

# EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL NA BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL EM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA POR *Candida guilliermondii*.

**Priscila Vaz de Arruda<sup>1</sup>, Rita de Cássia L. B. Rodrigues<sup>2</sup> e Maria das Graças de Almeida Felipe<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Mestranda/CAPEs, DEBIQ, FAENQUIL. Rod. Itajubá-Lorena Km 74,5 C P 116, CEP 12600-970, Lorena-SP. e-mail: [priscilavaz\\_eb@yahoo.com.br](mailto:priscilavaz_eb@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Colaboradora, DEBIQ, FAENQUIL. Rod. Itajubá-Lorena Km 74,5 C P 116, CEP 12600-970, Lorena-SP. e-mail: [rita@debiq.fauenquil.br](mailto:rita@debiq.fauenquil.br)

<sup>3</sup> Professora orientadora, DEBIQ, FAENQUIL. Rodovia Itajubá-Lorena Km 74,5 C P 116, CEP 12600-970, Lorena-SP. e-mail: [mgafelipe@debiq.fauenquil.br](mailto:mgafelipe@debiq.fauenquil.br)

**Resumo-** Pesquisas realizadas com hidrolisados hemicelulósicos obtidos de diferentes resíduos agroindustriais para a produção de xilitol, um açúcar-álcool com características peculiares como baixo valor calórico, anticariogenicidade e metabolismo independente de insulina, tem demonstrado que durante este bioprocessos o glicerol tem sido formado como subproduto do metabolismo de xilose. Leveduras capazes de converter xilose em xilitol requerem como passos iniciais a participação da enzima xilose redutase dependente de NADPH e em seguida o xilitol é convertido em xilulose pela xilitol desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup>. A influência do glicerol será avaliada a partir de fermentações com *Candida guilliermondii* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana contendo diferentes concentrações de glicerol. As concentrações de açúcares, xilitol, glicerol e subprodutos serão determinadas por cromatografia líquida e o crescimento celular será acompanhado por turbidimetria. Serão também determinadas as concentrações dos compostos tóxicos à levedura presentes no hidrolisado (ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis).

**Palavras-chave:** Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, glicerol, xilose, xilitol, *Candida guilliermondii*

**Área do Conhecimento:** II Ciências Biológicas

## Introdução

O bagaço de cana-de-açúcar é o mais abundante subproduto da agroindústria brasileira, merecendo destaque em função do aproveitamento alternativo de seu excedente, uma vez que este já é utilizado na co-geração de energia das usinas de açúcar-álcool, bem como matéria-prima para as indústrias de papel e papelão [1].

O elevado teor de D-xilose na fração hemicelulósica do bagaço (82% do total de açúcar nesta fração), é um dos principais fatores que impulsionam o seu aproveitamento em diferentes processos de bioconversão, como a obtenção biotecnológica de xilitol [2].

O xilitol, comercialmente obtido por via química a partir de hidrolisados hemicelulósicos, é um adoçante substituto de açúcar na dieta de diabéticos [3] e obesos [4], com várias outras aplicações terapêuticas [5, 6, 7, 8].

É importante destacar que o elevado custo de sua produção química [9], impulsiona pesquisas para a produção biotecnológica e que fatores como pH [10, 11, 12], repressão catabólica exercida pela D-glicose [13], idade e concentração do inóculo [14, 15], concentração inicial de xilose [16, 17] e temperatura [12] influenciam este bioprocessos. Porém, quando da utilização de hidrolisados hemicelulósicos é importante

considerar ainda a presença nestes de compostos tóxicos aos microrganismos, os quais inibem o metabolismo microbiano em função da concentração que se encontram no meio [15, 18, 19, 20]. Estes fatores podem direcionar o metabolismo para obtenção de xilitol bem como do subproduto glicerol ou formação de biomassa [21].

A formação de glicerol por microrganismos tem sido constatada por vários pesquisadores conforme observado em experimentos com a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 durante fermentações de hidrolisados de bagaço de cana [19, 22, 23] e casca de aveia [24], bem como em meio sintético no caso das leveduras *Candida boidini*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* [25] e *Candida tropicalis* [26].

É conhecido que o glicerol tem um papel fundamental em vários processos fisiológicos vitais em procarióticos e eucarióticos, sendo um importante intermediário do metabolismo energético. O glicerol é um soluto compatível, formado em condições de estresse celular e também como uma estratégia para a regeneração de NAD<sup>+</sup> [27]. No caso da bioconversão de xilose em xilitol a regeneração do NAD<sup>+</sup> a partir da formação de glicerol, além de desviar a utilização da fonte de carbono (xilose) para a formação deste subproduto proporcionaria também uma menor disponibilidade do NADH, coenzima essencial para a enzima xilose redutase (E.C.

1.1.1.21), a qual participa do passo inicial deste bioprocesso [21].

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* durante fermentações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana contendo diferentes concentrações de glicerol.

## **Materiais e Métodos**

### **Microrganismo 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 ágar extrato de malte. O inóculo (1g/L) será obtido a partir do cultivo das células em meio contendo xilose (50g/L), sulfato de amônio (2g/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,1g/L) e extrato de farelo de arroz (20g/L) e pH 5,5. Serão empregados frascos Erlenmeyer (125mL) contendo 50mL do meio a 30°C, sob agitação de 200rpm em incubadora tipo "Shaker" rotatório (New Brunswick, Scientific Co.) por 24 horas.

### **Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico**

O bagaço de cana de açúcar será hidrolisado em reator de 350L a 121°C, por 20 minutos, empregando 100mg de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por grama de matéria seca (relação sólido-líquido de 1:10). O hidrolisado será filtrado e concentrado a vácuo a 70°C (até obter a concentração inicial de xilose de 60 g/L). Posteriormente o hidrolisado será submetido ao processo de tratamento para a remoção de compostos tóxicos, que consistirá em adicionar ao hidrolisado óxido de cálcio (CaO) até pH 7,0, seguido da redução do pH para 2,5 com ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Após esta etapa, 1,0% de carvão ativo será adicionado ao hidrolisado sob agitação (200rpm, 60°C, 30min.). A cada etapa de alteração de pH e adição de carvão o hidrolisado será filtrado em papel de filtro Whatmann para remoção do precipitado que se formará. O hidrolisado será autoclavado a 111°C por 15min e caracterizado quanto ao pH, à concentração dos açúcares xilose, glicose e arabinose e à concentração dos compostos tóxicos furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e fenóis.

### **Condições de fermentação**

Ao hidrolisado tratado será adicionado sulfato de amônio (2g/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,1g/L), extrato de farelo de arroz (20g/L) e glicerol nas concentrações finais (g/L) de: 0,1; 0,5; 1,0; 3,0 e 6,0. Experimentos controle serão realizados, sem a adição de glicerol.

As fermentações serão realizadas em frascos Erlenmeyer (125mL), em triplicata, por 60 horas nas mesmas condições empregadas no preparo do inóculo.

### **Métodos Analíticos**

Amostras serão retiradas nos tempos: 0, 12, 24, 48 e 60 horas para avaliação das concentrações de açúcares, xilitol, glicerol por cromatografia líquida e para determinação do crescimento celular por turbidimetria. Nos tempos inicial e final serão também determinadas as concentrações dos compostos tóxicos à levedura (ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis), presentes no hidrolisado.

## **Perspectivas**

Uma vez que não há relatos na literatura quanto ao efeito do glicerol sobre a bioconversão de xilose em xilitol e ainda considerando a importância do glicerol em múltiplos processos fisiológicos vitais, espera-se a elucidação do mecanismo envolvendo a formação de glicerol durante este bioprocessos, uma vez que microrganismos são capazes de acumulá-lo no meio de fermentação e ao mesmo tempo utilizá-lo como fonte de carbono. Considerando também que este é um soluto compatível, espera-se que com a sua adição ao meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana propicie a melhoria deste bioprocessos e junto com os resultados já obtidos até o momento, o presente trabalho possa contribuir para o desenvolvimento desta tecnologia alternativa de forma a que este processo possa ser competitivo ao químico.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro a este trabalho.

## **Referências**

- [1] LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose to Produce Xulose, Arabinose, Glucose and others products. **Biomass and Bioenergy**, V.23, p.367-380,2002.
- [2] DU TOIT, P.J.; OLIVIER, S.P.; VAN BILJON, P.L. Sugar Cane Bagasse as a Possible Source of Fermentable Carbohydrates. I. Characterization of Bagasse with Regard to Monosaccharide, Hemicellulose and Amino Acid Composition. **Biotechnol. Bioeng.**, V.26, p.1071-1078, 1984.
- [3] PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in Sugar - Free Confections. **Food Technology**, V.42, n.10, 1988.
- [4] MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol - Its Properties and Use as a Sugar Substitute in Foods. **Food R.A. Symp. Sugar And Sugar Replacements**, 1973.

- [5] ASSEV, S.; WALER, S.M.; RÖLLA, G. Further studies on the growth inhibition of some oral bacteria by xylitol. **Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica**. Section B, Kobenhavn, V.91, p.261-265, 1983.
- [6] MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.L.E.; SVANBERG, M.J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin – diabetic rats. **Metabolism**, V.47, p.578-583, 1998.
- [7] ZABNER, J.; MICHAEL, P.S.; LAUNSPACH, J.L.; KARP, P.H.; KEARNEY, W.R. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **PNAS**, V.97, n.21, p.11614-11619, 2000.
- [8] TAPIAINEN, T.; LUOTONEN, L.; KONTIOKARI, T.; RENKO, M.; UHARI, M. Xylitol Administered Only During Respiratory Infections Failed to Prevent Acute Otitis Media. **Pediatrics**, V.109, n.2, p.19, 2002.
- [9] WINKELHAUSEN, E.; KYZMANOVA, S. Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol. **Journal of Fermentation and Biotechnology**, V.86, n.1, p.1-14, 1998.
- [10] LAWFORD, H.D.; ROUSSEAU, J.D. Effects of pH Acetic Acid on Glucose and Xylose Metabolism by a Genetically Engineered Ethanogen *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V.39/40, p.301-322, 1993.
- [11] FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Fermentation of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate for Xylitol Production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, V. 13, p.11-14, 1997.
- [12] SENE, L.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Effect of Environmental Conditions on Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V. 84-86, p. 371-380, 2000.
- [13] LEE, H.; SOPHER, C.R.; YAU, K.Y.F. Induction of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities on Mixed Sugars in *Candida guilliermondii*. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, V.66, p.375-379, 1996.
- [14] PFEIFER, M.J.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of Culture Conditions on Xylitol Production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Applied Biochemistry and Biotech**, V.57/58, p.423-430, 1996.
- [15] FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Environmental Parameters Affecting Xylitol Production from Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, V.18, p.251-254, 1997.
- [16] FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M. Xylitol Formation by *Candida guilliermondii* Grown in a Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate: Effect of Aeration and Inoculum Adaptation. **Acta Biotechnology**, V. 16, n.1, p.73-79, 1996.
- [17] ROSA, S. M. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S.; VITOLO, M. Xylose Reductase Production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V. 70-72, p. 127-135, 1998.
- [18] PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, V.74, p.17-24, 2000.
- [19] RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The Influence of pH, Temperature and Hydrolysate Concentration on the Removal of Volatile and Non-Volatile Compounds from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate Treated With Activated Charcoal Before or After Vacuum Evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, V. 18, n.3, p.299-311, 2001.
- [20] NILVEBRANT, N.; REIMANN, A.; LARSSON, L.J. Detoxification on lignocellulose hydrolysates with ion exchange resins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V.91-93, p.35-49, 2001.
- [21] FELIPE, M.G.A., Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. **Lignocellulose Biodegradation**, American Chemical Society, p.300-315, 2004.
- [22] MATOS, G.S.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Formação de xilitol, etanol e glicerol por *Cândida guilliermondii* FTI 20037 durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, 2003, Florianópolis. **Anais do XIV SINAFERM**, Florianópolis, 2003 (CDROM).
- [23] SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A.; MORALES, M.L.V.; RODRIGUES, R.C.L.B. Favorecimento de la producción de xilitol a partir de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña em presença de glucosa durante el cultivo de inóculo de *Candida guilliermondii*. In: VIII Congreso

Internacional Sobre Azúcar Y Derivados de La Caña 2004, **Memorias Diversificación**, 2004 (CDROM).

[24] FELIPE, M.G.A.; HAULY, M.C.O.; CANETTIERI, E.V; CÂNDIDO, E.J; TAMANINI, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. **Anais do XIV SINAFERM**, Florianópolis, 2003 (CDROM).

[25] VANDESKA, E.; AMARTEY, S.; KYZMANOVA, S.; JEFFRIES, T. Effects of Environmental Conditions on Production of Xylitol by *Candida boidinii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, V. 11, p. 213-218, 1995.

[26] YAHASHI, Y.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. 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, 1996.

[27] NEIVOGT, E.; STAHL, U. Osmorregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, V.21, p.231-241,1997.