

# INFLUÊNCIA DO GLICEROL NA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA POR *CANDIDA GUILLIERMONDII*

**Priscila Vaz de Arruda<sup>1</sup>, Rita de Cássia L. B. Rodrigues<sup>2</sup>, Herbert de Siqueira Batista de Souza<sup>3</sup>, Jussara Salet da Silva<sup>4</sup> e Maria das Graças de Almeida Felipe<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Mestranda/CAPES, DEBIQ, EEL/USP. 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>2-4</sup> Colaboradora, DEBIQ, EEL/USP. Rod. Itajubá-Lorena Km 74,5 C P 116, CEP 12600-970, Lorena-SP. e-mail: [rita@debiq.faenquil.br](mailto:rita@debiq.faenquil.br), [herbert\\_sbs@yahoo.com.br](mailto:herbert_sbs@yahoo.com.br), [jussara@debiq.faenquil.br](mailto:jussara@debiq.faenquil.br)

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

**Resumo** - Hidrolisados hemicelulósicos tem sido empregados em vários bioprocessos em função de seu alto teor de xilose na sua fração hemicelulósica e da capacidade de vários microrganismos metabolizarem a xilose. A levedura *Candida guilliermondii* tem sido empregada para a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, tendo sido constatado a formação do glicerol como um subproduto deste metabolismo em função das condições de cultivo. Neste trabalho avaliou-se o efeito da adição ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar de diferentes concentrações de glicerol (0,7; 1,0; 3,5 e 6,5 g/L) sobre a fermentação deste hidrolisado por *C. guilliermondii*, de forma a se avaliar o comportamento desta levedura em função da concentração deste subproduto no meio. As fermentações foram realizadas em shaker a 200 rpm com 50 mL de meio, pH inicial de 5,5, a 30°C, durante 72h. Experimento controle, sem adição de glicerol, também foi realizado. Nas condições experimentais avaliadas, o máximo crescimento celular (6,08 g/L) ocorreu com a adição ao hidrolisado de menor concentração de glicerol (0,7 g/L) enquanto, o aumento desta concentração para 1,0 g/L resultou em favorecimento do consumo de xilose (97,8%), semelhante ao observado na fermentação controle. Nas fermentações em que a concentração de glicerol foi igual ou superior a 3,5 g/L ocorreu o favorecimento da formação de etanol nas primeiras 24h, coincidente com a maior assimilação de ácido acético nesse mesmo tempo. Foi também constatado que a formação de glicerol pela levedura ocorreu em todas as fermentações independente da adição deste ao hidrolisado.

**Palavras-chave:** Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, glicerol, etanol, *Candida guilliermondii*, fermentação.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

## Introdução

A xilose, pentose presente em maior concentração na fração hemicelulósica de diferentes resíduos agroindustriais é considerada uma fonte de carbono para crescimento celular de algumas espécies microbianas como a levedura *Candida guilliermondii* [1, 2]. Os hidrolisados obtidos da hidrólise ácida destes materiais contém açúcares como glicose, xilose e arabinose [2]. Nas pesquisas para o aproveitamento destas biomassas, destaca-se a produção microbiológica de xilitol um poliálcool, comercialmente produzido por via química, com várias aplicações clínicas como no tratamento de diabéticos [3], obesos [4] e prevenção de osteoporose [5].

Dentre os microrganismos capazes de converter a xilose em xilitol, destaca-se a levedura *C. guilliermondii* [1, 2, 6] com produção além de xilitol, do glicerol e etanol como subprodutos deste bioprocessos [7,8].

O metabolismo da xilose inicia-se com o seu transporte através da membrana celular por

diferentes mecanismos [9]. Uma vez no interior das células, a xilose é reduzida em xilitol, em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.21) ligada a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não, em sua forma reduzida (NADPH/NADH). O xilitol é oxidado em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (E.C. 1.1.1.9) ligada a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não em sua forma oxidada (NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup>). A xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato que pode ser convertida em piruvato através da conexão da via das Fosfopentoses com a via Embden-Meyerhof-Parnas [10].

Em condições limitadas de oxigênio, a reoxidação de NADH fica restrita e, como a célula precisa manter o equilíbrio redox, o NADH é oxidado através da redução de piruvato ou acetil-CoA, produzindo assim mais etanol, glicerol ou ácido láctico [11,12]. 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, a qual participa do passo inicial deste bioprocessamento [2].

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da adição ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar de diferentes concentrações de glicerol, visando avaliar o comportamento da levedura *C. guilliermondii* neste hidrolisado buscando a compreensão da influência do glicerol na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço por esta levedura.

## Material e Métodos

### Microrganismo e Preparo do Inóculo

Os experimentos foram realizados com a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 obtida de uma cultura estoque mantida a 4°C em ágar extrato de malte. O inóculo (1 g/L) foi obtido a partir do cultivo das células em meio contendo xilose (30 g/L), sulfato de amônio (2 g/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,1g/L) e extrato de farelo de arroz (20 g/L). Foram empregados frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL do meio (pH 5,5) a 30°C, sob agitação de 200 rpm em incubadora tipo "Shaker" rotatório (New Brunswick, Scientific Co.) por 24 horas.

### Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico

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

### Meio e Condições de fermentação

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer (125 mL), em triplicata, por 72 horas. O meio, obtido a partir do hidrolisado tratado, foi suplementado com os mesmos nutrientes empregados no preparo do inóculo, com exceção da xilose. A avaliação do efeito do glicerol nesta

fermentação foi feita pela adição a este meio de diferentes concentrações de glicerol de forma que a sua concentração final fosse de 0,7; 1,0; 3,5 e 6,5 g/L. Experimento controle (sem a adição de glicerol) também foi realizado.

### Métodos Analíticos

As concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, etanol e glicerol foram determinadas em HPLC (Waters-USA), utilizando detector de índice de refração [7]. A concentração celular foi medida por turbidimetria a 600 nm.

### Análise Estatística

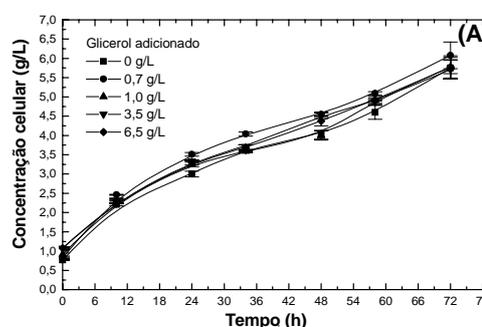
Os resultados foram plotados em gráficos com seus respectivos desvio padrão.

## Resultados

Os resultados obtidos da adição ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar de diferentes concentrações de glicerol sobre o crescimento celular, consumo de xilose e de ácido acético estão apresentados na Figuras 1A, 1B e 1C, respectivamente.

No geral, o crescimento celular foi favorecido pela adição de glicerol ao meio de cultivo (Figura 1A) em comparação à fermentação em que este não foi adicionado. A utilização de 0,7 g/L de glicerol resultou em máximo crescimento celular (6,08 g/L), enquanto o consumo de xilose foi favorecido quando a concentração deste foi 1g/L (Figura 1B). No entanto, o aumento da concentração de glicerol para 3,5 ou 6,5 g/L, resultou em diminuição no consumo de xilose em relação à fermentação na qual este não foi adicionado ao hidrolisado, semelhante ao ocorrido em concentração inferior a 1,0 g/L (Figura 1B).

Com relação ao ácido acético (Figura 1C), verifica-se a sua assimilação pela levedura independente das condições empregadas, porém o máximo consumo deste ácido ocorreu com a utilização de maior concentração de glicerol no meio.



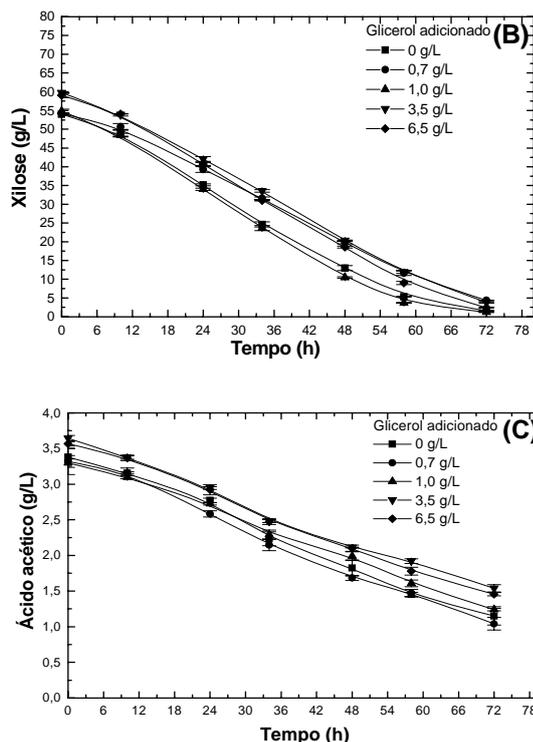


Figura 1 – Efeito da concentração de glicerol sobre o crescimento celular (A), consumo de xilose (B) e de ácido acético (C) durante cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

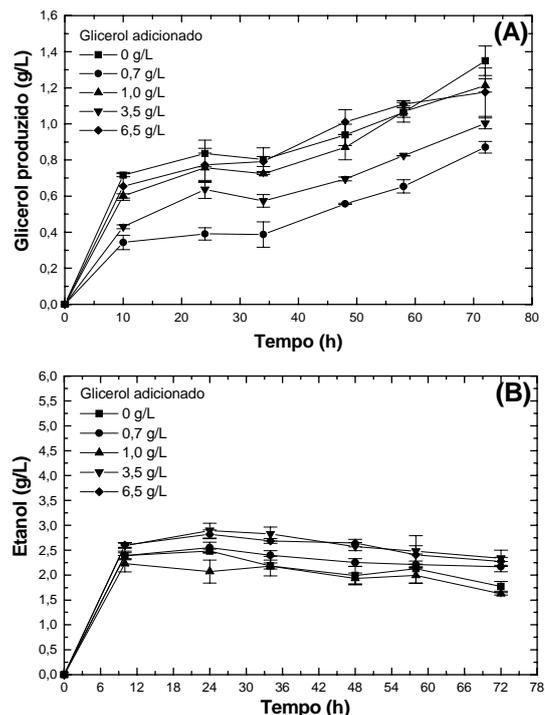


Figura 2 – Efeito da concentração de glicerol sobre a produção de glicerol (A) e etanol (B) durante o cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

## Discussão

As Figuras 2A e 2B representam a produção de glicerol e etanol pela levedura independente da adição de glicerol ao hidrolisado. Nota-se nestas Figuras que estes compostos foram formados já nas primeiras 10 h de cultivo, tempo correspondente ao consumo total da glicose (dado não apresentado).

A partir do cálculo da inclinação das retas obtidas na Figura 2A, verifica-se que a formação de glicerol pela levedura ocorrida no início da fermentação (10h) foi favorecida no meio em que este não foi adicionado (controle), observando-se ao final do processo a sua máxima produção (1,3 g/L).

Semelhante ao ocorrido para o glicerol, o etanol foi formado em todas as condições empregadas, observam-se um rápido aumento de sua concentração nas primeiras 10 h (Figura 2B). Após este período verificam-se pequenas variações na sua concentração para todas as condições avaliadas. Observa-se ainda na Figura 2B que a máxima concentração de etanol (2,9 g/L) obtida com a utilização das maiores concentrações de glicerol, correspondeu a um aumento de produção de 28,62% no mesmo período em relação à obtida quando se utilizou 1,0 g/L de glicerol, concentração esta que favoreceu o consumo de xilose (Figura 1B).

No presente trabalho o favorecimento da formação de biomassa de *C. guilliermondii* pela adição de glicerol ao hidrolisado verificado principalmente nas primeiras 24 h de cultivo pode estar relacionado ao seu efeito como protetor contra estresse celular conforme relatado na literatura [11,12], uma vez que o hidrolisado contém além de açúcares, compostos prejudiciais ao metabolismo como ácido acético, presente na concentração em torno de 3,5 g/L (Figura 1C), bem como fenóis, furfural e hidroximetilfurfural, cujas concentrações não se encontram apresentadas no presente trabalho [2].

O favorecimento do crescimento celular pela adição de 0,7 g/L de glicerol ao hidrolisado de certa forma contribuiu para diminuir o estresse celular, pois esta condição favoreceu também o consumo de ácido acético, proporcionando uma detoxificação do hidrolisado pela levedura. Esta hipótese pode ser justificada pelo fato de se ter observado uma redução de 17,5% no consumo de xilose na fermentação em que 0,7 g/L de glicerol foi adicionado ao hidrolisado em comparação à fermentação ausente de glicerol.

Trabalhos da literatura têm demonstrado a capacidade de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em função da capacidade desta levedura em assimilar o ácido acético dependendo das condições de fermentação [2, 13].

No presente trabalho a produção de glicerol pela levedura verificada independente das condições de cultivo, mostrou-se comportar conforme relatos da literatura nos quais ele é considerado como um soluto compatível produzido em condições adversas de cultivo [12], pois na fermentação sem adição de glicerol (controle), observou-se uma tendência de aumento de sua formação, o que pode estar relacionado ao seu papel osmoregulador. Porém, nos casos em que a adição de glicerol foi igual ou maior que 1,0 g/L também se observou a sua formação. Nestes casos, provavelmente, esta produção deve estar relacionada com a interferência do próprio glicerol na dissolubilidade de oxigênio no meio proporcionando um estresse celular em função da diminuição da concentração de oxigênio e como consequência a necessidade de regeneração dos cofatores oxidados. Este fato pode ser comprovado pela maior produção de etanol verificada nessas condições, uma vez que ao ser formado há regeneração do cofator [11].

Além disto, em todas as condições avaliadas o glicerol adicionado ao meio de cultivo não foi consumido pela levedura o que pode reforçar a idéia de que a presença do glicerol no meio de fermentação reduz o estresse celular.

Outro papel exercido pelo glicerol é a redução da quantidade de água na superfície das proteínas presentes na parede celular dos microrganismos, formando pontes de hidrogênio com estas proteínas, substituindo a água e mantendo a estabilidade celular [14].

## Conclusão

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar possui além dos açúcares, compostos tóxicos ao metabolismo celular, os quais podem ocasionar estresse celular. O glicerol adicionado ao meio de cultivo não foi consumido pelas células de *C. guilliermondii*, porém em todos os ensaios constatou-se a sua formação, que geralmente está associada a condições de estresse celular e regeneração dos cofatores oxidados. Na fermentação em que foi adicionado ao hidrolisado 1,0 g/L de glicerol observou-se o favorecimento do consumo de xilose em relação ao experimento em que este não foi adicionado, enquanto que concentrações maiores ou iguais a 3,5 g/L favoreceram a produção de etanol. O máximo crescimento celular (6,08 g/L) foi obtido com adição de 0,7 g/L de glicerol, indicando que esta concentração reduziu de certa forma o estresse celular ocasionado ao se cultivar a levedura *C. guilliermondii* em meio contendo ácido acético e outros compostos tóxicos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro a este trabalho e a CAPES pela bolsa de estudo concedida.

## Referências

- [1] RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA Jr, A.; PRATA, A. M. R. Crescimento de *Candida guilliermondii* durante cultivo descontínuo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: efeito do O<sub>2</sub>. **Anais do 14º SINAIFERM**, 2003. CDROM
- [2] FELIPE, M.G.A. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. **Lignocellulose Biodegradation**, American Chemical Society, p.300-315, 2004.
- [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] MATTILA, P. T., KNUUTTILA, M. L. E., SVANBERG, M. J. Dietary Xylitol Supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism Clinical and Experimental**, V. 47, p. 578-583, 1998.
- [6] SENE, L., CONVERTI, A., ZILLI, M., FELIPE, M. G. A. Metabolic Study of the Adaptation of the Yeast *Candida guilliermondii* to Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V. 57, p. 738-743, 2001.
- [7] MATOS, G. S., FELIPE, M. G. A., SILVA, S. S. Formação de xilitol, etanol e glicerol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Florianópolis. **Anais do 14º SINAIFERM**, Florianópolis, 2003. CDROM.
- [8] ARRUDA, P. V., SILVA, D. D. V., FELIPE, M. G. Avaliação do efeito da relação glicerol/xilose na fermentação de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*. **Anais do 15º SINAIFERM**, 2005. CDROM
- [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] HAHN-HÄGERDAL, B. *et al.* Biochemistry and Physiology of Xylose Fermentation by Yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, V.16, p.933-943, 1994.
- [11] JIN, H.; FANG, H.; ZHUGE, J. By-product formation by a novel glycerol-producing yeast, *Candida glycerinogenis*, with different O<sub>2</sub> supplies. **Biotechnology Letters**, V. 25, p.311-314, 2003.
- [12] NEIVOGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, V.21, p.231-241, 1997.
- [13] 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.
- [14] ABADIAS, M.; BENABARRE, A.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIÑAS, I. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Food Microbiology**. V.65, p. 173-182, 2001.