

AUTORES
AUTHORS

✉ **Larissa CANILHA***
Walter de CARVALHO
João Batista de Almeida e SILVA

Faculdade de Engenharia Química de Lorena,
Rod. Itajubá-Lorena, km 74,5,
Cx. POSTAL 116, CEP: 12.600-970,
Lorena-SP, Brasil
Fax: (12) 3153-3133;
e-mail: larissa@debiq.faqnquil.br

RESUMO

O hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo foi utilizado como fonte de xilose para a bioprodução de xilitol (um adoçante bastante destacado utilizado nas indústrias alimentícias e farmacêuticas) utilizando *Candida guilliermondii* FTI 20037. Antes da bioconversão, o hidrolisado foi concentrado três vezes a fim de aumentar o teor de xilose inicial (para cerca de 57 g/L). A concentração a vácuo também levou a um aumento proporcional na concentração de glicose (para cerca de 23 g/L). Após a concentração, o hidrolisado foi detoxificado por alteração de pH (com CaO e H₃PO₄) e adsorção de carvão ativo, antes de ser utilizado como meio de fermentação. Duas estratégias diferentes foram utilizadas para a preparação do inóculo: 1^o) crescimento das células em um meio preparado com glicose (7 g/L) e xilose (30 g/L) como fontes de carbono, e 2^o) crescimento das células em um meio preparado somente com glicose (37 g/L). Para cada um dos inóculos, as bioconversões de xilose a xilitol foram realizadas em frascos "Erlenmeyer" de 125 mL contendo o hidrolisado detoxificado e uma concentração inicial de células de 0,5 g/L. As células crescidas no meio preparado com glicose e xilose apresentaram uma produção de xilitol de 28,6 g/L após 72 horas de fermentação (rendimento da bioconversão de 0,54 g/g e produtividade de 0,40 g/Lh). Por outro lado, as células crescidas somente em glicose apresentaram uma produção de xilitol de 30,5 g/L após 72 horas de fermentação (rendimento da bioconversão de 0,59 g/g e produtividade de 0,42 g/Lh). De acordo com estes resultados, pode ser concluído que não é necessário o uso de um meio contendo xilose para o crescimento das células (inóculo) quando se utiliza o hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo como fonte de xilose para a produção de xilitol.

SUMMARY

Wheat straw hemicellulosic hydrolysate was used as a xylose source for the bioproduction of xylitol (an outstanding sweetener widely used in food and pharmaceutical industries) using *Candida guilliermondii* FTI 20037. Prior to the bioconversion, the hydrolysate was concentrated three-fold in order to increase the initial xylose content (to about 57 g/L). The vacuum concentration also led to a proportional increase in the glucose concentration (to about 23 g/L). After concentration, the hydrolysate was detoxified by pH alteration (with CaO and H₃PO₄) and active charcoal adsorption before being used as the fermentation medium. Two different strategies were used for the inoculum preparation: 1^o) cells growth in a medium prepared with both glucose (7 g/L) and xylose (30 g/L) as the carbon sources, and 2^o) cells growth in a medium prepared with only glucose (37 g/L). For each one of the different inoculum, the xylose-to-xylitol bioconversions were carried out in 125-mL Erlenmeyer flasks containing the detoxified hydrolysate and an initial cell concentration of 0.5 g/L. The cells grown up in medium prepared with glucose and xylose provided a xylitol production of 28.6 g/L after 72 h fermentation (bioconversion yield of 0.54 g/g and productivity of 0.40 g/L h). On the other hand, the cells grown up only in glucose provided a xylitol production of 30.5 g/L after 72 h fermentation (bioconversion yield of 0.59 g/g and productivity of 0.42 g/L h). According to these results, it can be concluded that it is unnecessary the use of a xylose-containing medium for cells growth (inoculum) when using the wheat straw hemicellulosic hydrolysate as a xylose source for xylitol production.

PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS

glicose; xilose; produção de xilitol;
hidrolisado de palha de trigo
glucose; xylose; xylitol production;
wheat straw hydrolysate

1. INTRODUÇÃO

Materiais lignocelulósicos, como a palha de trigo, são fontes abundantes, renováveis e de baixo custo, com aplicações em diversos processos biotecnológicos. A fração hemicelulósica destes resíduos pode ser hidrolisada utilizando-se ácidos minerais (KHUAD; SINGH, 1993), originando um hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis, sobretudo xilose e glicose. Diferente dos hidrolisados provenientes de outros materiais lignocelulósicos (como bagaço de cana, madeira de eucalipto e palha de arroz), o hidrolisado de palha de trigo apresenta uma considerável concentração de glicose na sua composição, cerca de 8 g/L (CANILHA et al., 2003).

Segundo alguns autores (SILVA et al., 1997; GIRIO et al., 2000), altas concentrações de glicose podem levar à repressão do consumo da xilose pelas leveduras e favorecer a inibição das enzimas-chave da bioconversão xilose-xilitol, xilose redutase e xilitol desidrogenase. Por outro lado, a glicose presente no hidrolisado pode atuar como uma fonte de energia adicional para o metabolismo microbiano (YAHASHI et al., 1996; LEE et al., 2000). Segundo YAHASHI et al. (1996), a bioconversão de xilose em xilitol por células imobilizadas de *Candida tropicalis* foi mais eficiente na presença de glicose, a qual foi utilizada para o crescimento celular antes da utilização da xilose, permitindo a regeneração de NADPH pelo metabolismo através da via das fosfopentoses. LEE et al. (2000) observaram que em um processo fermentativo contendo glicose e xilose, a glicose é usada como fonte de energia para o crescimento celular e como um co-substrato para regeneração de cofatores e a xilose é utilizada como substrato primordial para a conversão em xilitol. A influência da concentração de glicose presente no hidrolisado também foi estudada por VIRGÍNIO da SILVA (2005), que verificou uma melhora na produção de xilitol ao aumentar a relação xilose:glicose de 1:25 para 1:2,5. Ainda segundo esta autora, a presença de glicose no meio como única fonte de carbono durante o cultivo do inóculo permitiu obter a máxima concentração de xilitol produzida.

Devido ao fato da palha de trigo apresentar uma alta concentração de glicose presente na sua fração hemicelulósica, a composição do hidrolisado foi estudada com o objetivo de verificar se esta concentração afetaria ou não a produção de xilitol. O outro fator em questão foi o de verificar se seria necessário o uso de um meio contendo xilose para o crescimento das leveduras no inóculo. Foram então avaliados dois meios diferentes para o crescimento de *Candida guilliermondii* FTI 20037: um meio contendo xilose e glicose e outro contendo apenas glicose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Hidrólise ácida da palha de trigo

A hidrólise foi realizada em um reator de aço inoxidável de 250 L de capacidade útil de acordo com as seguintes condições: concentração de 1,0 % de ácido sulfúrico, proporção de 1:10 entre a solução ácida e a massa seca do resíduo, a 121 °C por 30 min. O hidrolisado obtido foi

caracterizado quanto à concentração de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e de inibidores presentes (furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido acético).

2.2 Concentração e tratamento do hidrolisado

O hidrolisado foi então concentrado (fator de concentração igual a três) em um evaporador a vácuo de 30 L de capacidade útil, a 70 °C, com finalidade de aumentar a concentração inicial de xilose presente.

A fim de reduzir as concentrações dos compostos tóxicos, o hidrolisado concentrado foi submetido ao seguinte tratamento: elevação do pH inicial para 7,0 com óxido de cálcio comercial, e posterior redução do pH para 5,5 com ácido fosfórico comercial. Foi feita, ainda, a adição de carvão ativo (2,5 %) sob agitação de 200 rpm, a 30 °C, por 1 h. Após o tratamento, o hidrolisado foi autoclavado a 111 °C, por 15 min. O hidrolisado após ser concentrado e tratado também foi caracterizado quanto à concentração de açúcares e de inibidores presentes.

2.3 Microrganismo e preparo do inóculo

Foi utilizada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, da coleção de culturas do Grupo de Processos Fermentativos - da FAENQUIL, selecionada por BARBOSA et al. (1988). Nesta etapa, foram estudados dois meio-sintéticos para o crescimento das células:

Meio preparado com (g/L): 30,0 de D-xilose, 7,0 de glicose, 2,0 de sulfato de amônio, 0,1 de cloreto de cálcio e 20,0 de farelo de arroz,

Meio preparado com (g/L): 37,0 de glicose, 2,0 de sulfato de amônio, 0,1 de cloreto de cálcio e 20,0 de farelo de arroz.

As células foram cultivadas em incubadora de movimento circular a 200 rpm, 30 °C, por 24 h. Em seguida, foram recolhidas por centrifugação a 2000 x g por 20 minutos, e lavadas com água esterilizada, para o preparo da suspensão que foi utilizada como inóculo da fermentação.

2.4 Meio e condições de fermentação

O meio de fermentação consistiu no hidrolisado tratado, suplementado com 1 g/L de sulfato de amônio e 5 g/L de farelo de arroz. Os ensaios foram conduzidos em frascos "Erlenmeyer" de 125 mL com 50 mL de meio em incubadora de movimento circular a 200 rpm, 30 °C, por 72 h. A concentração inicial de células nos frascos foi de 0,5 g/L.

2.5 Métodos analíticos

Para a avaliação do crescimento celular (células/mL) e para o preparo do inóculo, as concentrações celulares foram determinadas por espectroscopia no comprimento de onda de 600 nm. As concentrações de açúcares e de inibidores foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como descrito por CANILHA et al. (2003).

O rendimento da bioconversão de xilose em xilitol (YP/S) (g/g) foi a razão entre a produção de xilitol (g/L) e o consumo de xilose (g/L). A produtividade volumétrica em xilitol (QP) (g/Lh) foi a razão entre a produção de xilitol (g/L) e o tempo de fermentação (h).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do hidrolisado de palha de trigo

O primeiro passo deste estudo consistiu na preparação e detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. A Tabela 1 apresenta as concentrações dos açúcares e dos inibidores presentes no hidrolisado original, após ser concentrado (três vezes) e tratado. O hidrolisado obtido após a hidrólise ácida apresentou concentrações de 18,11 g/L de xilose e 7,26 g/L de glicose. Comparando estes resultados com outros trabalhos reportados na literatura, observa-se que estas concentrações foram superiores às encontradas por FELIU et al. (1990), de 6,5-8,3 para xilose e 1,5-2,4 g/L para glicose, também em hidrolisado de palha de trigo. Segundo estes autores, após o hidrolisado ter sido concentrado dez vezes, as concentrações destes açúcares aumentaram para 50-60 e 9-10 g/L, respectivamente. Como pode ser observado, o valor encontrado de xilose foi semelhante ao deste trabalho (57,52 g/L), após o hidrolisado ter sido concentrado apenas três vezes (Tabela 1). Em hidrolisado de eucalipto, CANETTIERI et al. (2001) encontraram concentrações de xilose, antes e após concentrarem três vezes, de 19,17 e 59,21 g/L, respectivamente; valores muito próximos aos encontrados neste trabalho. CARVALHO et al. (2005), também em hidrolisado de eucalipto, observaram concentrações de xilose, antes e após concentrarem 2,5 vezes, de 24,32 e 64,20 g/L, respectivamente; valores um pouco acima aos encontrados neste trabalho.

Em relação à glicose, a concentração a vácuo também levou a um aumento proporcional na sua concentração (22,71 g/L), mantendo-se praticamente constante após o tratamento (21,20 g/L). Segundo WALTHER et al. (2001), a presença de glicose nos hidrolisados pode atuar como fonte adicional de energia para o metabolismo microbiano.

Tabela 1. Composição do hidrolisado de palha de trigo original, concentrado e tratado.

Componentes	Concentração (g/L)		
	Original	FC=3	Tratado
Glicose	7,26	22,71	21,20
Xilose	18,11	57,52	49,77
Arabinose	2,23	9,00	8,28
Acético	1,95	3,09	3,04
furfural	0,26	0,04	0,00
HMF	0,18	0,49	0,01

FC= fator de concentração

Ainda na Tabela 1, observa-se que além dos açúcares, o hidrolisado apresentou inibidores ao metabolismo das leveduras, como o furfural, HMF e o ácido acético. Mesmo antes do hidrolisado ter sido tratado, as concentrações destes compostos foram bastante baixas. A presença de baixas concentrações destes inibidores é um ponto favorável ao processo fermentativo, indicando que as condições de hidrólise estão sendo adequadas para a extração da fração hemicelulósica, podendo ser confirmado pelas pequenas concentrações de furfural e HMF obtidas (Tabela 1). Quando o teor desses inibidores estiver elevado, significa que a condição de hidrólise está sendo drástica, implicando na decomposição da xilose e da glicose no meio (CANILHA, 2002). Também podemos observar na Tabela 1 que foi possível reduzir as concentrações dos inibidores quando o hidrolisado foi tratado conforme metodologia descrita.

3.2 Processo fermentativo

A levedura foi cultivada em frascos "Erlenmeyer" com dois diferentes meio-sintéticos: cultivada na presença de glicose (7 g/L) e xilose (30 g/L) ou cultivada apenas na presença de glicose (37 g/L), ou seja, sem a presença de xilose no meio. A Tabela 2 apresenta os valores de concentração de xilitol (P), produtividade volumétrica (QP) e rendimento de xilose em xilitol (YP/S) obtidos durante as bioconversões.

TABELA 2. Valores de concentração de xilitol (P), produtividade volumétrica (QP) e rendimento em xilitol (YP/S) obtidos na presença de glicose/xilose ou na presença de somente glicose no meio.

Variáveis dependentes	Meio semi-sintético	
	Crescendo em glicose/xilose	Crescendo em glicose
P (g/L)	28,60	30,50
QP (g/Lh)	0,40	0,42
YP/S (g/g)	0,54	0,59

Conforme pode ser observado, foram obtidos 30,50 g/L, 0,42 g/Lh e 0,59 g/g, para concentração, produtividade volumétrica e rendimento em xilitol, respectivamente, para a levedura cultivada apenas na presença de glicose no meio.

WALTHER et al. (2001) reportaram que a produção de xilitol utilizando hidrolisado hemicelulósico pode ser afetada por três fatores: 1) pelas concentrações de açúcares no meio de fermentação, 2) pela relação entre estes açúcares e 3) pelos compostos tóxicos formados durante o processo de hidrólise. Portanto, as concentrações dos açúcares utilizadas para o cultivo da levedura (inóculo) não afetariam o processo de formação de xilitol e, no caso deste trabalho, as concentrações dos inibidores formados foram bastante baixas, praticamente nulas em relação ao furfural e ao HMF.

PFEIFER et al. (1996), avaliando diferentes tipos de cultura para o crescimento da levedura *C. guilliermondii*, verificaram que a formação de xilitol foi extremamente afetada

pela composição do meio de cultura. Os meios de cultura testados foram: 1) células crescendo em meio com xilose/glicose, 2) em meio só com glicose ou 3) em meio só com xilose. Estes autores puderam observar que a maior concentração de xilitol (16,40 g/L) e o maior rendimento da bioconversão (0,57 g/g) foram obtidos utilizando-se o inóculo crescendo só em glicose. Segundo estes autores, ao se utilizar apenas xilose como meio para o crescimento celular, ocorreu a utilização de xilitol para regeneração do cofator NADPH, que por sua vez, foi utilizado na primeira etapa do metabolismo da xilose. Já, a maior produtividade volumétrica (0,53 g/Lh) foi encontrada quando a levedura cresceu no meio com xilose e glicose.

VIRGÍNIO da SILVA (2005) também verificou que o inóculo cultivado em meio contendo somente glicose favoreceu a formação de xilitol (27,80 g/L) por *Candida guilliermondii* FTI20037 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar quando comparado com meios contendo glicose e xilose (25,77 g/L) ou somente xilose (24,60 g/L).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, baseado nos resultados reportados por PFEIFER et al. (1996) e VIRGÍNIO da SILVA (2005) e levando em conta o aspecto econômico, pode ser concluído que não será necessária a adição de xilose ao meio para o crescimento de células no inóculo ao utilizarmos hidrolisado de palha de trigo como fonte de xilose para a produção de xilitol.

4. REFERÊNCIAS

BARBOSA, M.F.S.; MEDEIROS, M.B.; MANCELHA, I.M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, v.3, p.241-251, 1988.

CANETTIERI, E.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.24, p.159-168, 2001.

CANILHA, L. Aproveitamento do hidrolisado de palha de trigo para a obtenção de xilitol por via microbiana. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL, Lorena, 2002. 79p.

CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; CARVALHO, W. Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. *Biotechnology Letters*, v.25, p.1811-1814, 2003.

CARVALHO, G.B.M.; GINORIS, Y.P.; CÂNDIDO, E.J.; CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Estudo do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins biotecnológicos. *Revista Analytica*, n.14, p.54-57, 2005.

FELIU, J.A.; GONZALEZ, G.; MAS, C. SCP production

by *Hansenula polymorpha* from xylose. *Process Biochemistry*, p.136-140, 1990.

GIRIO, F.M.; AMARO, C.; AZINHEIRAL, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, v.71, n3, p.245-251, 2000.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.13, n.2, p.151-172, 1993.

LEE, W.J.; RYU, Y.M.; SEO, J.H. Characterization of two substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. *Process Biochemistry*, v.35, p.1199-1203, 2000.

PFEIFER, M.J.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; MANCELHA, I.M. Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI20037. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.57/58, p.423-430, 1996.

SILVA, S.S.; QUESADA-CHANTO, A.; VITOLO, M. Upstream parameters affecting the cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.52c, p.359-363, 1997.

VIRGÍNIO da SILVA, D.D.; FELIPE, M.G.A.; MARTON, J.M.; MATOS, G. Influência da relação glicose:xilose na formação dos subprodutos glicerol e etanol durante a obtenção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana. In: Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia em Resíduo e Desenvolvimento Sustentável, Florianópolis, Brasil: CD Rom, 2004.

WALTHER, T.; HENSIRISAK, P; AGBLEVOR, F.A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, v.76, n.3, p.213-220, 2001.

YAHASHI, Y.; HATSU, M.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. D- glucose feeding for improvement of xylitol productivity from D-xylose using *Candida tropicalis* immobilized on a non-woven fabric. *Biotechnology Letters*, v.18, n.12, p.1395-1400, 1996.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e ao apoio financeiro do CNPq.