

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA PALHA DE CEVADA E UTILIZAÇÃO DO HIDROLISADO NA PRODUÇÃO DE XILITOL POR *Candida guilliermondii*

CÂNDIDO, E. J., CORRÊA, A. C., MACHADO, S. A., ALMEIDA e SILVA. J. B.

Escola de Engenharia de Lorena – Departamento de Biotecnologia - Caixa Postal 116,
CEP 12600-970, USP, Lorena, SP, Brasil - E-mail: ejcandido@debiq.eel.usp.br

Resumo: A produção da cevada para a indústria cervejeira gera uma grande quantidade de resíduos, como a palha de cevada, um resíduo lignocelulósico que quando submetido à hidrólise ácida gera um hidrolisado hemicelulósico, rico em substrato açucarado, que são importantes para o crescimento de microrganismos que geram como produtos substâncias de interesse econômico, como por exemplo, o xilitol. Xilitol é um poliálcool com o mesmo poder edulcorante e conteúdo calórico menor que o da sacarose. O metabolismo insulina-independente dessa molécula e suas propriedades anticariogênicas o tornam um ingrediente útil para alimentos funcionais. A bioprodução de xilitol utilizando a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 é uma alternativa atraente ao atual processo industrial de produção do poliálcool, que consiste na hidrogenação catalítica da xilose proveniente nos materiais lignocelulósicos.

Palavras-chave: palha de cevada, hidrólise ácida, xilose, xilitol, *Candida guilliermondii*

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A cevada é uma planta da família das gramíneas, semelhante ao trigo e sua cultura é efetuada em climas temperados. É o quarto cereal mais importante no mundo, sendo precedido pelo trigo, arroz e milho (EMBRAPA, 2006). No Brasil, a cevada é cultivada em escala comercial exclusivamente para a fabricação de malte, principal matéria prima da indústria cervejeira. A cevada libera 30-35% do peso do grão como casca, quando processada industrialmente para fins alimentícios, causando impacto ambiental negativo. Um aproveitamento integral e mais eficiente dos materiais lignocelulósicos pode ser conseguido mediante a separação das principais frações lignocelulósicas em moléculas mais simples (SUN et al., 2005). Para a utilização da hemicelulose, uma hidrólise a baixa temperatura e curtos tempos de reação são mais convenientes, pois impedem a degradação da xilose, formando produtos que podem ser fortes inibidores do metabolismo microbiano (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; CRUZ et al., 2003; MUSSATO, ROBERTO, 2004). O hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada pode ser utilizado como uma alternativa promissora para a biotecnológica de xilitol utilizando a levedura *C. guilliermondii*, substituindo o processo atualmente utilizado, que apresenta custo elevado em função da necessidade de várias etapas de purificação da xilose.

O objetivo do presente trabalho é a otimização da hidrólise ácida da palha de cevada, através do uso de planejamento experimental 2^{4-1} , e posterior utilização desse hidrolisado na bioprodução de xilitol utilizando a levedura *C. guilliermondii*.

Metodologia

Matéria-prima. A palha de foi fornecida pela Malteria do Vale de Taubaté – SP. Os resíduos foram moídos, homogeneizados e armazenados em sacos de 10 kg.

Determinação do teor de umidade. O teor de umidade da palha de cevada foi determinado em balança MB 200, por exposição do material à radiação infravermelha, à temperatura de 105°C durante 30 minutos.

Determinação da concentração de açúcares e xilitol. As concentrações dos açúcares glicose, xilose, arabinose, bem como as de ácido acético e de xilitol, etanol e glicerol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Waters 786), nas seguintes condições: coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura da coluna, 45°C; detector de índice de refração WATERS 410; eluente H₂SO₄ 0,01 N, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 µL.

Hidrólise ácida da palha de cevada. A palha de cevada foi hidrolisada em reator de aço inoxidável com capacidade de 40 L de acordo com planejamento experimental 2^{4-1} .

Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada. O hidrolisado hemicelulósico foi tratado a partir do ajuste do pH inicial (1,56) para pH 7,0, com CaO comercial seguido do abaixamento para pH 2,5 com H₃PO₄. Em seguida, esse foi submetido à adsorção em carvão ativado (1%) em frascos agitados a 200 rpm, a 60°C, por 30 minutos. A cada etapa de alteração do pH e adsorção em carvão, o hidrolisado foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos para a remoção do precipitado formado (MARTON, 2002). O tratamento ocorreu para a redução da concentração dos compostos tóxicos como ácido

acético, furfural e hidroximetilfurfural, provenientes do procedimento de hidrólise da palha de cevada.

Preparo do inóculo para fermentação. Os experimentos foram conduzidos com a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037, selecionada por Barbosa *et al.* (1988), para a bioconversão de xilose em xilitol. Foi utilizada uma cultura estoque do Departamento de Biotecnologia da Faenquil mantida em ágar extrato de malte a 4°C. O cultivo da levedura foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio semi-sintético composto de 30 g/L de xilose, 2 g/L de sulfato de amônio, 0,1 g/L de cloreto de cálcio e 20 g/L de solução de extrato de farelo de arroz. O cultivo foi desenvolvido em incubadora tipo “Shaker” rotatório (New Brunswick, Scientific Co.) com agitação de 200 rpm, a 30°C, por 24 horas. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000 x g (Cu-5000 – Damon/IEC Division) e lavadas com água destilada estéril, novamente centrifugadas e, após o descarte do sobrenadante, utilizadas para o preparo de uma suspensão de células a qual foi empregada como inóculo em uma concentração inicial de 1,0 g/L no meio.

Fermentação em batelada para produção de xilitol. O meio de fermentação constituiu-se do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada, autoclavado por 20 minutos a 0,5 atm, suplementado com os mesmos nutrientes empregados no inóculo, exceto D-xilose. As fermentações ocorreram em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL do meio, a 200 rpm e 30°C.

Determinação da concentração celular. As concentrações celulares, para o preparo do inóculo e durante a fermentação, foram determinadas por turbidimetria a 600 nm (BECKMAN DU 640).

Determinação do pH. O pH das amostras foi determinado em pH-metro Micronal modelo B 474, o qual executa leituras através de uma sonda apropriada (tipo Pt100) na faixa de -5,0 a +105° C.

Determinação dos parâmetros fermentativos: Fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s). Este fator expressa a produção de xilitol em relação ao consumo de xilose e é calculado pela Equação 1:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta p}{\Delta S} = \frac{Pf - Pi}{Si - Sf} \quad (\text{Equação 1})$$

onde: Si e Sf correspondem às concentrações inicial e final de xilose (g/L); Pi e Pf correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g/L).

Produtividade volumétrica de xilitol (Qp). Este fator expressa a concentração de xilitol produzida (g/L) em função do tempo (h) e é calculada de acordo com a Equação 2:

$$Q_p = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{Pf - Pi}{tf - ti} \quad (\text{Equação 2})$$

onde: Pi e Pf correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g/L); Ti e Tf correspondem aos tempos inicial e final de fermentação (h).

Resultados

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ com triplicata no ponto central para a hidrólise hemicelulósica de palha de cevada no qual a resposta analisada foi a concentração de xilose, substrato primordial na bioprodução de xilitol por *Candida guilliermondii*.

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial 2⁴⁻¹ com ponto central e os valores de concentração de xilose a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada.

Ensaio	A	B	C	D	E
1	120	0,50	20	1:8	14,94
2	140	0,50	20	1:12	14,33
3	120	1,00	20	1:12	13,61
4	140	1,00	20	1:8	21,00
5	120	0,50	40	1:12	17,18
6	140	0,50	40	1:8	26,92
7	120	1,00	40	1:8	23,51
8	140	1,00	40	1:12	12,49
9	130	0,75	30	1:10	14,91
10	130	0,75	30	1:10	15,25
11	130	0,75	30	1:10	15,10

A: Temperatura (°C), B: Concentração H₂SO₄ (%), C: Tempo (minutos), D: Relação sólido: líquido, E: Concentração de xilose (g/L).

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam os resultados das análises estatísticas realizadas para os parâmetros estudados na hidrólise ácida da palha de cevada para o planejamento fatorial 2⁴⁻¹ com triplicata no ponto central.

Tabela 2 - Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para a hidrólise ácida da palha de cevada de acordo com o planejamento fatorial 2⁴⁻¹ com ponto central.

	Estimativas	Erros-padrão	t
Média	17,20	±0,750	-
Fator A	1,38	±1,758	0,784
Fator B	-0,69	±1,758	0,392
Fator C	4,25	±1,758	2,417**
Fator D	-7,19	±1,758	4,090*
AB+CD	-3,19	±1,758	1,815
AC+BD	-2,02	±1,758	1,149
AD+BC	-3,36	±1,758	1,911

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade (t ≥ 3,182)

** Significativo ao nível de 10% de probabilidade (t ≥ 2,352)

Tabela 3 – Análise de variância para a hidrólise ácida da palha de cevada de acordo com o planejamento fatorial 2⁴⁻¹ com ponto central.

Efeitos	SQ	GL	QM	f	p
Fator A	3,78	1	3,78	0,61	0,4912
Fator B	0,95	1	0,95	0,15	0,7029
Fator C	32,89	1	32,89	5,32	0,1044**
Fator D	103,39	1	103,39	16,73	0,0264*
AB+CD	20,35	1	20,35	3,29	0,1672
AC+BD	8,12	1	8,12	1,31	0,3349
AD+BD	22,58	1	22,58	3,65	0,1519
Erros	18,55	3	6,18		
Total	210,61	10			

$$R^2=0,91$$

SQ: soma dos quadrados, GL: graus de liberdade,

QM: quadrado médio, f: teste f, p: nível de significância.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 10% de probabilidade

Tabela 4 - Análise de variância para o planejamento fatorial 2⁴⁻¹ com no ponto central para um possível modelo quadrático.

Efeitos	SQ	GL	QM	f	p
Fator A	3,78	1	3,78	130,24	0,0076*
Fator B	0,95	1	0,95	32,80	0,0292**
Fator C	32,89	1	32,89	1132,70	0,0009*
Fator D	103,39	1	103,39	3561,15	0,0003*
AB+CD	20,35	1	20,35	700,99	0,0014*
AC+BD	8,12	1	8,12	279,69	0,0036*
AD+BD	22,58	1	22,58	777,70	0,0013*
Curvatura	18,49	1	18,49	636,73	0,0016*
Erros	0,06	2	0,03		
Total	210,61	10			

$$R^2=0,99$$

SQ: soma dos quadrados, GL: graus de liberdade,

QM: quadrado médio, f: teste f, p: nível de significância.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 10% de probabilidade

Após a obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada foi realizada uma fermentação para a obtenção de xilitol utilizando para a bioconversão da xilose a levedura *Candida guilliermondii*. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da concentração dos açúcares e de xilitol, a Tabela 6 mostra os resultados dos parâmetros fermentativos, após 72 horas de fermentação.

Tabela 5 - Concentrações de açúcares e xilitol presentes no meio de fermentação.

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)
0	79,03	40,50	14,17	-
24	69,80	-	14,62	7,31
48	50,00	-	14,56	17,55
72	28,30	-	13,46	26,83

Tabela 6 - Parâmetros fermentativos durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada por *Candida guilliermondii*.

Tempo (h)	Y _{P/S} (g/g)	η (%)	Q _p (g/L.h)
0	-	-	-
24	0,66	71,74	0,30
48	0,86	94,23	0,36
72	0,63	69,05	0,37

Y_{P/S} (g/g): fator de conversão de xilitol em relação a xilose,

η (%): eficiência de conversão, Q_p (g/L.h): produtividade volumétrica em xilitol.

Discussão

A Tabela 1 mostra que a maior concentração de xilose (26,92 g/L) ocorreu no ensaio 6, que foi conduzido a uma temperatura de 140°C, concentração de H₂SO₄ de 0,5%, relação sólido: líquido de 1:8 na qual a reação de hidrólise ocorreu durante 40 minutos.

Verifica-se na Tabela 2 que somente o fator C exerceu influência ao nível de 5% de probabilidade e o fator D ao nível de 10% de probabilidade. Os fatores A e B não foram significativos e conseqüentemente nenhuma interação apresentou significância, já que os fatores A e B estavam presentes em todas as interações.

Na Tabela 3, estão mostrados os níveis de significância dos C e D, correspondendo a 10,44% e 2,64%, respectivamente.

Isto demonstra que o modelo linear poderia ser descartado. Como pode ser comprovado na Tabela 4, a análise estatística realizada estimando um modelo quadrático, mostra que os fatores são significativos para o processo, o que significa que os ensaios estão sendo realizados na região de otimização do processo, já que a curvatura é bastante significativa ($p=0,0016$). Porém ao analisar os resultados obtidos no ponto central verifica-se que a média corresponde a 15,09±0,029 indicando que a otimização está correspondendo à minimização.

Para a obtenção dos valores máximos os estudos devem ser deslocados para a região de maximização. Para isto serão realizados ensaios complementares na região de otimização.

Como no ensaio 6 obteve-se uma boa concentração de xilitol foi realizada uma fermentação para verificar a capacidade da levedura *Candida guilliermondii* na produção de xilitol a partir do hidrolisado de palha de cevada.

A Tabela 5 demonstra que a glicose presente nos hidrolisados foi sendo consumida rapidamente antes das 48 horas de fermentação. Comportamento semelhante no consumo desta hexose por *Candida guilliermondii* foi constatado nas fermentações dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (FELIPE et al, 1993) e de palha de

arroz (ROBERTO et al., 1994). Segundo FELIPE et al (1993), a presença dessa hexose em pequenas concentrações no meio não interfere na bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii*.

Observa-se que a xilose foi assimilada lentamente nas primeiras horas de fermentação. Em relação ao consumo, verifica-se um consumo de 64,19% desta hexose.

Outro açúcar presente no hidrolisado numa concentração mais baixa é a arabinose (14,17 g/L), sendo parcialmente consumida. De acordo com ALVES et al (1998), uma pequena assimilação de arabinose na presença de xilose foi constatada em fermentações conduzidas com *Candida guilliermondii*. Segundo Shi et al (2000) a via de assimilação da arabinose em leveduras é bastante similar à de fermentação de xilose.

Nota-se também que a levedura *Candida guilliermondii* foi capaz de produzir xilitol a partir da xilose presente no hidrolisado de palha de cevada. A produção de xilitol varia proporcionalmente quanto ao consumo de xilose e glicose. Este comportamento já foi observado com esta levedura cultivada em hidrolisados de resíduos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar (Felipe et al., 1997) e palha de arroz (Mussato et al., 2001).

A Tabela 6 mostra valores de eficiência de conversão (94,23%), correspondendo a um $Y_{P/S}$ igual a 0,86 e produtividade de 0,36 g/L.h em 48 horas de fermentação. Nota-se que houve uma grande conversão de xilose em xilitol.

Conclusão

Conclui-se que a partir da hidrólise hemicelulósica de palha de cevada obtém-se um hidrolisado rico em xilose para o processo fermentativo a partir da levedura *Candida guilliermondii* que é capaz de adaptar-se no meio e utilizar a xilose deste hidrolisado como substrato para a produção de xilitol, processo bastante promissor para a substituição da obtenção de xilitol via química.

Agradecimentos: Apoio financeiro da FAPESP.

Referências

- ALVES, L. A., FELIPE, M. G. A., ALMEIDA e SILVA, J. B., SILVA, S. S., PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Appl. Biochem. and Biotechnol**, v. 70-72, p. 89-98, 1998.

- CRUZ, J.M., DOMINGUEZ, J. M., DOMINGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. Preparation of fermentation

media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. **Food Biotechnol.**, v.14, n.1-2, p.79-97, 2000.

- EMBRAPA. Cevada chega ao serrado. Disponível em www.embrapa.com.br Acesso em: março, 2006.

- FELIPE, M.G.A. et al. Preparação de Xilitol por Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.36, n.1, p.103-114, 1993.

- FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M. ; SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for Xylitol production: Effect pH. **Biomass and Bioen.**, v.13,n. 1/2, p.11-14, 1997.

- MARTON, J. M. Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção biotecnológica de xilitol. FAENQUIL, 2002. (Tese de Mestrado).

- MUSSATTO, S.I., ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative process: a review. **Biorresource Technol.**, v.93, p.1-10, 2004.

- MUSSATO, I. C., ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnol. Letters**, v. 23, p. 1681-1684, 2001.

- ROBERTO, I.C., MANCILHA, I. M., SOUZA, C. A., FELIPE, M. G. A., SATO, S., CASTRO, H. F. Evaluation of rice straw hemicellulosic hydrolysate in the production by *C. guilliermondii*. **Biotechnol. Letters**, v.16, n.11, p.1211-1216, 1994.

- SHI, N. Q., PRAHL, K., HENDRICK, J., CRUZ, J. E LU, P. Characterization and complementation of a pichia stipitis mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. **Appl. Biochem. and Biotechnol.**, v. 84-86, p. 201-215, 2000.

- SUN, X. F., XU, F., SUN, R. C., FOWLER, P., BAIRD, M. S. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam exploded wheat straw. **Carbohydrate Research**, v.340, p.97-106, 2005.

- WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.1, p.1-4, 1998.