tóxicos nos hidrolisados de bagaço de malte, diluído e concentrado.

Componente	Concentração no hidrolisado (g/l)		
	Diluído	Concent. 2,5x	Concent. 4x
Glicose	0,86	2,05	3,51
Xilose	19,63	48,00	79,70
Arabinose	9,23	21,20	35,32
Ácido acético	1,50	1,24	n.d.
Furfural	0,66	n.d.	n.d.
HMF	0,10	0,11	0,12
Derivados da lignina	3,49	8,27	13,95

HMF = hidroximetilfurfural
n.d. = não detectado

Os resultados do processo fermentativo de produção de xilitol empregando os hidrolisados de bagaço de malte com diferentes concentrações iniciais de xilose, estão apresentados na Tabela 2. Observa-se nesta tabela que os valores de $Y_{P/S}$ (fator de conversão de xilose em xilitol), Q_P (produtividade volumétrica em xilitol) e $Y_{P/X}$ (fator de rendimento de produto por célula) variaram significativamente para cada condição empregada, enquanto que os valores de $Y_{X/S}$ (fator de conversão de substrato em células) praticamente se mantiveram constantes. Isto significa que o aumento na concentração inicial de xilose no hidrolisado influenciou na formação de produto mas praticamente não interferiu no crescimento celular.

Observa-se ainda na Tabela 2 que o aumento

Resultados

na concentração inicial de xilose de 20 para 50 g/l favoreceu a produção de xilitol, refletindo em um aumento de 24% nos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P , e 30% em $Y_{P/X}$. Por outro lado, o aumento na concentração desta pentose para 80 g/l influenciou negativamente no processo de bioconversão, ocasionando uma redução nos valores de todos os parâmetros fermentativos avaliados.

Tabela 2- Parâmetros fermentativos da produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de malte com diferentes concentrações iniciais de xilose.

Concentração de xilose (g/l)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/l.h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)
20	0,70	0,45	0,18	2,79
50	0,86	0,56	0,20	3,67
80	0,61	0,39	0,17	3,22

Discussão

O efeito da concentração inicial de xilose na produção de xilitol tem sido avaliado por vários autores, tanto em meios quimicamente definidos como em meios a base de hidrolisados. De acordo com Parajó e colaboradores [9], o aumento na concentração inicial de xilose em meios quimicamente definidos favorece a produção de xilitol. Em meios a base de hidrolisados, a produção de xilitol é normalmente favorecida até um determinado nível de concentração inicial de xilose, o qual pode variar para hidrolisados obtidos a partir de diferentes matérias-primas. No presente trabalho, o aumento na concentração desta pentose de 20 para 50 g/l favoreceu a produção de xilitol, porém, o processo fermentativo foi prejudicado para uma concentração inicial desta pentose de 80 g/l. Resultados similares foram observados por Felipe e colaboradores [12] durante a produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Segundo estes autores, o aumento na concentração inicial de xilose de 37,6 para 54,5 g/l, aumentou a concentração celular em 40%, o rendimento em xilitol em 20%, e a produtividade em xilitol em 44%. Porém, valores superiores de concentração inicial de xilose, provocaram uma redução tanto na concentração celular como na produtividade em xilitol.

A diminuição nos valores dos parâmetros fermentativos com o aumento da concentração inicial de xilose de 50 para 80 g/l, pode estar relacionada com a concentração de compostos tóxicos existentes nos hidrolisados, uma vez que durante o processo de concentração, compostos tóxicos não voláteis têm sua concentração

aumentada e podem interferir mais potencialmente no processo fermentativo.

Pode-se observar na Tabela 1 que o furfural é um composto volátil nas condições empregadas durante a concentração, não estando presente portanto nos hidrolisados concentrados. O ácido acético teve sua concentração reduzida no hidrolisado concentrado 2,5 vezes, e não estava presente no hidrolisado concentrado 4 vezes. O hidroximetilfurfural, no entanto, não foi concentrado durante este processo. Por outro lado, os compostos derivados da lignina foram concentrados na mesma proporção que os açúcares e provavelmente influenciaram negativamente, principalmente no processo fermentativo conduzido com 80 g/l de xilose, o qual apresentou uma queda acentuada em todos os parâmetros fermentativos. Vale a pena ressaltar que vários autores sugerem que os compostos derivados da lignina são mais tóxicos que ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, mesmo quando presentes em baixas concentrações (< 1 g/l) [13, 14].

De acordo com Silva e Roberto [7], o aumento na concentração de inibidores durante o processo de concentração do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (de 60 para 120 g/l de xilose), foi provavelmente o principal fator que provocou o decréscimo no rendimento da produção de xilitol.

Conclusões

Os resultados deste trabalho permitem concluir que o hidrolisado de bagaço de malte apresenta grande potencial para uso como meio de fermentação para produção biotecnológica de xilitol, uma vez que elevados fatores de conversão de substrato em produto (de 0,61 a 0,86 g/g) foram obtidos nos processos fermentativos. A concentração inicial de xilose no meio influenciou a produção de xilitol, podendo tal efeito estar relacionado com a concentração de compostos tóxicos presentes no hidrolisado. Os melhores resultados do processo fermentativo ($Y_{P/S} = 0,86$ g/g e $Q_P = 0,56$ g/l.h) foram obtidos empregando uma concentração inicial de xilose de 50 g/l.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Capes e Fapesp, pelo apoio financeiro concedido para execução deste trabalho.

Referências

- [1] REINOLD, M.R. Manual Prático de Cervejaria, 1^a ed., Aden Editora e Comunicações Ltda, São Paulo, 214p, 1997.

- [2] BERTO, D. Panorama do Mercado de Bebidas. Cerveja, a Bebida Alcoólica mais Consumida no País. **Food Ingredients**, v.23, p.36-39, 2003.
- [3] HERNÁNDEZ, A.M.; RODRÍGUEZ, J.L.; LÓPEZ, B.; ZERQUERA, O.L. Caracterización Química y Funcional del Afrecho de Malta. **Alimentaria**, mayo, p.105-107, 1999.
- [4] CARVALHEIRO, F.; ESTEVES, M.P.; PARAJÓ, J.C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F.M. Production of Oligosaccharides by Autohydrolysis of Brewery's Spent Grain. **Bioresource Technol.** v.91, p.93-100, 2004.
- [5] CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MEDEIROS, R.; GÍRIO, F.M. Optimization of Brewery's Spent Grain Dilute-Acid Hydrolysis for the Production of Pentose-Rich Culture Media. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.115, p.1059-1072, 2004.
- [6] MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Xylitol: A Sweetener with Benefits for Human Health. **Braz. J. Pharm. Sci.** v.38, p.401-413, 2002.
- [7] SILVA, C.J.S.M.; ROBERTO, I.C. Statistical Screening Method for Selection of Important Variables on Xylitol Biosynthesis from Rice Straw Hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Biotechnol. Tech.** v.13, p.743-747, 1999.
- [8] WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol. **J. Ferment. Bioeng.** v.86, p.1-14, 1998.
- [9] PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological Production of Xylitol, Part 3: Operation in Culture Media Made from Lignocellulose Hydrolysates. **Bioresource Technol.** v.66, p.25-40, 1998.
- [10] MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Optimal Experimental Condition for Hemicellulosic Hydrolyzate Treatment with Activated Charcoal for Xylitol Production. **Biotechnol. Progr.** v.20, p.134-139, 2004.
- [11] ROCHA, G.J.M. Deslignificação de Bagaço de Cana-de-Açúcar Assistida por Oxigênio. 2000. 136p. Tese de Doutorado – Instituto de Química de São Carlos, USP, 2000.
- [12] FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Environmental Parameters Affecting Xylitol Production From Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **J. Ind. Microb. Biotechnol.** v.18, p.251-254, 1997.
- [13] CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, J.M. Xylitol Production From Hardwood Hemicellulose Hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* e *Candida guilliermondii*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.82, p.141-151, 1999.
- [14] LEE, W.G.; LEE, J.S.; SHIN, C.S.; PARK, S.C.; CHANG, H.N.; CHANG, Y.K. Ethanol Production Using Concentrated Oak Wood Hydrolysates and Methods to Detoxify. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.77-79, p.547-559, 1999.