

# INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO GLICOSE:XILOSE NO CRESCIMENTO CELULAR DE *Candida guilliermondii* CULTIVADA EM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA

**Débora Danielle Virgínio da Silva**<sup>1</sup>, **Priscila Vaz de Arruda**<sup>2</sup>, **Franciscele Andréia Hasmann**<sup>3</sup> e **Maria das Graças de Almeida Felipe**<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda, CAPES. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Debiq. Rodovia Itajubá-Lorena-Km 74,5, C. Postal 116, 12600-970, Lorena-SP e-mail: debora@debiq.fauenquil.br

<sup>2</sup> Iniciação Científica. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Debiq. Rodovia Itajubá-Lorena-Km 74,5, C. Postal 116, 12600-970, Lorena-SP e-mail: priscilavaz\_eb@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Colaboradora. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Debiq. Rodovia Itajubá-Lorena-Km 74,5, C. Postal 116, 12600-970, Lorena-SP e-mail: fhasmann@uol.com.br

<sup>4</sup> Professora orientadora. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Debiq. Rodovia Itajubá-Lorena-Km 74,5, C. Postal 116, 12600-970, Lorena-SP e-mail: mgafelipe@debiq.fauenquil.br

**Resumo** - A obtenção biotecnológica de xilitol consiste na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos empregando-se microrganismos capazes de metabolizar xilose, destacando-se a levedura *Candida guilliermondii*. Neste trabalho avaliou-se o efeito de diferentes relações glicose:xilose (1:25, 1:12, 1:5 e 1:2,5) no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sobre o crescimento celular de *C. guilliermondii* durante a bioconversão de xilose em xilitol. As fermentações foram realizadas em fermentador de bancada com 1,6L de meio com pH inicial de 5,5, 500rpm,  $k_L a = 17h^{-1}$  a 30°C, durante 96h. Verificou-se que o aumento da relação glicose:xilose favoreceu o crescimento celular, o consumo de xilose e a formação de xilitol. A máxima formação de biomassa (22,03g/L) e a máxima formação de xilitol (25,77g/L) foram verificadas com o emprego da relação glicose:xilose de 1:2,5.

**Palavras-chave:** *Candida guilliermondii*, hidrolisado de bagaço de cana, glicose, xilitol

**Área do Conhecimento:** II Ciências Biológicas.

## Introdução

A levedura *Candida guilliermondii*, forma anamórfica da *Pichia guilliermondii*, tem sido considerada como um dos melhores microrganismos utilizados no processo de obtenção biotecnológica de xilitol [1]. Sua utilização neste bioprocessos é possível devido à sua capacidade de sintetizar as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, principais envolvidas no metabolismo de xilose em xilitol [2].

O xilitol é um poliol com propriedades que lhe garantem aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e odontológica. Dentre estas propriedades destacam-se seu poder adoçante semelhante ao da sacarose, sua anticariogenicidade [3] e seu potencial na prevenção de doenças como otite, osteoporose e infecções respiratórias [4, 5, 6].

O processo biotecnológico de obtenção de xilitol utiliza como substrato a xilose encontrada em grande quantidade em materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar. Após um processo de hidrólise ácida do bagaço de cana obtém-se um hidrolisado hemicelulósico que contém além da xilose (açúcar predominante), glicose, hexose apontada como um dos fatores que interferem no

metabolismo de xilose, dependendo da sua concentração no meio de fermentação [7].

Assim, neste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes relações glicose:xilose no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana sobre o crescimento celular de *C. guilliermondii* durante a bioconversão de xilose em xilitol.

## Metodologia

### **Microrganismo e Preparo do Inóculo**

Os experimentos foram 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 foram transferidas para o meio de cultivo do inóculo contendo xilose (30g/L), glicose (2g/L),  $(NH_4)_2SO_4$  (2g/L),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,1g/L) e extrato de farelo de arroz (20g/L). O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer (125mL) contendo 50mL do meio, incubados a 200rpm, 30°C por 24h. A concentração inicial de inóculo nas fermentações foi de 1,0g/L de células.

### **Preparo do Hidrolisado Hemicelulósico**

O bagaço de cana de açúcar foi hidrolisado em reator de 350L a 121°C, por 20 minutos, empregando 100mg de  $H_2SO_4$  por grama de matéria seca (relação sólido-líquido de 1:10). O

hidrolisado foi filtrado e concentrado a vácuo a 70°C (para aumentar em 3 vezes a concentração inicial de xilose). Posteriormente o hidrolisado foi submetido ao processo de tratamento para a remoção de compostos tóxicos, que consistiu em adicionar ao hidrolisado (pH=0,43), 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 o ajuste de pH, carvão ativo (1%) foi adicionado ao hidrolisado sob agitação (200rpm, 60°C, 30min.). A 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 foi autoclavado a 111°C por 15min.

#### Condições de Fermentação

As fermentações foram realizadas em fermentador de bancada KLF 2000 Bioengineering (500rpm, k<sub>L</sub>a de 17h<sup>-1</sup>, 30°C) contendo 1600mL de hidrolisado de bagaço de cana (xilose: 46g/L, glicose: 1,8g/L, arabinose: 2,77g/L), suplementado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2g/L), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,1g/L) e extrato de farelo de arroz (20g/L), com pH inicial de 5,5. Para avaliar o efeito da glicose no crescimento celular de *C.*

*guilliermondii*, uma solução de glicose foi adicionada ao hidrolisado para se obter concentrações iniciais em torno de 4,0g/L (glicose:xilose=1:12), 9,0g/L (glicose:xilose=1:5) e 18,0g/L (glicose:xilose=1:2,5). Experimento controle foi realizado empregando-se o hidrolisado sem a adição de glicose, cuja concentração de xilose e glicose foram 46 e 1,8g/L respectivamente, correspondendo a uma proporção entre estes dois açúcares de 1:25.

#### Métodos Analíticos

As concentrações de glicose, xilose, arabinose e xilitol foram determinadas por cromatografia líquida. O crescimento celular foi acompanhado por medida de absorbância a 600nm e a concentração celular foi calculada por uma curva-padrão que correlaciona a absorbância à 600nm e o peso seco das células.

#### Resultados

A Figura 1 apresenta o crescimento celular de *C. guilliermondii* durante as fermentações do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com diferentes relações glicose:xilose.

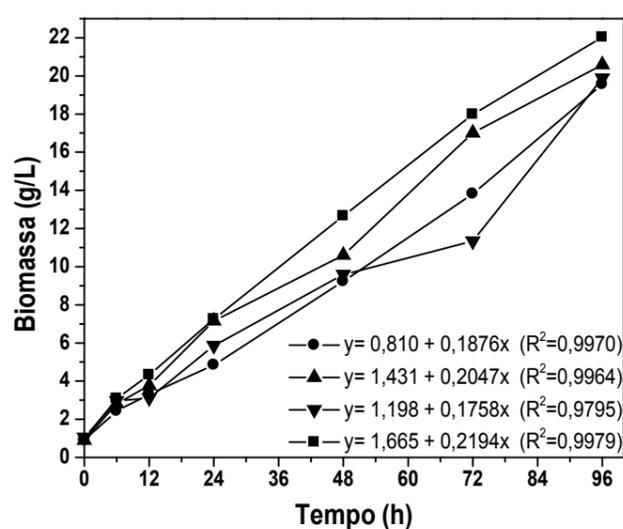
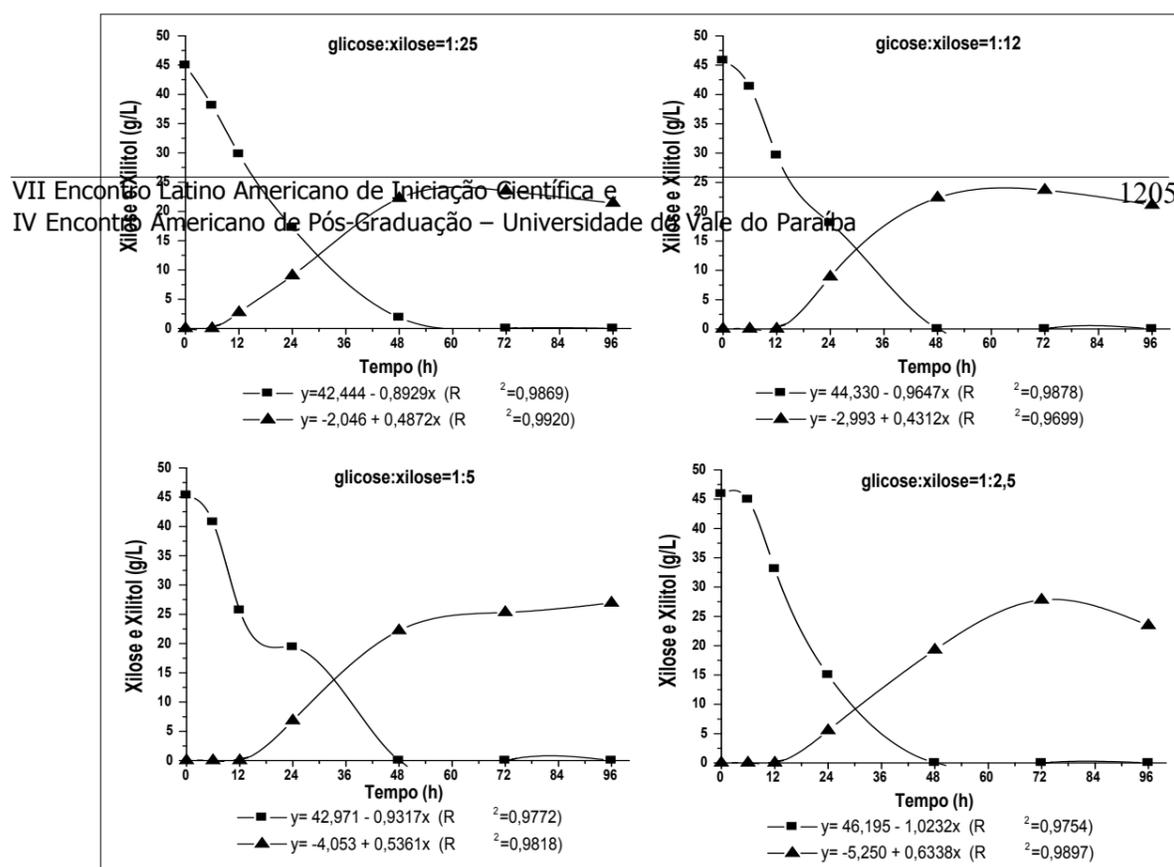


Figura 1 Crescimento celular de *C. guilliermondii* durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com as relações glicose:xilose de 1:25 (●), 1:12 (▲), 1:5 (▼) e 1: 2,5 (■).

A Figura 2 apresenta o consumo de xilose e a formação de xilitol durante as fermentações do

hidrolisado de bagaço de cana com diferentes relações glicose:xilose, por *C. guilliermondii*.



**Figura 2** Consumo de xilose (l) e formação de xilitol (^) durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com diferentes relações glicose:xilose.

### Discussão

Conforme pode ser verificado na Figura 1, o crescimento celular de *C. guilliermondii* foi influenciado pela relação glicose:xilose no hidrolisado de bagaço de cana utilizado como meio de fermentação. A partir da análise dos coeficientes angulares das equações obtidas fazendo-se a regressão linear dos gráficos da Figura 1 utilizando o intervalo [0,96] pode-se inferir que houve aumento da velocidade de formação de células com o aumento da relação glicose:xilose, exceto para a relação glicose:xilose 1:5, onde se verificou velocidade de formação de células menor do que a observada para a condição controle (relação glicose:xilose 1:25). O maior efeito do aumento da concentração de glicose sobre o crescimento celular foi observado nas fermentações em meio com relação glicose:xilose de 1:2,5. Nesta condição, verificou-se crescimento celular 14,49% maior do que o obtido na fermentação com relação glicose:xilose de 1:25.

Densidade celular diretamente proporcional à concentração de glicose no meio também foi observada durante o cultivo de *Debaryomyces hansenii* [8] e de *Zymomonas mobilis* [9] em meio sintético.

O crescimento celular de *C. guilliermondii* durante as fermentações do hidrolisado de bagaço de cana foi acompanhado pelo consumo dos açúcares e pela formação do xilitol (Figura 2). Toda a glicose presente no meio de fermentação foi assimilada nas primeiras 12h em todas as condições avaliadas (dados não apresentados). No tempo de incubação de 48h, 100% da xilose havia sido consumida nas fermentações onde a glicose foi adicionada ao hidrolisado (relações glicose: xilose de 1:12, 1:5 e 1:2,5), o que representa um consumo desta pentose 4,28% maior do que o observado para a condição controle (relação glicose:xilose = 1:25).

Analisando as equações obtidas através da regressão linear dos gráficos da Figura 2, utilizando o intervalo de maior linearidade para a xilose [0,48], nota-se que os valores dos coeficientes lineares se aproximam da concentração inicial de xilose, enquanto os coeficientes angulares, que representam a taxa de consumo deste açúcar, aumentam com o aumento da relação glicose:xilose, demonstrando que a taxa de consumo desta pentose foi favorecida com a maior concentração inicial de glicose no hidrolisado. Este resultado difere do relatado por outros autores. KASTNER et al. [10] observaram que a velocidade de

consumo de xilose por *C. tropicalis* foi 72% menor quando a relação glicose:xilose variou de 1:12,5 para 1:2 em meio sintético. Da mesma forma, TAVARES *et al.* [8] observaram redução de 65% no consumo desta pentose por *D. hansenii* quando a relação glicose:xilose passou de 1:10 para 1:2.

Na Figura 2 também se observa a formação de xilitol por *C. guilliermondii* durante as fermentações do hidrolisado de bagaço de cana com diferentes relações glicose:xilose. Foi verificado favorecimento da formação deste poliol utilizando-se meio com relação glicose:xilose de 1:5 e 1:2,5, confirmado pelo aumento dos coeficientes angulares das equações obtidas fazendo-se a regressão linear dos gráficos da Figura 2, utilizando o intervalo [6,48]. O máximo rendimento ( $Y_{P/S}=0,56\text{g/g}$ ) de xilitol foi observado após 72h e a máxima produtividade ( $Q_P=0,52\text{g/L.h}$ ) após 48h de fermentação, utilizando-se a relação glicose:xilose de 1:2,5, o que corresponde a uma eficiência de conversão de xilose em xilitol de 61,24%.

Favorecimento da formação de xilitol pela presença de glicose no meio de fermentação também foi observado durante o cultivo de *D. hansenii* em meio sintético [8]. Neste caso, os autores observaram aumento de 30% no rendimento de xilitol ( $Y_{P/S} = 0,56\text{g/g}$ ) empregando uma relação glicose:xilose de 1:10 em relação ao meio sem glicose. Também durante o cultivo de *C. tropicalis* em meio sintético com relação glicose:xilose variando de 1:6 a 1:0,75, baixas relações glicose:xilose (1:6 e 1:3) não tiveram efeito sobre o rendimento de xilitol sob condições microaeróbias [11].

### Conclusões

O crescimento celular de *C. guilliermondii* foi favorecido pelo aumento concentração inicial de glicose no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana utilizado como meio de fermentação, observando-se a máxima formação de biomassa (22,03g/L) com o emprego da relação glicose:xilose de 1:2,5. Esta condição também proporcionou a máxima formação de xilitol (25,77g/L).

### Referências Bibliográficas

- [1] Silva, D. D. V., Felipe, M. G. A., Mancilha, I. M., Faria, F. P. (2004). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. *BIOforum Europe*, n. 3/2004 (IN PRESS).
- [2] 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.

[3] Makinen, K. K. (2000). Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? *Medical Hypotheses*, v. 54, n. 4, p. 603-613.

[4] Tapiainen, T., Kontiokari, T., Sammalkivi, L., Ikaheimo, I., Koskela, M., Uhari, M. (2001). Effect of xylitol on growth of *Streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 1, p. 166-169.

[5] Matilla, P. T.; Svanberg, M. J.; Pökkä, P.; Knuutila, M. L. E. (1998). Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats. *The Journal of Nutrition*, v. 128, n. 10, p. 1811-1814.

[6] Zabner, J., Seiler, M.P., Launspach, J.L., Karp, P.H., Kearney, W.R., Look, D.C., Smith, J.J., Welsh, M.J. (2000). The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *PNAS*, v. 97, n. 21, p. 11614-11619.

[7] Rosa, S.M.A., Felipe, M.G.A., Silva, S.S., Vitolo, M. (1998). Xylose reductase production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p. 127-135.

[8] Tavares, J. M., Duarte, L. C., Amaral-Collaco, M. T., Gírio, F. M. (2000). The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 743-747.

[9] Lawford, H. G., Rosseau, J. D. (2002). Performance testing of *Zymomonas mobilis* metabolically engineered for cofermentation of glucose, xylose and arabinose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 429-448.

[10] Kastner, J. R., Eitman, M. A., Sarah, A. L. (2001). Glucose repression of xylitol production in *Candida tropicalis* mixed-sugar fermentations. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 1663-1667.

[11] Walther, T., Hensirisak, P., Agblevor, F. A. (2001). The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, v. 76, p. 213-220.