

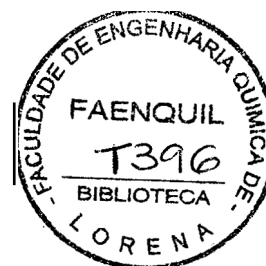


FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

ADAPTAÇÃO E RECICLAGEM DE CÉLULAS DE
Candida guilliermondii EM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR: EFEITO SOBRE AS ENZIMAS
XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE

Gilvane Souza de Matos



Lorena - SP - Brasil

2004

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

ADAPTAÇÃO E RECICLAGEM DE CÉLULAS DE
Candida guilliermondii EM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR: EFEITO SOBRE AS ENZIMAS
XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Banca Examinadora:

Prof³. Dr^a. Maria das Graças de Almeida Felipe (Presidente)

Profa. Dr^a. Luciana Sene

Profa. Ora. Rosa Helena Luchese

Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva

Estudante:

Gilvane Souza de Matos

Lorena - SP - Brasil

2004

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

ADAPTAÇÃO E RECICLAGEM DE CÉLULAS DE
Candida guilliermondii EM HIDROLISADO DE BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR: EFEITO SOBRE AS ENZIMAS
XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE

Este exemplar corresponde à
versão final da Tese de Doutorado
aprovada pela banca examinadora



Profa. Dr.ª. Maria das Graças de Almeida Felipe
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Lorena - SP - Brasil
2004

AGRADECIMENTOS

- À Dr^a. Maria das Graças de A. Felipe pela orientação e apoio constantes, pela dedicação, suporte científico e ensinamentos que proporcionaram minha estada em Lorena em um período de intenso aprendizado.

- À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

- À colega Rita de Cássia L.B. Rodrigues e às alunas Maysa Kondarzewski e Fernanda P. Bernardi pelo compartilhamento das discussões e publicações científicas assim como na realização dos experimentos.

- Ao Dr. Sílvio Silvério da Silva pelos ensinamentos, apoio e empréstimo de um dos Fermentadores KLF2000, tornando possível a realização dos experimentos com reciclo de células.

- À FAENQUIL, aos seus professores e funcionários pela oportunidade, estrutura e apoio que tomaram possível a realização deste trabalho. Um agradecimento em especial ao Paulo Roberto, Nicamor de Assis, José Carlos, Jussara Canilha, Isnaldi, Vlákíria, Cristina e Ludmila pelo constante apoio.

- Aos colegas de laboratório: Débora Silva, Marcelo Marton, Ely Cortez, Andréia Garcia, Giuliano Dtagone, Solange Mussatto, Walter Carvalho, Larissa Canilha, Júlio Santos, Mário Cunha, Tihany Morita, Francislene Hassman; aos "cornpañeros" cubanos Martha, Ernesto, Mabel e Zuzel e tantos outros que compõem uma extensa lista de amigos que colaboraram para a existência de um agradável ambiente de trabalho.

- À Fernanda e sua família pela acolhida em São Paulo, pelo carinho, apoio e incentivo.
- Aos meus pais, meu irmão e todos os tios e familiares que, mesmo de longe, participaram me apoiando e incentivando em todos os momentos.

BIOGRAFIA

Gilvane Souza de Matos, filho de Manoel Viegas de Matos e Éria Souza de Matos, nasceu em 28 de Março de 1972 em Osório - RS.

Em 1990 formou-se Auxiliar Técnico em Eletricidade na Escola Estadual de 1º e 2º Graus Prudente de Moraes de Osório - RS.

Em 1998 graduou-se Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

No ano de 2001 obteve o título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O tema da dissertação foi "Bioconversão de hemicelulose em xilitol a partir de fibra de soja".

No ano de 2001 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, nível de Doutorado, no Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena - SP.

CONTEÚDO

	Página
NOMENCLATURA	IV
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMIC>	XI
ABSTRACT	XII
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 - MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	3
2.2 - BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	4
2.3 - XILITOL	5
2.3.1 - Propriedades e aplicações do xilitol	5
2.3.2 - Ocorrência e obtenção do xilitol	8
2.3.3 - Fatores que afetam a produção biotecnológica de xilitol...	11
2.3.4 - Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	13
2.3.5 -As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)	16
3 - MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 - OBTENÇÃO E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	22
3.1.1 - Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar..	22
3.1.2 - Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar..	22
3.1.3 - Concentração do hidrolisado	23
3.1.4- Tratamento do hidrolisado	23
3.1.5- Preparação dos hidrolisados para as fermentações	24
3.2 - MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	26
3.2.1 - Microrganismo e manutenção da cultura	26
3.2.2 - Fermentação em meio semi definido (MS)	26
3.2.2.1 - <i>Preparo do inóculo</i>	26
3.2.2.2- <i>Condições de fermentação</i>	26

3.2.3 - Fermentações em hidrolisados a partir de inóculo não adaptado	28
3.2.3.1- <i>Preparo do inóculo</i>	28
3.2.3.2- <i>Condições de fermentação</i>	28
3.2.4 - Fermentações dos hidrolisados a partir de inóculo adaptado	28
3.2.4.1 - <i>Preparo do inóculo</i>	28
3.2.4.2- <i>Condições de fermentação</i>	28
3.2.5 - Fermentações com reciclo de células	30
3.2.5.1- <i>Preparo do inóculo</i>	30
3.2.5.2 - <i>Condições de fermentação</i>	30
3.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS	31
3.3.1 -Avaliação da viabilidade e pureza da cultura	31
3.3.2-Avaliação do crescimento microbiano	32
3.3.3 - Rompimento celular	32
3.3.4- Medida de atividade enzimática	32
3.3.5 - Determinação do teor de proteína	33
3.3.6 - Determinação das concentrações de açúcares, xilitol, etanol, glicerol e ácido acético	33
3.3.7 - Determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural...	34
3.3.8 - Determinação da concentração de fenóis totais	34
3.3.9- Determinação de pH e Grau Brix	35
3.3.10 - Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (KLa)	35
3.4 - DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS	36
3.4.1 - Fator de conversão de D-xilose em xilitol ($Y_{P/S}$)	36
3.4.2 - Produtividade volumétrica de xilitol (Q_p)	36
3.4.3 - Eficiência de conversão (η)	37
3.4.4- Formação de células em relação ao consumo de substrato ($Y_{X/S}$)	37
3.4.5 -Velocidade de Consumo	37
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS	38
4.2- FERMENTAÇÕES A PARTIR DE INÓCULO NÃO ADAPTADO	41
4.2.1 - Fermentação em meio semi definido (MS)	41
4.2.2- Fermentações em hidrolisados	44
4.3- FERMENTAÇÕES A PARTIR DE INÓCULO ADAPTADO	46

4.4 - EFEITO DA ADAPTAÇÃO DO INÓCULO NAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE.	61
4.5 - FERMENTAÇÕES COM RECICLO DE CÉLULAS	66
4.6 - EFEITO DO RECICLO DE CÉLULAS NAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE.	.78
5 - CONCLUSÕES	83
6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
8 - ANEXOS	99

NOMENCLATURA

Símbolo	Definição
XR	Xilose redutase
XDH	Xilitol desidrogenase
MS	Meio de cultura semi definido
H2N	Hidrolisado 2 vezes concentrado, não tratado
NC	Hidrolisado não concentrado
H2, H3, H4 e H5	Hidrolisados concentrados (fator de concentração = 2, 3, 4, e 5 vezes)
KL _a	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h ⁻¹)
Y _{Pts}	Fator de conversão de D-xilose em xilitol (g/g)
Q _p	Produtividade volumétrica de xilitol (g/L-h ⁻¹)
	Eficiência de conversão de xilose em xilitol (%), em relação ao valor teórico
	Fator de conversão de xilose em células (g/g)
	Produtividade volumétrica de células (g/L-h ⁻¹)
V	Velocidade de consumo de xilose ou arabinose ao longo do tempo (g/L-h ⁻¹)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, não concentrado e concentrados duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco vezes (HS)	38
Tabela 2 - Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar após o tratamento ou ajuste de pH	40
Tabela 3 - Parâmetros fermentativos observados durante fermentação de meio semi definido por <i>Candida guilliermondii</i>	44
Tabela 4 - Velocidades de consumo de xilose e arabinose, taxa de formação de células de <i>Candida guilliermondii</i> durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar	52
Tabela 5 - Eficiência de formação de xilitol em relação ao valor teórico durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	56
Tabela 6 - Parâmetros fermentativos observados durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	60
Tabela 7 - Atividade média da enzima xilose redutase de <i>Candida guilliermondii</i> durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar	65
Tabela 8 - Velocidades de consumo de xilose e arabinose, taxa de formação de células durante consecutivas fermentações com reciclo de células de <i>Candida guilliermondii</i> em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	70
Tabela 9 - Eficiência de conversão de xilose em xilitol em relação ao valor teórico durante consecutivas fermentações com reciclo de células de <i>Candida guilliermondii</i> em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	72

Tabela 10 -Atividade média das enzimas XR e XDH de <i>Candida guilliermondii</i> durante cinco fermentações consecutivas com reciclo de células em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	81
Tabela 11 - Assimilação de xilose durante fermentações de meio semi definido e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	99
Tabela 12 - Xilitol formado durante fermentações de meio semi definido e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	100
Tabela 13 - Rendimento de xilose em xilitol durante fermentações de meio semi definido e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	101
Tabela 14 - Produtividade volumétrica de xilitol durante fermentações de meio semi definido e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	102
Tabela 15 - Fator de conversão de o-xilose em células durante fermentações de meio semi definido e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	103
Tabela 16 - Produtividade volumétrica em células de <i>Candida guilliermondii</i> durante fermentações de meio semi definido e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar	104
Tabela 17 - Assimilação de xilose durante consecutivas fermentações com reciclo de células de <i>Candida guilliermondii</i> em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	105
Tabela 18 - Xilitol formado durante consecutivas fermentações com reciclo de células de <i>Candida guilliermondii</i> em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	105

- Tabela 19** - Rendimento de xilose em xilitol durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 106
- Tabela 20** - Produtividade volumétrica de xilitol durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 106
- Tabela 21** - Fator de conversão de o-xilose em células durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 107
- Tabela 22** - Produtividade volumétrica em células durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação das vias química e biotecnológica de obtenção de xilitol	10
Figura 2 - Metabolismo de glicose, xilose e arabinose em leveduras	19
Figura 3 - Reator de hidrólise ácida	22
Figura 4 - Etapas de hidrólise ácida, concentração e tratamento do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	25
Figura 5 - Reator KLF 2000	27
Figura 6 - Esquema de realização das fermentações empregando-se inóculos obtidos de células não adaptadas e adaptadas em diferentes níveis de concentração de hidrolisado	29
Figura 7 - Esquema de realização das fermentações com reciclo de células empregando-se inóculo adaptado	31
Figura 8 - Consumo de xilose, arabinose e glicose; formação de xilitol e massa celular durante fermentação de meio semi definido por <i>Candida guilliermondii</i>	42
Figura 9 - Formação de etanol e glicerol durante fermentação de meio semi definido por <i>Candida guilliermondii</i>	43
Figura 10 - Atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de <i>Candida guilliermondii</i> durante fermentação de meio semi definido	44
Figura 11 - Concentrações de xilose e xilitol durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	45
Figura 12 - Concentrações de xilose e xilitol durante fermentações de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i>	47
Figura 13 - Concentrações de glicose durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por <i>Candida guilliermondii</i> ...	49

- Figura 14** - Concentrações de arabinose durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii* Fermentações com inóculo adaptado e não adaptado 50
- Figura 15** - Massa celular durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*... 51
- Figura 16** - Rendimento do xilitol durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*... 54
- Figura 17** - Produtividade volumétrica do xilitol observada durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii* 55
- Figura 18** - Concentrações de ácido acético e variação de pH durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii* 57
- Figura 19** - Concentrações de etanol e glicerol durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii* 59
- Figura 20** - Atividade da enzima xilose redutase de *Candida guilliermondii* durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Fermentações com inóculo adaptado e não adaptado.... 62
- Figura 21** - Atividade da enzima xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Fermentações com inóculo adaptado e não adaptado 64
- Figura 22** - Assimilação de xilose e formação de xilitol durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 67
- Figura 23** - Assimilação de glicose e arabinose durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 68

- Figura 24** - Massa celular formada durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 69
- Figura 25** - Rendimento do xilitol (YP1s) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 71
- Figura 26** - Produtividade volumétrica do xilitol (Qp) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 73
- Figura 27** - Rendimento (YP1s) e produtividade volumétrica de xilitol (Qp) em fermentações com ou sem adaptação do inóculo ou reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 75
- Figura 28** - Concentrações de ácido acético e pH durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 76
- Figura 29** - Concentrações de etanol e glicerol durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 77
- Figura 30** - Atividades da enzima xilose redutase de *Candida guilliermondii* durante cinco fermentações consecutivas com reciclo de células em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar 79
- Figura 31** - Atividades da enzima xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* durante cinco fermentações consecutivas com reciclo de células em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar 80

RESUMO

Adaptação e reciclagem de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar; efeito sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase Gilvane Souza de Matos. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Ora. Maria das Graças de A. Felipe (Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Caixa Postal 116, 12600-970, Lorena, SP, Brasil). Banca Examinadora: Ora. Maria das Graças de A. Felipe, Ora. Luciana Sene, Ora. Rosa Helena Luchese, Dr. Ismael Maciel de Mancilha, Dr. Sílvio Silvério da Silva. Maio de 2004.

Diversas pesquisas têm focado a utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar como meio de cultivo para a produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. O xilitol é um poliálcool com poder adoçante semelhante ao da sacarose, anticariogênico, adequado para diabéticos e *obesos*, assim como para a prevenção de osteoporose e tratamento de doenças respiratórias. A fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos por leveduras é dependente das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), que participam das reações iniciais para a assimilação da xilose presente nestes hidrolisados. Diferentes compostos tóxicos presentes no hidrolisado como o ácido acético e compostos fenólicos são apontados como interferentes na bioconversão da xilose em xilitol e como determinantes da baixa produtividade deste adoçante, quando comparada à alcançada em meios sintéticos. Como forma de minimizar os efeitos dos compostos tóxicos do hidrolisado sobre a levedura foram avaliados o efeito da adaptação e reciclagem de células de *C. guilliermondii* sobre a formação de xilitol e atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase durante fermentações de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Os experimentos foram realizados em biorreator KLF2000 BioEngineering com volume útil de 1,6L a 30°C, pH 5,5 e KLa de 20h⁻¹. A máxima atividade da enzima XR (0,8327U/mgPRor) foi observada na fermentação do hidrolisado de maior fator de concentração (H5) sem a adaptação do inóculo, enquanto para a enzima XDH o máximo valor (0,4592U/mgPRor) foi encontrado na fermentação de hidrolisado com um menor fator de concentração (H4) e com a utilização do inóculo adaptado. O reciclo de células no hidrolisado de maior fator de concentração não resultou em aumento das atividades das enzimas XR e XDH, havendo inclusive tendência de queda ao longo das etapas de reciclo. No entanto, a utilização desta técnica melhorou tanto a produtividade (118%) como o rendimento (27,6%) do xilitol. Os subprodutos glicerol e etanol também foram observados durante o metabolismo de xilose por *C. guilliermondii*.

ABSTRACT

Adaptation and recycling of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hydrolysate effect on xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes. Gilvane Souza de Matos. Doctoral Thesis. Postgraduate Program in Industrial Biotechnology, Department of Biotechnology, Chemical Engineering College of Lorena. Supervisor: Dr Maria das Graças de A. Felipe (Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Caixa Postal 116, 12600-970, Lorena, SP, Brasil). Examining Board: Dr Maria das Graças de A. Felipe, Dr Luciana Sane, Dr Rosa Helena Luchese, Dr Ismael Maciel de Manci1ha, Dr Sílvio Silvério da Silva. May 2004.

Several researches have focused upon the utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate as a cultura medium for the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. Xylitol, a polyalcohol with a sweetening power similar to that of sucrose, is anticariogenic and suitable for diabetics and obesa people, as well as for the prevention of osteoporosis and for the treatment of respiratory diseases. The fermentation of hemicellulosic hydrolysates by yeasts is dependent on xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase enzymes (XDH), which participate in the initial reactions for the assimilation of xylose present in such hydrolysates. Different compounds also present in these hydrolysates, such as acetic acid and phenolic compounds, have been considered as regulators of the bioconversion of xylose into xylitol and as responsible for the low productivity of this sweetener, as compared to that obtained from synthetic media. The adaptation and recycling of *C. guilliermondii* cells were utilized as a way to minimize the effects of the toxic compounds on the formation of xylitol during the fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate. The activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes during the fermentations were evaluated. The experiments were carried out in KLF BioEngineering bioreactor with a volume of 1.6L, at 30°, pH 5.5 and KLa of 20h⁻¹. The maximum XR enzyme activity (0.8327U/mgPRor) was observed during the fermentation of hydrolysate with the highest concentration factor (H5) and without inoculum adaptation, while for XDH enzyme the maximum value (0.4592U/mgPRor) was provided by the hydrolysate with a lower concentration factor (H4), using adapted inoculum. Cell recycling in the hydrolysate with the highest concentration factor did not result in increased XR and XDH enzyme activities, which actually showed a tendency to decrease in the course of the recycling steps. Nevertheless, utilizing this technique enhanced both xylitol productivity (118%) and xylitol yield (27.6%). The byproducts glycerol and ethanol were found during the xylose metabolism of *C. guilliermondii*.

1 - INTRODUÇÃO

O aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol, um adoçante anticariogênico substituto de açúcares para diabéticos e obesos é uma das principais linhas de pesquisa do Departamento de Biotecnologia da FAENQUIL. Os trabalhos desenvolvidos pelo grupo têm demonstrado que o processo biotecnológico para a obtenção de xilitol apresenta-se como alternativa ao químico, via pelo qual este é comercialmente produzido a partir da catálise química da xilose obtida de materiais lignocelulósicos ricos em xilana. A obtenção de xilitol pela via química é considerada de elevado custo em função da necessidade da obtenção de uma solução de xilose com elevado teor de pureza, de forma a evitar que resíduos de lignina interfiram na catálise. Além disso, após a catálise da xilose em xilitol há a necessidade de etapas de purificação para a remoção do íon metálico (Ni) utilizado como catalisador.

A obtenção biotecnológica desse adoçante envolve a participação das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), induzidas na presença de xilose. O controle de parâmetros que possam interferir na indução e/ou atividade destas enzimas é muito importante, principalmente nas fermentações de hidrolisados hemicelulósicos, uma vez que nestes, estão presentes, além dos açúcares, compostos tóxicos à levedura, em particular o ácido acético e fenóis, os quais podem ser inibitórios à atividade das enzimas e acarretar em baixa produtividade do xilitol quando comparada à obtida em meio semi definido. A necessidade da concentração do hidrolisado para a obtenção de meios com elevadas concentrações de xilose pode promover também a concentração de compostos tóxicos que também podem ter seus efeitos potencializados em função da ação sinérgica entre eles. Neste sentido, a precipitação de inibidores pela alteração de pH, combinada à adsorção em carvão ativo são alternativas capazes de promover a remoção parcial destes inibidores, no entanto, o hidrolisado tratado ainda pode apresentar concentrações de ácido acético e fenóis capazes de

interferir no metabolismo dos microrganismos. Técnicas como a adaptação e reciclagem de células ao hidrolisado são apresentadas como forma de contornar o problema da toxicidade destes inibidores ao processo fermentativo.

Neste trabalho foi avaliado o metabolismo envolvendo a bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em diferentes concentrações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente foram realizadas fermentações em hidrolisados com diferentes fatores de concentração utilizando-se como inóculo células não adaptadas e adaptadas ao hidrolisado. Na etapa seguinte foram realizadas fermentações utilizando-se o inóculo com células adaptadas ao hidrolisado, sendo estas células recuperadas e utilizadas como inóculo durante consecutivas fermentações. As fermentações foram realizadas no sentido de avaliar o efeito das técnicas de adaptação do inóculo e reciclagem de células no hidrolisado sobre a produção de xilitol e atividades específicas das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos constituem uma das principais e mais abundantes fontes de matéria orgânica no planeta (GHOSH e SINGH, 1993; CHANDRAKANT e BISARIA, 1998). O interesse em pesquisas que visam a conversão de materiais lignocelulósicos provenientes do processo industrial, em produtos que possuam um valor comercial vem sendo demonstrado em diversos trabalhos que têm proposto a utilização de hidrolisados destes resíduos para o cultivo de microrganismos (DOMINGUEZ et al., 1996; ALVES et al., 1998; CHANDRAKANT e BISARIA, 1998; RODRIGUES et al., 1998, 2003). A facilidade de obtenção e a grande abundância destes materiais na natureza são vantagens que permitem sua utilização como substrato de baixo custo para a produção de produtos com grande interesse econômico (LEE, 1997).

Segundo FENGEL E WEGENER (1989) os materiais lignocelulósicos são formados por lignina e polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose). A lignina é uma macromolécula complexa composta por unidades de fenil-propanol; a celulose, um polímero não ramificado de moléculas de α -D-glicose, unidas por ligações do tipo β -1,4 enquanto que a hemicelulose, um polímero heterogêneo, contendo diversos tipos de açúcares como α -D-xilose, L-arabinose e α -D-manose.

A estrutura da hemicelulose é bastante semelhante à da celulose, onde moléculas de açúcares, unidos por ligações do tipo β -1,4 constituem a estrutura polissacarídica principal (DELAZARI, 1980; GONG et al., 1981), sendo esta, por sua vez, ligada a uma série de açúcares reiduais, que podem ser o mesmo ou diferentes daqueles que constituem a cadeia principal (GONG et al., 1981). A xilose é o principal constituinte da hemicelulose, constituindo aproximadamente 80% desta fração (KUHAD, 1993).

2.2 - BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma produção anual em torno de 300 milhões de toneladas, representando 33% da produção mundial (VASCONCELOS, 2002). Na safra 2002/2003 o país produziu 321,6 milhões de toneladas e a previsão para a safra 2003/2004 é de 343,7 milhões de toneladas, um aumento de 6,9% na produção (SEVERO, 2004).

O bagaço de cana-de-açúcar apresenta em sua composição aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000), constituindo em um importante resíduo gerado pelo setor sucroalcooleiro. A maior parte do bagaço gerado na indústria sucroalcooleira vem sendo utilizada na geração de energia na própria indústria. Cerca de 80% da eletricidade consumida pelas indústrias do setor é gerada pela combustão do bagaço, embora sua utilização apresente baixo rendimento energético (1300 Kcal/Kg) (DUARTE, 1989).

A geração de energia por meio da queima do bagaço produzido pela indústria fica em torno de 1,5 mil megawatts, e, acredita-se que poderá chegar a 5 mil megawatts em médio prazo (RIVERAS, 2001). Além desta, outras formas de utilização do bagaço de cana-de-açúcar têm sido empregadas como para a produção de polpa de papel e produtos aglomerados, produção de furfural e carvão ativo, sendo considerado também um produto de grande importância na alimentação animal (MITRANI et al., 1999).

Uma parceria entre a FAPESP, Grupo Denini e a Copersucar apresentou uma nova alternativa onde, a partir da hidrólise do bagaço, será possível aumentar em 30% a produção nacional de etanol (PESQUISA FAPESP, 2004). Esta alternativa para o reaproveitamento do bagaço para a produção de etanol abre perspectivas também para o reaproveitamento da palha de cana na geração de energia em lugar do bagaço. Atualmente a palha é queimada ou deixada no campo e, caso venha a substituir o bagaço, o potencial estimado na geração de energia é

de 50% da palha produzida no campo, o que corresponde a cerca de 70 milhões de toneladas/ano no Brasil (VASCONCELOS, 2002).

ROSSI et al. (2003) avaliaram o potencial da utilização do bagaço de cana-de-açúcar como substrato no cultivo de cogumelos comestíveis. Segundo os autores, o bagaço de cana apresenta potencial para o cultivo de cogumelos comestíveis sendo os melhores resultados obtidos em uma mistura de bagaço enriquecido com 25% de farelo de arroz e 6% de melaço, produzindo frutificações de *Lentinula edodes* (shiitake) com 7cm de diâmetro em um período de 60 a 90 dias de incubação.

Apesar das várias utilizações do bagaço de cana, a abundância e o baixo custo desta matéria-prima justificam sua utilização em diversos processos biotecnológicos na obtenção de produtos com alto valor agregado como o xilitol (FELIPE et al., 1997b; ALVES et al., 1998; RODRIGUES, 2001).

2.3 - XILITOL

2.3.1 - Propriedades e aplicações do xilitol

O xilitol é um poliol natural de cinco carbonos, com poder adoçante equivalente ao da sacarose (DELAZARI, 1980), sendo utilizado na indústria de alimentos, podendo, em alguns casos, ser substituído em alimentos na mesma proporção (RUSSO, 1976).

Devido ao calor específico em solução negativo (-34,8 cal/g), o xilitol apresenta sabor residual refrescante, semelhante ao que ocorre com o manitol e também observado em outros polióis, embora em menor grau (DELAZARI, 1980; AGUIAR et al., 1999).

Por não apresentar grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, o xilitol não participa de reações do tipo Maillard, podendo ser utilizado em alimentos em que reações de escurecimento não são desejadas e que necessitam ser processados em altas temperaturas (MANZ et al., 1973).

EMODI (1978) destaca o uso potencial do xilitol para alimentos como pães e bolos, geléias e marmeladas, ou na forma de aditivo ou adjuvante de sabor. Segundo o autor, o xilitol não é utilizado por muitos microrganismos, portanto os alimentos que contém este açúcar podem apresentar um maior tempo de conservação.

Pelo fato de não ser utilizado pelos microrganismos normalmente encontrados na flora bucal, como bactérias do gênero *Streptococcus*, o xilitol é considerado como substância não cariogênica e sua utilização permite que o pH da superfície dos dentes não atinja valores inferiores a 5,7 (EMODI, 1978). Segundo BADET et ai. (2004), a adaptação de linhagens de microrganismos da flora bucal ao xilitol pode ocorrer com um prolongado período de exposição do microrganismo a este poliál. O controle do pH bucal pela utilização do xilitol reduz a incidência de formação de placa dentária (BRADSHAW e MARSH, 1994), além disto o xilitol também atua como agente que contribui para a remineralização dos dentes (TANZER, 1995).

O xilitol também é considerado como anticariogênico (TANZER, 1995; EDGAR, 1998), sendo superior ao sorbitol na prevenção de cáries, reduzindo sua incidência entre 30 e 63% (GALES e NGUYEN, 2000; ALANEN et ai. 2000).

O metabolismo do xilitol ocorre independente de insulina, podendo ser utilizado na dieta de pacientes diabéticos (SILVA et ai., 1993;194). Em trabalhos em que foram comparadas dietas com xilitol ou glicose, verificou-se que o xilitol provocou uma fraca resposta hormonal, com baixos níveis de insulina e de glicose no plasma sanguíneo (NATAH et ai., 1997). Este adoçante é considerado como substância atóxica, permitida como aditivo em alimentos, e também como substância "GRAS" (*Generally Regarded as Safe*) pelo *Food And Drug Administration* dos Estados Unidos e permitido para a dieta de diabéticos, segundo o *Codex Alimentarius* (AGUIAR et ai., 1999).

Até há poucos anos, as principais aplicações do xilitol encontravam-se relacionadas à indústria de alimentos, devido às suas propriedades que permitem

o emprego deste adoçante em alimentos que necessitam ser processados em altas temperaturas e não se deseja que ocorram reações de Maillard (MANZ et al., 1973). Também é relatada a aplicação na dieta de deficientes na produção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (VAN EYS et al., 1974), de diabéticos e obesos (NATAH et al., 1997; AGUIAR et al., 1999), assim como aplicações odontológicas, ligadas à propriedades não-cariogênicas e anticariogênicas deste adoçante (TANZER, 1995).

Nos últimos anos, novas aplicações clínicas do xilitol têm sido descritas, como, por exemplo, utilização na prevenção de osteoporose, demonstrada por MATILLA et al. (1998). Segundo os autores, experimentos com ratos evidenciaram que a administração oral de xilitol impede a progressão da osteoporose proporcionando aumentos da massa óssea e das propriedades biomecânicas de ossos enfraquecidos, apontando ainda que, a utilização de xilitol torna-se uma nova alternativa que amplia os tratamentos clínicos na prevenção desta doença.

Outra aplicação clínica do xilitol, apontada por ZABNER et al. (2000), consiste na utilização deste adoçante no tratamento de fibrose cística, uma doença que afeta principalmente os pulmões e o sistema digestivo. Segundo MALTA (2001) existem evidências de que a maior sobrevida dos afetados por fibrose cística ocorre por meio do tratamento das complicações pulmonares, sendo empregados medicamentos importados a um custo médio de US\$ 36 dólares a ampola. Para um tratamento de 15 dias, a média utilizada é de 100 ampolas. Zabner et al. (2000) constataram que o uso inalatório do xilitol em "spray" resultou na diminuição da concentração salina da camada superficial da membrana respiratória, favorecendo a imunidade inata desta superfície e, como consequência, reduzindo o número de *Staphylococcus* coagulase-negativa na cavidade nasal de voluntários, diminuindo o risco de infecções bacterianas pulmonares. Desta forma, como no caso da osteoporose, o xilitol apresenta-se como uma alternativa promissora às atuais empregadas para o controle da fibrose cística.

O xilitol tem a sua eficácia também comprovada no tratamento de pacientes com otite pelo fato deste inibir o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* impedindo a adesão desta bactéria sobre as células nasofaríngeas (UHARI et al., 2001, TAPIAINEN et al., 2002). Esta propriedade foi observada em experimentos clínicos em crianças, onde o xilitol mostrou-se eficaz na prevenção do desenvolvimento de otite com a utilização de uma dose variando entre 8,4 a 10g/dia dividida em cinco porções. Nestes experimentos obteve-se uma eficácia de aproximadamente 40% e 30%, quando o xilitol foi empregado na forma de goma de mascar e xarope, respectivamente. Estes autores observaram ainda que o uso de xilitol na prevenção de otite reduziu consideravelmente a utilização de antibióticos empregados no tratamento, contribuindo para a redução de um problema mundial, que é a resistência de bactérias a agentes antimicrobianos causada justamente pelo uso descontrolado dos mesmos.

2.3.2 - Ocorrência e obtenção do xilitol

O xilitol é encontrado em pequenas quantidades em frutas, vegetais e fungos (RUSSO, 1976; DELAZARI, 1980), mas a sua extração diretamente destas fontes não é economicamente viável, uma vez que ocorre em baixas concentrações (HYVÖNEN et al., 1982; SILVA et al., 1993). É também produzido pelo metabolismo humano na proporção de 5 a 15 gramas por dia, sendo encontrado no sangue na faixa de 0,03-0,06mg/100ml (PEPPER e OLIGER, 1988 citados por PARAJÓ et al., 1998a). O xilitol é comercialmente produzido por via química, sendo a Finnish Sugar Co. Ltd., Helsink, Finlândia a precursora da produção (HYVÖNEN et al., 1982).

Obtenção por via química

Para a produção química de xilitol, inicialmente é necessária a hidrólise de material vegetal rico em xilana, para a obtenção de uma solução de xilose pura, um processo que exige a clarificação e purificação em sucessivas etapas de troca

iônica em cromatografia líquida, tanto para a purificação da xilose obtida como para a obtenção do produto final (PARAJÓ et al., 1998a). A etapa inicial de purificação do hidrolisado consiste em um processo químico que permite a recuperação somente de 50 a 60% da xilose (NIGAM e SINGH, 1995), além das perdas na etapa de remoção de resíduos do catalisador para a purificação do produto final (PARAJÓ et al., 1998a).

Obtenção por via biotecnológica

Devido ao alto custo de obtenção de xilitol pela via química, o processo biotecnológico, a partir do hidrolisado hemicelulósico, parece ser uma alternativa viável para a redução de custos (PARAJÓ et al., 1998a). A **Figura 1** apresenta um esquema comparativo entre estas duas vias de obtenção de xilitol.

A levedura *C. guilfermondii*, selecionada por BARBOSA et al. (1988) tem sido relatada como organismo com maior capacidade de metabolizar a xilose em xilitol, apresentado uma produção com eficiência de 81% e uma baixa produção de etanol.

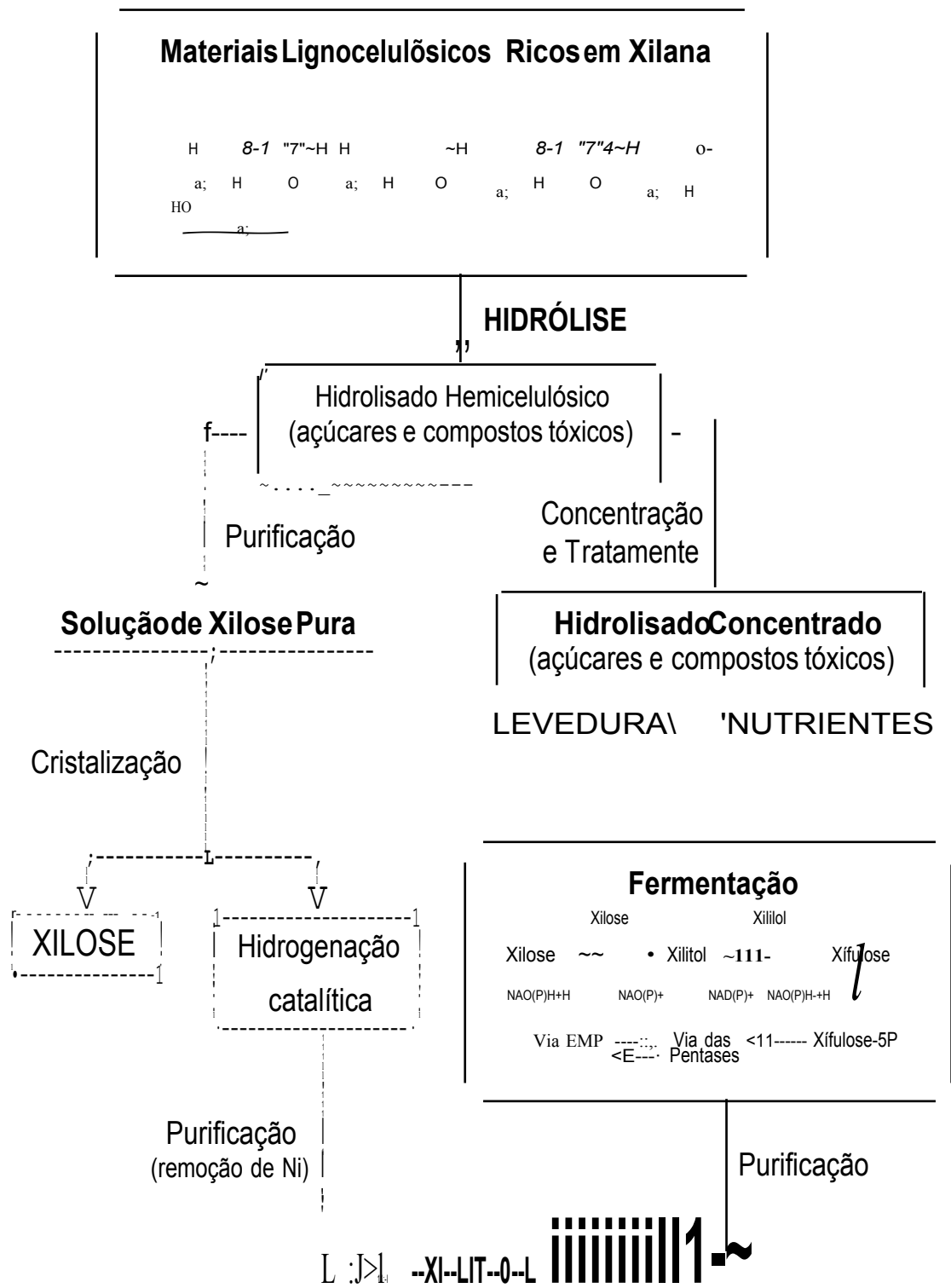


Figura 1 - Comparação das vias química (- - -) e biotecnológica (-) de obtenção de xilitol baseada em MEJALA e HÄMÄLÄÄINEN, 1977 e ARISTIDOU e PENTTILÄ, 2000.

2.3.3 - Fatores que afetam a produção biotecnológica de xilitol

A obtenção microbiológica de xilitol é dependente da capacidade da levedura em induzir as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, responsáveis pela etapa inicial de assimilação da xilose, como também da concentração e idade do inóculo inicial, concentração inicial de xilose, pH do meio, disponibilidade de oxigênio, temperatura e presença de o-glicose como ao-substrato, dentre outros.

Segundo FELIPE et ai. (1997b) a utilização de inóculo de *Candida guilliermondii* obtido a partir de células jovens (16-24h) na concentração de 0,1 a 3,0g/L, favoreceu a bioconversão de xilose em xilitol, em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, sendo o nível de inóculo dependente da concentração de substrato e condição de aeração do meio de fermentação.

SILVA e AFSCHAR (1994) destacam que uma alta concentração inicial de xilose é um dos principais fatores capazes de incrementar a produção de xilitol. Níveis de 10 a 50g/L de xilose inicial favoreceram a formação de massa celular em *C. guilliermondii*, cultivada em meio sintético, enquanto que a maior produção de xilitol foi obtida quando utilizou-se 300g/L de xilose inicial (MEYRIAL et ai., 1991). No entanto, quando *C. guilliermondii* foi cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, a concentração de xilose que favoreceu tanto o rendimento quanto a produtividade de xilitol foi de 54g/L (FELIPE et ai., 1997b). Segundo estes autores, valores acima destes não foram favoráveis à produção de xilitol, em função da presença de compostos tóxicos não voláteis, que têm seu teor aumentado durante a concentração do hidrolisado.

Segundo FELIPE et ai. (1997b) o pH é um dos principais parâmetros a ser considerados, principalmente quando da utilização de meios formulados à base de hidrolisados lignocelulósicos, devido à presença de ácido acético, cuja toxicidade está relacionada à forte acidez do meio. SILVA et ai. (1998) encontraram que o pH ótimo para a produção de xilitol é dependente da característica e da tolerância da levedura ao hidrolisado, sendo observado valores entre 3,0 e 5,8 como ótimos, dependendo da levedura. RODRIGUES et ai. (2003) avaliaram a produção de

xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em pH controlado, sendo a condição de pH 5,5 como mais favorável.

De acordo com FURLAN et al. (1991), uma quantidade limitada de oxigênio é necessária para a formação de xilitol. Segundo VANDESKA et al. (1995), sob condições limitadas de oxigênio, ocorre desequilíbrio entre as concentrações de NADH e NAD⁺, cofatores das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase respectivamente, favorecendo a produção de xilitol. Segundo PARAJÓ et al. (1996), a formação de xilitol por *Debaryomyces hansenii* foi maior em condição limitada de oxigênio. Resultados semelhantes também foram observados no cultivo de *C. guilliermondii* (BARBOSA et al., 1988) e *Candida mogii* ATCC 18364 (SIRISANSANEEYAKUL et al., 1995).

BARBOSA et al. (1988) observaram que a produção de xilitol por *C. guilliermondii* em meio sintético atingiu o seu máximo em temperaturas de 30 e 35°C. SENE et al. (2000), encontraram para esta levedura, cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, o favorecimento do rendimento do xilitol com um aumento da temperatura de 25 para 35°C.

Outro parâmetro a ser considerado é a presença de glicose como co-substrato, uma vez que esta exerce efeito inibitório na bioconversão de xilose em xilitol, dependendo da concentração no meio (FELIPE et al., 1993). Estes autores constataram que, em concentrações acima de 10% do teor de xilose presente no meio, houve diminuição dos valores de produtividade e rendimento do xilitol por *C. guilliermondii*. Segundo LEE et al. (1996), a assimilação de xilose por *C. guilliermondii* está sujeita à repressão catabólica exercida pela glicose sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, no entanto SILVA et al. (2004) demonstraram que esta repressão depende da relação de glicose/xilose. Segundo os autores uma relação de glicose correspondendo a 1/5 da concentração de xilose favorece a formação de xilitol por *C. guilliermondii*.

Segundo PARAJÓ et al. (1998a), a composição do hidrolisado utilizado no cultivo de microrganismos, depende das características do material vegetal e das

condições de hidrólise utilizadas. Diferentes tipos de matéria prima têm sido utilizadas como matéria-prima para a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos, com vistas à produção biotecnológica de xilitol. Dentre estes destaca-se cavacos de eucalipto (FELIPE et ai., 1996; PARAJÓ et ai., 1996; CANNETIERI et ai., 2002), bagaço de cana de açúcar (FELIPE et ai., 1997b; NIDETZKY et ai., 1998; OH e KIM, 1998; ALVES et ai., 1998; CARVALHO et ai., 2004), palha de arroz (MAYERHOFF et ai., 1998; ROBERTO et al., 1996, 2003), sabugo de milho (KIM et ai., 1999a), fibra de soja (MATOS, 2001) e palha de trigo (CANILHA, 2002).

2.3.4 - Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

A hidrólise ácida da fração hemicelulósica de bagaço de cana-de-açúcar tem sido empregada para obtenção do hidrolisado e produção de xilitol. A utilização de ácido sulfúrico diluído (100mg/g matéria seca) a 140°C por 20 minutos, foi estabelecida por PESSOA JR. et ai. (1997) como condição ideal para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, liberando 83,3% da xilose da fração hemicelulósica.

RODRIGUES et ai. (2001 a), caracterizaram o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e constataram que o ácido acético está presente em maior concentração (3,38g/L), estando presentes também, em concentrações inferiores a 0,1g/L, o furfural, hidroximetilfurfural, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanílico, assim como também enxofre, alumínio, níquel, cromo, ferro, cálcio, potássio, manganês, magnésio, zinco, entre outros.

O efeito da concentração de furfural parece interferir no metabolismo de açúcares, assim como na bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, quando em concentrações acima de 1,0g/L (OJAMO et ai., 1988).

Segundo FELIPE et ai. (1995), dentre os compostos tóxicos presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, o ácido acético é apontado como o principal inibidor da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, sendo tolerado pela levedura quando em concentrações inferiores a 3,0g/L.

Em função da toxicidade do hidrolisado de bagaço à levedura, diferentes tratamentos têm sido empregados antes da sua utilização como meio de cultura, destacando-se os tratamentos com resinas de troca iônica (GHOSH e SINGH, 1993), com bases e ácidos (FELIPE et al., 1997a), combinação de bases e ácidos com carvão ativo (ALVES et al., 1998). Este último tratamento é influenciado pelo tipo de carvão ativado, principalmente quanto às características de porosidade e adsorção, às quais interferem na clarificação do hidrolisado de bagaço de cana, bem como na redução da concentração de ácido acético, fenóis totais, furfural e hidroximetilfurfural (MARTON et al., 2000).

Tem sido observado também que o processo de concentração a vácuo do hidrolisado para elevar o teor inicial de xilose propicia também a redução da concentração de compostos voláteis, embora aumente o teor dos não voláteis (PARAJÓ et al., 1998b; RODRIGUES, 1999). Segundo RODRIGUES et al. (2001b), a etapa de concentração deve ser realizada antes do tratamento do hidrolisado, por favorecer a redução da concentração destes compostos, em comparação com a encontrada no hidrolisado onde a concentração ocorre posterior ao tratamento.

Com relação aos tratamentos realizados para minimizar os efeitos dos compostos tóxicos como ácido acético e fenóis, MARTON et al. (2003) avaliaram as condições de adsorção de sete diferentes marcas de carvões ativos no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Dentre os fatores avaliados (temperatura, tempo de contato, agitação, pH e concentração de carvão), os autores apontam a concentração de carvão como o parâmetro mais importante na remoção de ácido acético, fenóis, furfural e hidroximetilfurfural. O carvão ativo da marca Sinth promoveu uma perda de 18,8% da xilose presente no hidrolisado, o que não é desejado, enquanto que os demais carvões testados apresentaram perdas entre 9,5 e 12,8%.

Outra forma de contornar o problema da toxicidade do hidrolisado à levedura é a utilização de células adaptadas ao hidrolisado (CHEN e GONG, 1985;

AMARTEY e JEFFRIES, 1996; FELIPE et ai., 1996; SENE et al.1998, 2001; CARVALHO et ai., 2002). AMARTEY e JEFFRIES (1996), demonstraram que o tratamento do hidrolisado de palha de milho com carvão ativo e a utilização de células de *Píchia stípítis* adaptadas ao hidrolisado favoreceram a produção de xilitol. Segundo estes autores, a utilização de açúcares foi de 18% no hidrolisado não tratado, 82% em hidrolisado tratado e de 90% quando utilizou-se células adaptadas na fermentação do hidrolisado tratado, verificando-se o aumento do rendimento de 0,21g/g para 0,32g/g em hidrolisado tratado. Os autores ainda destacam a reciclagem de células adaptadas como a forma mais barata para aumentar a produtividade do xilitol, comparando-se com o uso de técnicas de remoção dos compostos inibidores do hidrolisado.

SENE et ai. (1998), constataram que houve um aumento de 46% e 50% no rendimento e produtividade de xilitol respectivamente, quando o inóculo de *C. guilliermondii* foi obtido de células adaptadas no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, utilizado como meio de fermentação, em relação à fermentação com células não adaptadas. Os autores também observaram que quanto mais concentrado o hidrolisado utilizado no cultivo, maior a necessidade da utilização de células adaptadas.

O cultivo contínuo, semi contínuo ou a reutilização de células em sucessivas fermentações são técnicas utilizadas como forma de adaptação celular ao hidrolisado hemicelulósico e uma alternativa para a melhoria dos parâmetros fermentativos para a produção de xilitol. O cultivo contínuo da levedura *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi demonstrado por MARTÍNEZ et ai. (2003) com uma conversão de xilose em xilitol de 0,68g/g e produtividade de 0,68g/L-h-1, enquanto SILVA et ai. (2003), utilizando método semi contínuo com células desta levedura imobilizadas em pérolas de vidro poroso obtiveram parâmetros de rendimento 0,57g/g e produtividade de 0,609/Lh-1.

O favorecimento da formação de xilitol pela reutilização de células de *C. guilliermondii* em sucessivas fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi demonstrado por SENE et ai. (1998) e CARVALHO et ai. (2003). SENE et ai. (1998) observaram uma melhoria de 15% na formação de xilitol por *C. guilliermondii* pela reutilização de células durante quatro consecutivas fermentações em batelada do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar enquanto que CARVALHO et ai. (2003) avaliaram a reutilização de células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em alginato de cálcio durante cinco consecutivas fermentações em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. A conversão de xilose em xilitol obtida foi de 0,68g/g, com formação de xilitol na taxa de 0,6g/Lh⁻¹, correspondendo em melhoria de 2,3% ao longo do reciclo.

2.3.5 - As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)

A bioconversão de xilose em xilitol envolve a atividade das enzimas xilose redutase (aldose redutase EC 1.1.1.21) e xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9) (SENE et ai.; 2000). Segundo LEE (1998), a enzima xilose redutase é encontrada em animais e fungos, sendo demonstrado que em fungos está presente no citoplasma, catalisando o primeiro passo do metabolismo da xilose.

A xilose redutase (XR) de várias leveduras e outros fungos foram purificadas e parcialmente caracterizadas. A maior parte destas enzimas são monoméricas, com peso molecular variando de 33 a 40Koa, conforme ocorre com a xilose redutase de *Pachysolen tannophilus* (DITZZELMÜLLER et ai., 1984; BOLEN et ai., 1986). Contudo, a enzima XR de *Píchia stípitis* (RIZZI et ai., 1988) e *Candida tropicalis* (YOKOHAMA et ai. 1995) consistem de duas subunidades idênticas. A natureza da interação das duas subunidades ainda não é conhecida. Segundo WEBB (1992), não há nenhuma evidência de interação alostérica durante a redução da xilose pela xilose redutase de *P. stípitis*.

Com relação à xilitol desidrogenase (XDH), YANG (1990), ao purificar esta enzima de *Candida shehatae*, verificou que ela apresentou um peso molecular de 82KDa na sua forma nativa e de 40KDa na forma desnaturada, indicando que a xilitol desidrogenase, de modo semelhante à xilose redutase, é também composta por duas subunidades. Segundo RIZZI et al. (1988), a xilitol desidrogenase de *P. stipitis* apresentou peso molecular de 63 kDa e suas subunidades, 32 KDa.

BOLEN e DETROY (1985) demonstraram que tanto a presença de D-xilose, L-arabinose e D-galactose foram capazes de induzir a produção das enzimas XR e XDH de *P. tannophilus*, indicando que a produção destas é induzida pela presença do substrato. Segundo KERN et al. (1997), a D-xilose e L-arabinose foram identificadas como as melhores indutoras da enzima XR de *Candida tenuis*, em comparação com outras pentoses, hexoses e álcoois. A atividade da enzima XDH foi significativamente induzida pela D-xilose, L-arabinose e D-lixose. Ainda em relação às enzimas de *C. tenuis*, quando cultivada em D-xilose verificou-se que este açúcar foi capaz de induzir ambas as enzimas (XR e XDH) com a mesma intensidade.

Quando *C. tenuis* foi cultivada em meio contendo D-glicose e D-xilose, foi observado o consumo seqüencial dos açúcares, observando-se ainda que as atividades das enzimas XR e XDH permaneceram constantes enquanto a glicose, primeiro açúcar a ser consumido, esteve presente no meio (KERN et al., 1997). Os resultados indicam que houve a repressão catabólica exercida pela glicose na atividade das enzimas.

Segundo LEE et al. (1996) a D-xilose foi o açúcar que proporcionou a melhor atividade das enzimas XR e XDH de *C. guilliermondii*, sendo de 92% e 94% respectivamente. Ao avaliarem influência da presença de outros açúcares em mistura com a xilose na indução dessas enzimas esses autores constataram que a D-manose, D-glicose e D-frutose atuam como interferentes na indução enzimática.

Além da capacidade do microrganismo induzir, na presença de xilose, as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, a obtenção de xilitol a partir de

conversão biotecnológica da xilose é dependente da disponibilidade dos cofatores NADH₂ e NAD⁺ nas suas formas fosfatadas ou não. Durante o metabolismo da xilose, inicialmente a enzima xilose redutase (XR) reduz a xilose a xilitol, utilizando o NADH, na forma fosfatada ou não, como cofator. Posteriormente o xilitol formado é convertido à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), utilizando o NAD⁺ como cofator. A xilulose formada pode então ser utilizada para o crescimento celular entrando na via das pentoses, na forma de xilulose-5-fosfato, utilizando o ATP como cofator (KIM et al., 1999b). A xilulose-5-P poderá ser convertida em piruvato através da conexão da vias fosfopentoses com a via Embden-Meyerhof-Parnas, conforme esquema demonstrado na **Figura 2**.

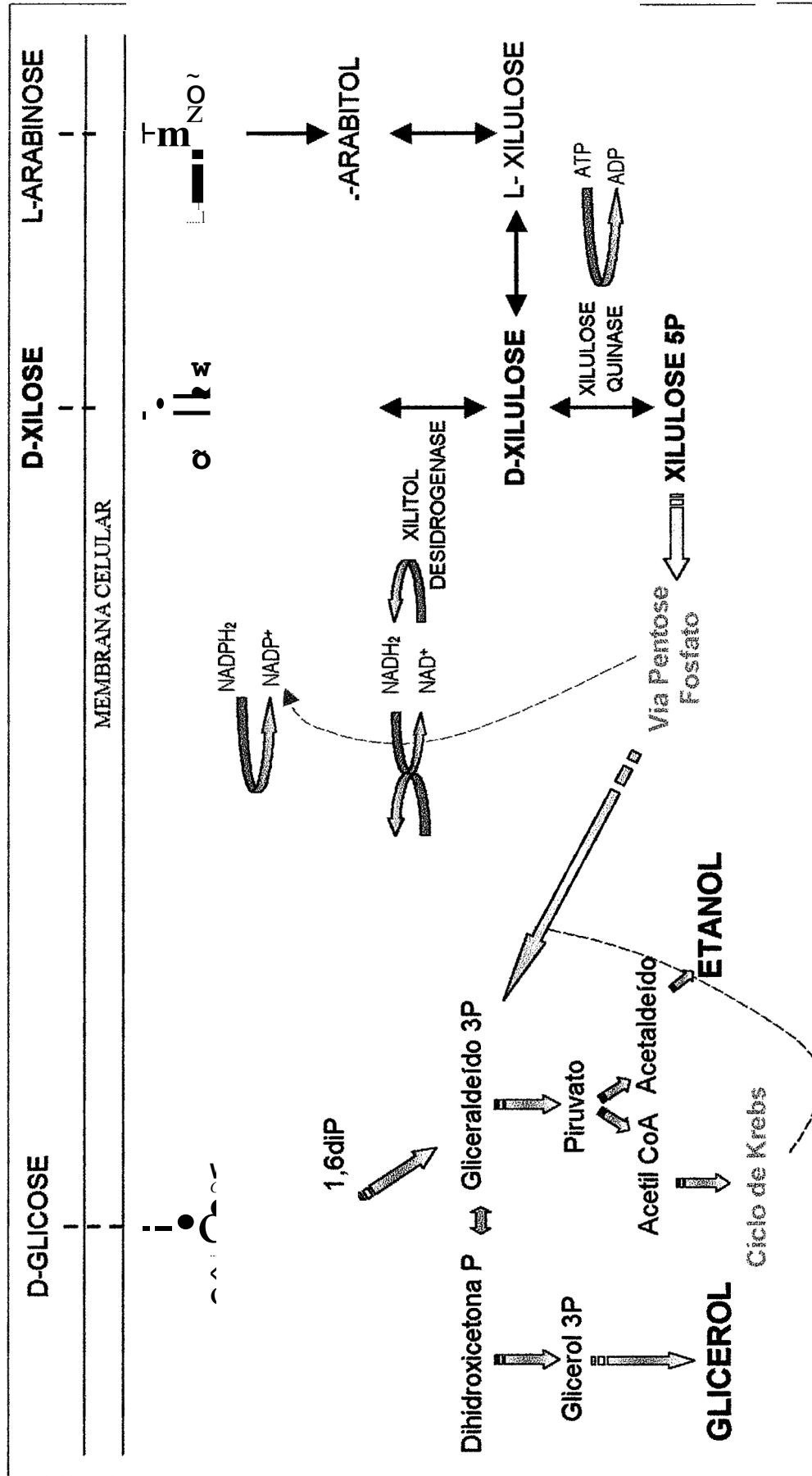


Figura 2 – Metabolismo de glicose, xilose e arabinose em leveduras (adaptado de WALKER)

Segundo THONART et ai. (1987), em leveduras o metabolismo da xilose ocorre pela via das fosfopentoses, onde a subsequente oxidação da glicose-6-fosfato regenera 2 mol de NAD(P)H/mol CO₂ liberado, regenerando o NAD(P)⁺ necessário para a redução da xilose a xilitol. A produção de xilitol em leveduras está relacionada com a disponibilidade de NAD(P)H, sendo que a falta de NADH em condições de anaerobiose, levam ao acúmulo de xilitol pela célula (ROSEIRO et ai., 1991). A excreção de xilitol para o meio de cultura tem sido relatada em leveduras quando estas são cultivadas em baixas taxas de aeração, onde o NADH não pode ser oxidado a NAD, com isto, evitando a oxidação do xilitol à xilulose (SENE et ai., 2000).

Segundo SILVA et ai. (1996), o acúmulo de xilitol no citoplasma de *C. guilliermondii* e sua decorrente excreção no meio de cultivo pode também ser explicado pelo fato do Km da enzima XR ser quatro vezes menor que o da enzima XDH, o que indica maior afinidade da enzima XR pelo substrato. DITZELMÜLLER et ai. (1984), também ressaltam que os altos rendimentos do xilitol obtidos com a levedura *P. tannophilus* pode ser explicado, pela baixa afinidade da enzima XR (Km 470 mM) em relação à XDH (Km 70 mM) pelo xilitol.

As condições de cultivo podem afetar a atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. SENE et ai. (2000), avaliaram a atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *C. guilliermondii*, variando-se o pH (2,5 a 7,0) e temperatura (25 e 35°C) do meio de cultivo. A atividade máxima da enzima XR foi observada a 35°C, em uma faixa de pH entre 4,0 e 6,0. A maior produtividade de xilitol foi observada a 35°C, em pH 6,0. A maior atividade da enzima XDH foi observada em pH 6,5 a 35°C.

Segundo SILVA et ai. (1996), as maiores atividades das enzimas XR e XDH de *C. guilliermondii* ocorreram quando a concentração de xilose no meio foi em uma faixa de 70 a 1709/L. No entanto, outros parâmetros como aeração, podem interferir na disponibilidade de cofatores no meio, interferindo também na atividade

das enzimas envolvidas no processo de assimilação da xilose e conversão em xilitol (GÍRIO et ai., 1996).

Segundo ALVES et ai. (2002) existe relação entre a concentração de inibidores com o fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, sendo estes fatores relacionados à queda nas atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *C. guilliermondii* durante a fermentação destes hidrolisados.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

3.1.1 - Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço, proveniente da Usina Guarani, Olímpia-SP, teve seu teor de umidade determinado com a finalidade de estabelecer a quantidade de ácido utilizada para a hidrólise ácida (100mg de H₂SO₄/g matéria seca, diluição com relação sólido/líquido de 1/10). Para a determinação do teor de umidade, uma amostra do bagaço foi coletada e seca em estufa a 105°C até peso constante.

3.1.2 - Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada nas instalações da planta piloto de hidrólise ácida da Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL, em reator de aço inox 316, com volume total de 250L, equipado com camisa de óleo térmico para aquecimento indireto por resistência elétrica (**Figura 3**).

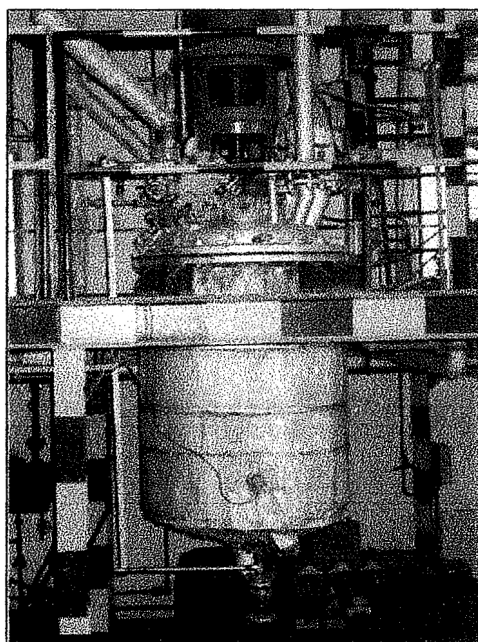


Figura 3 - Reator de hidrólise ácida com capacidade volumétrica total de 250 litros.

A hidrólise foi realizada conforme metodologia estabelecida por PESSOA JR. et al. (1997), empregando as seguintes condições de hidrólise: temperatura de 121°C, por 10 minutos e 100 mg de ácido sulfúrico por grama de matéria seca para relação sólido-líquido de 1:10. O hidrolisado obtido foi centrifugado, para remoção de massa residual de sólidos (celulose e lignina) e armazenado a 4° C em câmara fria.

3.1.3 - Concentração do hidrolisado

A concentração do hidrolisado foi efetuada em evaporador a vácuo (Marconi MA 175) a 70°C, em pH em torno de 0,9, utilizando-se porções de 4 litros a cada etapa de concentração (RODRIGUES et al., 1998).

Foi utilizada uma quantidade de 300 litros de hidrolisado não concentrado para a obtenção de diferentes frações nas concentrações de 2, 3, 4 e 5 vezes. Estas frações foram utilizadas nas fermentações controle e naquelas em que se avaliou a adaptação do inóculo, enquanto que uma quantidade de 100 litros de hidrolisado foi concentrada 5 vezes e utilizada nas fermentações com o reciclo de células (item 3.2.5).

As frações dos hidrolisados foram caracterizadas quanto ao pH, graus Brix, concentração de xilose, glicose, arabinose e quanto aos compostos tóxicos ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis totais. Os hidrolisados concentrados foram armazenados em câmara fria para posterior tratamento e formulação do meio de fermentação.

3.1.4- Tratamento do hidrolisado

O hidrolisado foi submetido ao tratamento estabelecido por MARTON (2002), que consiste na alteração do pH para 7,0 com óxido de cálcio comercial, seguido da redução para 2,5 com ácido fosfórico. Em seguida, o hidrolisado foi filtrado em papel de filtro e misturado a 1% de carvão ativo (COA (Brasilac Indústrias Químicas Ltda/Brasil), incubado a 100rpm, 60°C por 30 minutos, sendo o carvão

removido por filtração em papel de filtro. O hidrolisado teve o pH ajustado para 5,5 com NaOH e filtrado.

A fração de hidrolisado que foi denominada de não tratado teve somente ajuste de pH para 5,5 com NaOH, seguido de filtração.

3.1.5 - Preparação dos hidrolisados para as fermentações

Cada uma das porções de hidrolisado não concentrado e concentrados foram suplementadas com 2,0g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 20g/L de solução de extrato de farelo de arroz cujas soluções foram preparadas separadamente. As soluções de cálcio e nitrogênio, foram preparadas nas concentrações de 50, 200g/L, respectivamente e esterilizadas a 1,0atm por 20 minutos; enquanto que os hidrolisados e a solução de extrato de farelo de arroz na concentração de 200g/L foram autoclavados a 115°C por 15 minutos.

Esses hidrolisados foram empregados como meios de cultura para o preparo do inóculo e para as fermentações, sendo denominados de NC (não concentrado), H2N o hidrolisado duas vezes concentrado cujo tratamento consistiu no ajuste de pH e de H2, H3, H4 e H5 os hidrolisados concentrados nos fatores de 2, 3, 4, e 5 vezes, respectivamente. As etapas de hidrólise, concentração e tratamento do hidrolisado estão resumidamente apresentadas na **Figura4**.

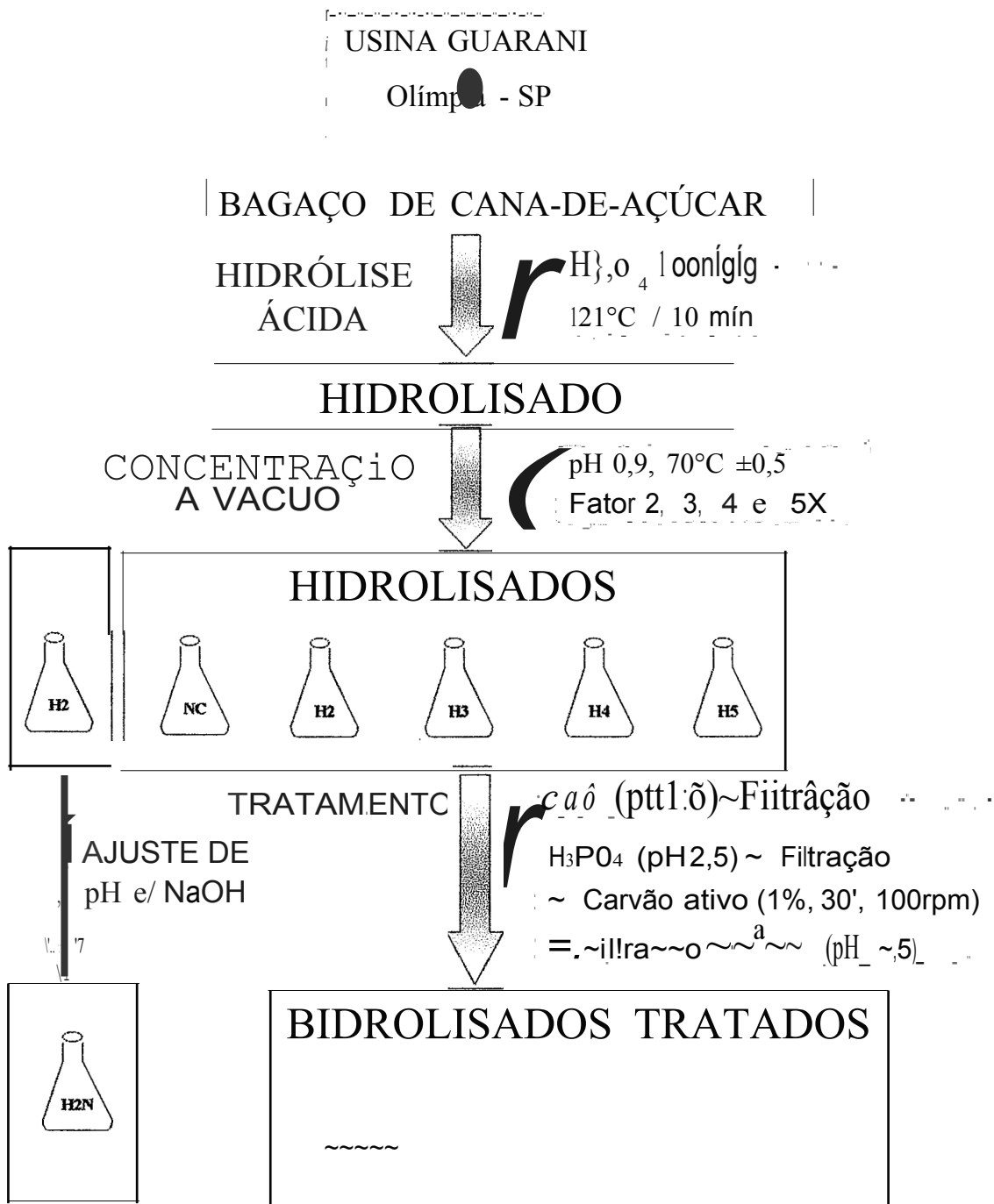


Figura 4 - Etapas de hidrólise ácida, concentração e tratamento do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

3.2 - MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

3.2.1 - Microrganismos e manutenção da cultura

Culturas estoque da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 foram mantidas a 4°C em tubos inclinados com ágar extrato de malte.

3.2.2 - Fermentação em meio semi definido (MS)

3.2.2.1 - Preparo do inóculo

O inóculo de células de *C. guilliermondii* foi preparado em frascos Erlenmeyer de 125ml contendo 50ml de meio composto de xilose (30g/L), extrato de farelo de arroz (20g/L), (NH₄)₂SO₄ (2,0g/L) e CaCl₂·2H₂O (0,1g/L). O cultivo foi realizado em incubadora rotatória orbital (New Brunswick Scientific Co. Inc.) a 200rpm e 30°C por 24h. Após este período a suspensão de células foi centrifugada a 800xg por 15 minutos (Centrifuga CU-5000 Damon/IEC Division). As células foram ressuspensas em água esterilizada, centrifugadas novamente e utilizadas como inóculo na concentração inicial de 0,4g/L.

3.2.2.2 - Condições de fermentação

O meio semi definido, pH 5,5 foi composto extrato de farelo de arroz (20g/L), (NH₄)₂SO₄ (2,0g/L), CaCl₂·2H₂O (0,1g/L) e açúcares nas concentrações correspondentes às encontradas no hidrolisado duas vezes concentrado (H₂) (xilose 33,7g/L; glicose 1,58g/L e arabinose 2,31g/L).

As fermentações foram realizadas em biorreator KLF 2000 (BioEngineering Co./Suíça) (**Figura 5**) com capacidade volumétrica de 2,4L, equipado com eletrodo de pH (Mettler Toledo), eletrodo polarográfico para a determinação de oxigênio dissolvido, termopar, agitador com 2 pás do tipo 'flat-blade' e ar comprimido. O volume de meio utilizado foi de 1,6L, incubado por um período correspondente ao consumo de, no mínimo, 80% da xilose do meio. Estas condições foram utilizadas em todas as fermentações realizadas neste trabalho.

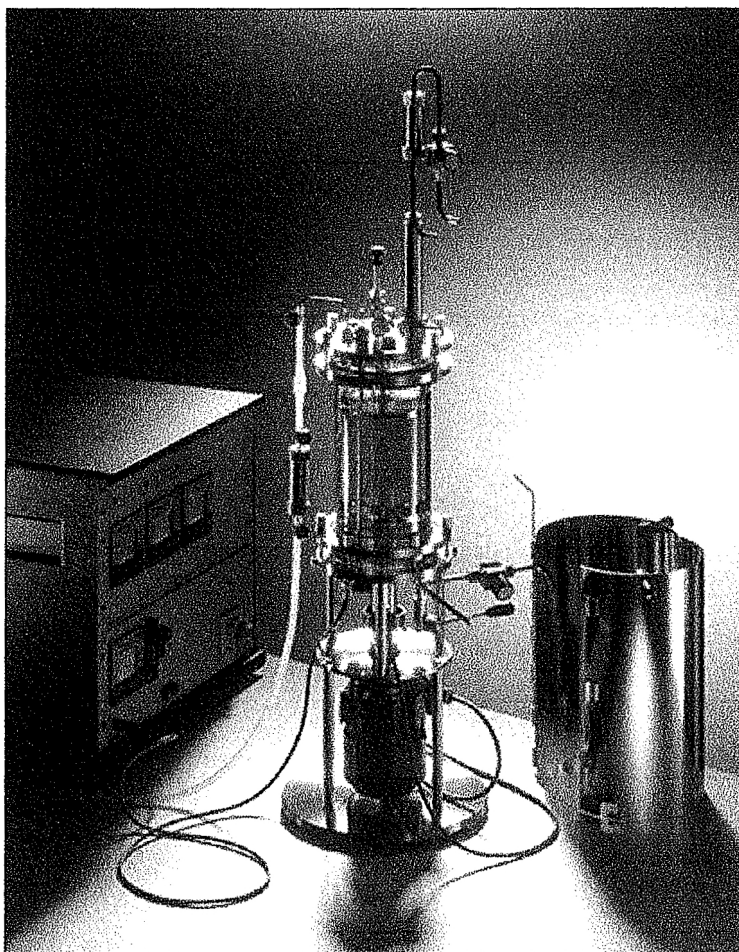


Figura5 - Reator KLF 2000

Inicialmente uma alíquota do meio de fermentação foi retirada após 6 horas de cultivo para a determinação da concentração de açúcares e em seguida amostras foram coletadas em intervalos de 12 horas a partir do início do cultivo onde, após a determinação da concentração celular as células foram recuperadas por centrifugação (CU-5000 Damon/IEC Division) a 800xg durante 15 minutos, ressuspensas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,2 e congeladas para a determinação da atividade das enzimas XR e XDH. O sobrenadante foi coletado para a determinação de açúcares, xilitol, etanol, glicerol, furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e pH. Esta metodologia de análise foi empregada em todas as fermentações realizadas neste trabalho.

3.2.3 - Fermentações em hidrolisados a partir de inóculo não adaptado

3.2.3.1 - Preparo do inóculo

O inóculo foi cultivado em meio semi definido, preparado nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.1.

3.2.3.2- Condições de fermentação

Foram utilizados os hidrolisados NC, H2N, H2, H3, H4 e H5 suplementados com nutrientes, conforme descrito no item 3.1.5.

As fermentações foram conduzidas em biorreator KLF 2000 (BioEngineering Co./Suíça), utilizando-se as mesmas condições de fermentação e análises descritas para fermentação em meio semi definido (item 3.2.2.2).

3.2.4 - Fermentações dos hidrolisados a partir de inóculo adaptado

3.2.4.1 - Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo as células de *C. guil/iermondii* foram inicialmente crescidas em meio semi definido e, após 24 horas de cultivo foram recuperadas por centrifugação a 800xg por 15 minutos, ressuspensas em água destilada estéril e utilizadas como inóculo inicial para o cultivo em hidrolisado não concentrado (NC). Após 24 horas de cultivo as células foram novamente recuperadas e consecutivamente transferidas para o hidrolisado de maior fator de concentração até se obter células adaptadas ao mesmo fator de concentração do hidrolisado que será utilizado no biorreator. A concentração inicial de células em cada fermentação foi de 0,4g/L.

3.2.4.2 - Condições de fermentação

Foram utilizados os hidrolisados NC, H2N, H2, H3, H4 e h5 suplementados com nutrientes, conforme descrito no item 3.1.5.

As fermentações foram conduzidas em biorreator KLF 2000 (BioEngineering Co./Suíça), utilizando-se as mesmas condições de fermentação e análises descritas para fermentação em meio semi definido (item 3.2.2.2.).

A **Figura 6** apresenta um esquema das fermentações em meio semi definido e em hidrolisado, em diferentes concentrações, com a utilização de inóculo com células não adaptadas e adaptadas em diferentes níveis.

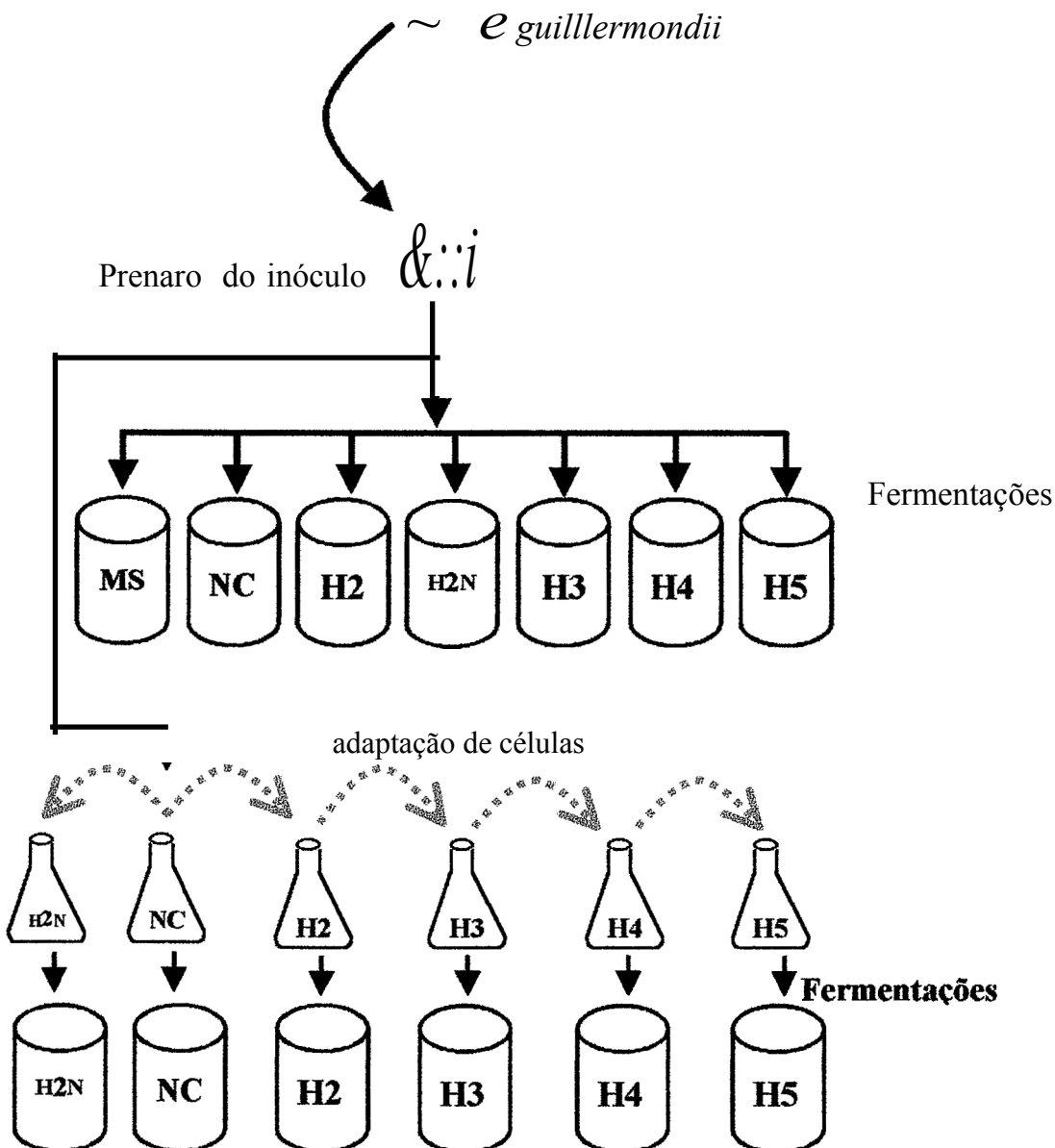


Figura 6 - Esquema de realização das fermentações empregando-se inóculos obtidos de células não adaptadas e adaptadas em diferentes níveis de concentração de hidrolisado (MS = meio semi definido; NC, H2, H3, H4 e H5 correspondem ao hidrolisado de bagaço de cana não concentrado e nos fatores de 2, 3, 4 e 5 vezes, respectivamente; H2N = hidrolisado concentrado e não tratado).

3.2.5 - Fermentações com reciclo de células

3.2.5.1 - Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo as células de *C. guilliermondii* foram inicialmente crescidas em meio semi definido e, após 24 horas de cultivo foram recuperadas por centrifugação a 800xg por 15 minutos, ressuspendidas em água destilada estéril e utilizadas como inóculo inicial para o cultivo em hidrolisado não concentrado. Após 24 horas de cultivo as células foram novamente recuperadas e consecutivamente transferidas para o hidrolisado de maior fator de concentração até se obter o cultivo em hidrolisado cinco vezes concentrado (H5). As células adaptadas ao hidrolisado H5 foram então utilizadas como inóculo para a fermentação em biorreator. A concentração inicial de células em cada fermentação foi de 0,4g/L.

Após 84 horas de fermentação em hidrolisado H5 uma alíquota de meio foi coletada em frasco estéril e as células foram coletadas e recuperadas por centrifugação a 800xg por 15 minutos, ressuspendidas em hidrolisado H5 e utilizadas como inóculo (0,4g/L) em outra fermentação conduzida nas mesmas condições. Foram realizadas cinco fermentações consecutivas com reciclo de células, denominadas respectivamente de R1, R2, R3, R4 e R5.

3.2.5.2 - Condições de fermentação

O hidrolisado cinco vezes concentrado (H5) foi utilizado na realização de sucessivas fermentações com reciclo de células.

Foi empregado o biorreator KLF2000 (BioEngineering Co., Suíça), utilizando-se as mesmas condições de fermentação e de análises descritas para fermentação em meio semi definido (item 3.2.2.2.).

3.3.2 -Avaliação do crescimento microbiano

A determinação da massa celular para o preparo do inóculo foi realizada pela determinação da densidade óptica em espectrofotômetro (Beckman DU-6408) a 600nm, onde a massa de células foi estimada correlacionando densidade óptica observada e massa seca de células obtidas por crescimento em 24h em meio semi definido.

3.3.3 - Rompimento celular

Para a determinação das atividades das enzimas intracelulares xilose redutase e xilitol desidrogenase, foi necessário promover o rompimento das células. As células, obtidas nos cultivos, centrifugadas a 800xg e ressuspensas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2, tiveram a concentração ajustada para 15 a 20g/L. Para o rompimento foram utilizados 3ml desta suspensão, colocadas em um tubo de ensaio e imerso em banho refrigerado a -10°C. As células foram então rompidas em processador ultrassônico (Vibra Cell 100W - Sonics & Materials) acoplado à uma sonda de 13mm, a qual emite vibrações de 20kHz, programado para pulsos de 1 segundo com intervalos de 1 segundo, por um período de 35 minutos (SENE *et al*, 2000).

Os debris celulares foram separados por centrifugação (Jouan MR 1812) a 6708xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para a determinação da quantidade de proteína solúvel e das atividades das enzimas XR e XDH.

3.3.4 - Medida de atividade enzimática

As atividades das enzimas XR e XDH foram determinadas em espectrofotômetro (Beckman 6408) segundo metodologia descrita por SENE *et al*. (2000). O meio de reação para a enzima XR foi constituído de 200µL de extrato livre de células, 570µL de água bidestilada, 150µL de β-mercaptoetanol 0,1M, 80µL de tampão fosfato de potássio (KH₂P04-KPQ4) pH 7,2 1 M, 100µL de NADPH

1,2mM e 200 μ L de xilose 0,5M; correspondendo a um volume total de 1,3ml. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 340nm, medindo-se o decréscimo da absorvância, decorrente da oxidação do NADPH, empregando xilose como substrato.

O meio de reação para a enzima XDH foi constituído de 200 μ L de extrato livre de células, 500 μ L de água bidestilada, 150 μ L de J3-mercaptoetanol 0,1 M, 200 μ L de tampão TRIS pH 8,6 0,5M, 150 μ L de NAD⁺ 1,26mM e 150 μ L de xilitol 0,5M; correspondendo a um volume final de 1,35ml. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 340nm, medindo-se o acréscimo da absorvância, decorrente da redução do NAD⁺, empregando xilitol como substrato.

Uma Unidade Internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução ou oxidação de 1 micromol de cofator por minuto à temperatura ambiente, utilizando-se um coeficiente de extinção para o NADPH e NAD⁺ de 6220 M⁻¹. orn'

As atividades específicas foram expressas em UI/mg proteína.

3.3.5 - Determinação do teor de proteína

A determinação do teor de proteína solúvel no extrato livre de células foi realizada conforme metodologia modificada de BRADFORD, descrita por BERGMAYER (1983), empregando-se albumina bovina como padrão e reagente de Bradford (Azul-brilhante de Coomassie G-250) como corante.

3.3.6 - Determinação das concentrações de açúcares, xilitol, etanol, glicerol e ácido acético

As concentrações de xilose, glicose, arabinose, xilitol, etanol, glicerol e ácido acético foram determinadas utilizando-se Cromatógrafo (Waters 786), equipado com uma coluna Bio Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm) e detector por índice de

refração Waters 410, operando nas seguintes condições: temperatura da coluna, 45°C; aluente, H₂SO₄ 0,01N; fluxo de 0,6mUmin; volume de amostra injetado de 20µL.

As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore). O aluente foi filtrado antes do uso em membrana HAWP 0,45µm (Millipore) e desgaseificado em banho de ultra-som (Microsonic SX-50) por 30 minutos.

3.3.7 - Determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural nos hidrolisados foram determinadas utilizando-se cromatógrafo Shimadzu-LC-110AD, equipado com uma coluna Hewlett-Packard RP 18 (200nm) e detector ultravioleta SPD-10A UV-VIS, operando nas seguintes condições: temperatura da coluna, 25°C; eluente, solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume de amostra injetado, 20µL.

Os hidrolisados foram devidamente diluídos e filtrados em filtros Swennex em membrana HA em éster de celulose, 0,45mm de poro e 13mm de diâmetro (MILIPORE). Na composição do aluente, a água bidestilada foi filtrada a vácuo empregando-se membrana HA em éster de celulose, 0,45mm de poro, 0,47mm de diâmetro (MILIPORE) e os outros componentes como ácido acético e acetonitrila foram, nas proporções adequadas, adicionados à água devidamente filtrada. Em seguida o eluente foi desgaseificado em banho de ultra-som (THORNTON) por 15 minutos, permanecendo em repouso por 10 minutos antes da sua utilização.

3.3.8 - Determinação da concentração de fenóis totais

Os compostos fenólicos foram determinados utilizando a metodologia descrita por ROCHA (2000) que baseia-se na avaliação dos compostos derivados de lignina, pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 280nm. O pH das

amostras foi ajustado para 12 de forma que a lignina presente no meio encontre-se na forma solúvel. Posteriormente as amostras foram diluídas e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 280nm.

A concentração da lignina é dada pela equação:

$$C_{L9}(\text{g/L}) = 4187 \cdot 10^{-2} (A_{9200} - a_0) - 3279 \cdot 10^{-4}$$

Onde: C_{L9} = concentração de lignina (g/L);

A_{9200} = absorbância a 280nm;

$A_{r,r}, a_0$ = absorbância dos produtos de decomposição de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) cujas concentrações foram determinadas em HPLC e as absortividades e_1 e e_2 por espectrofotometria a 280nm.

$$A_{r,r}, a_0 = c_1 \cdot e_1 + c_2 \cdot e_2$$

Onde: c_1 e c_2 = concentrações de furfural e hidroximetilfurfural determinadas em HPLC

e_1 e e_2 = coeficiente de extinção de furfural e hidroximetilfurfural

$$\text{Furf} = 146,85 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\text{HMF} = 114100 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

3.3.9 - Determinação de pH e Grau Brix

O pH das amostras foi determinado em potenciômetro de bancada (Micronal 374). O grau Brix dos hidrolisados foi medido em refratômetro Schmidt-Haensch.

3.3.10 - Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (KLa)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi determinado pela metodologia de 'gassing-out', segundo PIRT (1975). Inicialmente o meio de cultivo isento de células foi aerado com nitrogênio, com o objetivo de que o oxigênio dissolvido no meio fosse reduzido a zero. O meio foi agitado a 300rpm e aerado de acordo com a vazão desejada, monitorando-se o aumento da concentração do oxigênio dissolvido em função do tempo. Transformando-se a concentração de

oxigênio dissolvido (CONC02) em $\ln (\text{CONC}^* - \text{CONC02})$, onde CONC^* é a concentração de oxigênio dissolvido na saturação e, reaplicando-se uma regressão linear a esses dados em função do tempo, foi possível determinar o valor de K_La , o qual corresponde ao coeficiente de regressão linear, ou seja, à inclinação da reta obtida pela equação $d\text{conC02}/dt = K_La (\text{cose}' - \text{coNc02})$. O valor de K_La utilizado nas fermentações deste trabalho foi ajustado para 20h^{-1} .

3.4- DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS

3.4.1 - Fator de conversão de o-xilose em xilitol ($Y_{p/s}$)

O fator de conversão expressa: massa de xilitol produzido por massa de xilose consumida, o valor expresso em gramas foi calculado pela seguinte equação, segundo STAMBURY (1995).

$$Y_{p/s} = \frac{P_t - P_i}{S_t - S_i}$$

Onde: S_i e S_t correspondem às concentrações inicial e final de xilose (g/L);

P_i e P_t correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g/L).

3.4.2 - Produtividade volumétrica de xilitol (Q_p)

A produtividade volumétrica de xilitol expressa a concentração de xilitol produzida (g/L) por tempo (h) e foi calculada de acordo com a seguinte equação (STAMBURY, 1995):

$$Q_p = \frac{P_t - P_i}{t - t_i}$$

Onde: P_i e P_t correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g/L);

t_i e t_f correspondem aos tempos inicial e final de cultivo (h).

3.4.3 - Eficiência de conversão (T_t)

Este parâmetro de cultivo, expresso em %, representa a razão entre $Y_{p,s}$ observado experimentalmente e o rendimento teórico de 0,917 calculado segundo BARBOSA et al. (1988).

$$T_t = \frac{(P_f - P_i) * 100}{(S_f - S_i) * 0,917}$$

Onde: S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final de xilose (g/L);
 P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g/L).

3.4.4 - Formação de células em relação ao consumo de substrato

($Y_{x/s}$)

Este parâmetro correlaciona a formação de células (g/L) com a quantidade de xilose assimilada (g/L) pela levedura, expressa em g/g.

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)}$$

Onde:

S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final de xilose (g/L);
 X_i e X_f correspondem às concentrações inicial e final de células (g/L).

3.4.5 - Velocidade de Consumo

Este parâmetro representa a velocidade de consumo do composto analisado pela variação da sua concentração (g/L) dividida pelo tempo (h) de fermentação.

$$V = \frac{C_i - C_f}{t}$$

Onde: C_i e C_f correspondem às concentrações inicial e final do composto analisado (g/L) e t corresponde ao tempo de fermentação (h)

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS

O bagaço de cana-de-açúcar apresentou um teor de 23,5% de umidade, sendo submetido à hidrólise ácida e concentração. Os hidrolisados, não concentrado (NC) e concentrados duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco vezes (H5), foram caracterizados quanto ao pH, grau Brix, concentrações de xilose, arabinose, glicose, ácido acético, hidroximetilfurfural, furfural e fenóis totais (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, não concentrado (NC) e concentrados duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco vezes (H5).

	NC	H2	H3	H4	H5
pH	1,01	0,70	0,58	0,50	0,40
ºBrix	4,0	7,5	11,5	14,0	17,0
Xilose (gil)	16,30	33,70	50,14	65,78	81,02
Arabinose (gil)	1,26	2,31	3,28	4,44	5,15
Glicose (gil)	0,75	1,58	2,29	2,93	3,25
Ácido acético (gil)	2,17	3,12	3,45	3,92	3,69
Hidroximetilfurfural (gil)	0,006	0,014	0,017	0,019	0,029
Furfural (gil)	0,081	0,006	0,010	0,013	0,017
Fenóis totais (g/l)	3,57	6,72	9,20	12,33	18,46

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 1**, podemos constatar que a xilose é o açúcar predominante no hidrolisado, independente do fator de concentração, seguido de arabinose e glicose, presentes em menor quantidade. A presença de elevadas concentrações de xilose, em relação à glicose, favorece a formação xilitol a partir do cultivo da levedura no hidrolisado, uma vez que as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, envolvidas nesta bioconversão, são induzidas em presença de xilose ou arabinose e podem ser reprimidas em

presença de glicose (BOLEN e DETROY, 1985; KERN et al., 1997, SILVA et al., 2004). As concentrações destes açúcares presentes no hidrolisado obtido neste trabalho são semelhantes às encontradas por outros autores em pesquisas com bagaço de cana-de-açúcar (MORITA et al., 2000; SILVA, 2001; RODRIGUES et al., 2001a).

Conforme os dados apresentados na **Tabela 1**, observa-se também que xilose, glicose, arabinose, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos totais tiveram suas concentrações proporcionalmente aumentadas, de acordo com o fator de concentração do hidrolisado, enquanto que o mesmo não ocorreu com o ácido acético e furfural. Isto ocorre devido à característica volátil destes compostos, os quais têm suas concentrações reduzidas durante o processo de concentração que ocorre a 70°C, característica também observada e relatada por SILVA et al., 2000 e RODRIGUES et al. 2001. Também o baixo pH (pH-1) pode contribuir para a volatilização do ácido acético durante o processo de concentração a vácuo, já que nestas condições este encontra-se na forma não-dissociada (RODRIGUES et al. 2001). No caso específico do furfural, possivelmente a remoção parcial deste composto também ocorreu durante a etapa de concentração, uma vez que suas características físico-químicas permitem que este seja parcialmente removido quando submetido a condição de pressão reduzida e temperatura de 55°C (PERRY e GREEN 1997).

Nota-se ainda na **Tabela 1** que as concentrações de ácido acético nos hidrolisados H3, H4 e H5 podem ser consideradas como inibidoras da bioconversão de xilose em xilitol, conforme relatado por FELIPE et al. (1995). Segundo estes autores, concentrações acima de 3,09/L foram capazes de reduzir os valores dos parâmetros de rendimento e produtividade de xilitol durante fermentações de meio semi definido contendo 60g/L de xilose inicial por *C. guilliermondii*.

Na **Tabela 2** estão apresentados os resultados da caracterização dos hidrolisados após o tratamento com óxido de cálcio e carvão ativo ou ajuste de pH,

no caso do hidrolisado H2N (não tratado). Observa-se que ocorreu redução na concentração de açúcares após o tratamento dos hidrolisados (**Tabela 2**), sendo esta redução mais acentuada no hidrolisado com maior fator de concentração (HS). Neste caso, verifica-se uma variação do valor inicial de xilose de 81,0 para 68,5g/L, ou seja, perda de 15,5% no teor desta pentose, semelhante ao observado por MARTON et al. (2003). Segundo ROSA et al. (1998) a concentração de o-xilose é um dos principais fatores que influenciam na produtividade de xilitol, sendo assim, as possíveis perdas desta pentose com a concentração do hidrolisado em níveis superiores ao fator de cinco vezes poderá comprometer a eficiência do processo.

Tabela 2 - Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar após o tratamento ou ajuste de pH. Hidrolisado não concentrado (NC), duas vezes concentrado e não tratado (H2N), concentrados duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco vezes (H5).

Compostos(g/L)	NC	H2N*	H2	H3	H4	HS
Xilose	14,72	30,23	29,50	39,15	56,38	68,54
Arabinose	0,86	2,60	2,14	3,78	5,45	7,01
Glicose	0,08	0,70	0,60	0,72	1,18	1,37
Ácido acético	1,65	2,45	2,33	2,74	2,92	3,21
Fenóis totais	0,70	4,84	1,65	2,45	3,55	4,07

* ajuste de pH para 5,5, seguido de filtração

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 2** foi possível observar também que o tratamento foi capaz de promover uma redução, em média, de 25% na concentração de ácido acético, semelhante ao observado (27%) por RODRIGUES et al. (2001 a). Com relação à concentração de fenóis, os resultados apresentados na **Tabela 2** demonstram que após o tratamento dos hidrolisados estes componentes apresentaram concentrações entre 0,7 e 4,07g/L, correspondendo, a uma redução entre 71 e 80% em relação ao teor inicial (**Tabela 1**). Segundo ALVES et al. (1998) e MARTON (2002), a adsorção em carvão ativo é a etapa responsável pela remoção dos compostos fenólicos durante o tratamento

do hidrolisado de bagaço de cana, no entanto, no hidrolisado em que ocorreu apenas ajuste de pH observa-se uma redução de 28% no teor de fenóis totais (**Tabela 2**), sugerindo que a alteração do pH pode precipitar estes compostos e contribuir para sua remoção. Não foi detectada a presença de hidroximetilfurfural e furfural após o tratamento dos hidrolisados, semelhante ao observado por RODRIGUES et al. (2001 a).

4.2 - FERMENTAÇÕES A PARTIR DE INOCULO NÃO ADAPTADO

4.2.1 - Fermentação em meio semi definido (MS)

A fermentação em meio MS foi realizada em concentrações de açúcares semelhantes às encontradas no hidrolisado H2 com a finalidade de obter dados sobre a fermentação na ausência de compostos inibidores ao metabolismo da levedura presentes no hidrolisado. Os resultados da fermentação em MS podem ser acompanhados nas **Figuras 8 e 9**.

De acordo com os dados apresentados na **Figura 8** observa-se que o consumo da xilose ocorreu desde as primeiras horas de fermentação, sendo totalmente assimilada após 48 horas de cultivo. A formação de xilitol, também observada nas primeiras horas do cultivo, alcançou seu máximo valor (17,3g/L) em 36 horas, sendo parcialmente consumido nas 12 horas seguintes. A capacidade da levedura *C. guilliermondii* em assimilar o xilitol formado também foi observada por outros autores (MARTÍNEZ et al. 1999; RODRIGUES et al., 2003; PALLADINO et al., 2003) e normalmente coincide com a escassez de xilose no meio de fermentação. PALLADINO et al. (2003) comprovaram que o xilitol é utilizado como fonte de carbono por *C. guilliermondii*, no entanto a velocidade de consumo é, em média, 87% menor quando comparada com a de xilose.

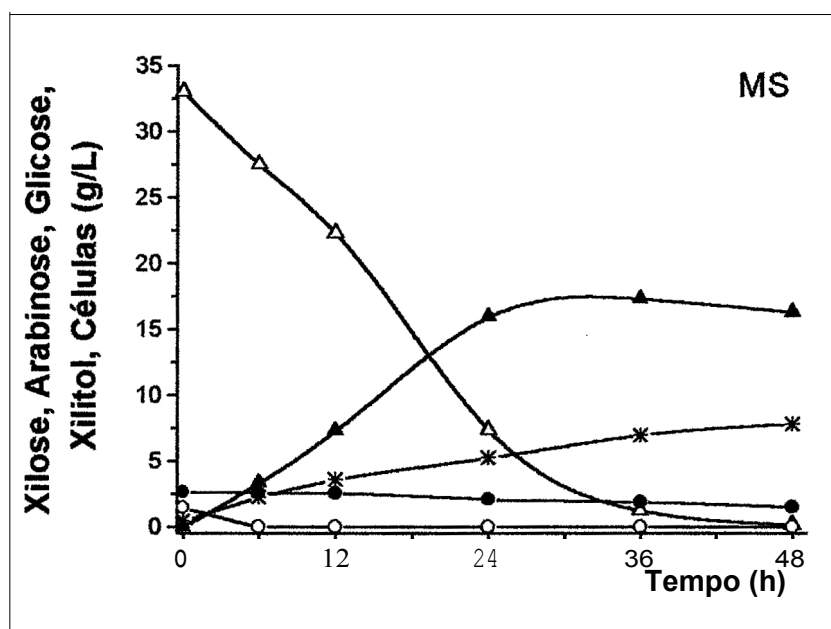


Figura 8 - Consumo de xilose (Δ), arabinose (●) e glicose (○); formação de xilitol (•) e massa celular(*) durante fermentação de meio semi definido (MS) por *Candida guilliermondii*.

Quanto ao consumo de arabinose a levedura apresentou lenta assimilação ao longo das 48 horas de fermentação com consumo de 42,7% da concentração inicial, enquanto que a glicose foi totalmente assimilada nas primeiras 6 horas de cultivo (**Figura 8**). Comportamento semelhante para a assimilação destes glicídios em meio semi definido também foi observado em *C. guilliermondii* por LIMA (2002).

Observa-se a formação de etanol (1,96g/L) e glicerol (1,0g/L) como subprodutos da fermentação do meio semi definido (**Figura 9**). A formação de etanol ocorreu nas primeiras horas de cultivo, seguido de sua assimilação pela levedura. O glicerol foi formado até as 36 horas de fermentação, sendo assimilado nas horas seguintes, possivelmente devido ao esgotamento de xilose do meio. A formação de etanol e glicerol como subprodutos da fermentação de meio semi definido também foi relatada em *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* por NOLLEAU et al., 1993.

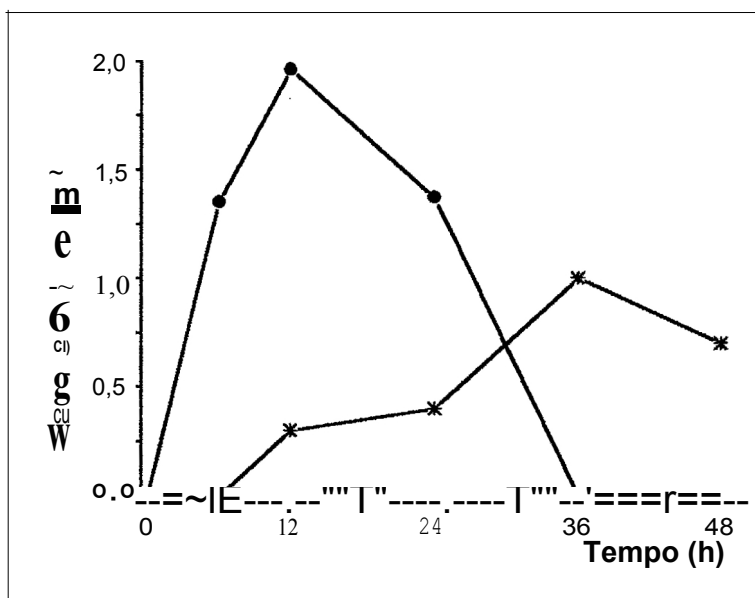


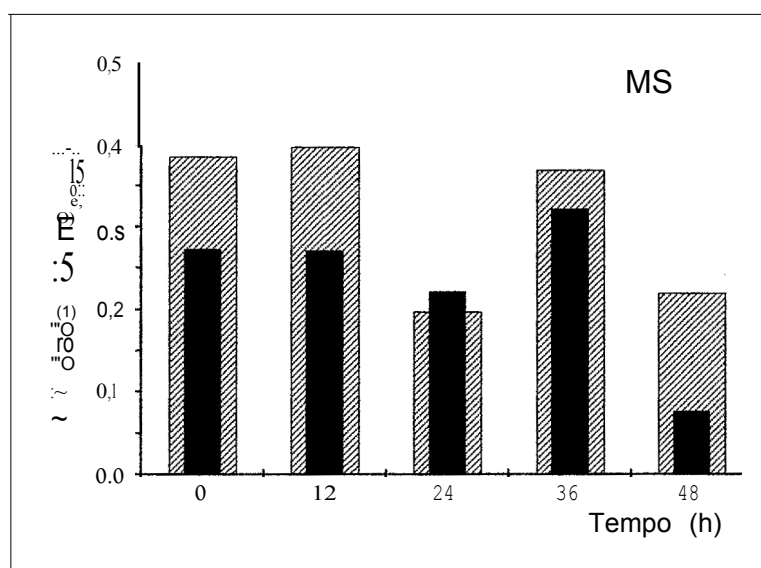
Figura 9- Formação de etanol(•) e glicerol(*) durante fermentação de meio semi definido (MS) por *Candida guii/Jiermondii*.

Na **Tabela 3** estão apresentados os parâmetros fermentativos da fermentação em meio semi definido, observando-se que a máxima formação de xilitol (17,3g/L) foi obtida após 36 horas de fermentação, coincidente com o consumo de 96% da xilose do meio. Os máximos valores de rendimento e produtividade foram 0,68g/g e 0,66g/Lh⁻¹, respectivamente, semelhante aos observados (0,70g/g e 0,62g/Lh⁻¹) por MUSSATTO e ROBERTO (2001) no cultivo desta mesma levedura em meio semi-definido.

Com relação às atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) durante a fermentação em meio semi-definido, observou-se que as atividades da enzima XR foram superiores às da XDH, exceto com 24 horas de cultivo. A maior atividade da enzima XR (0,3968U/mgPRor) foi observada com 12 horas de cultivo, enquanto que para a XDH a máxima atividade (0,3217U/mgPRor) foi observada com 36 horas. As atividades enzimáticas observadas em meio semi-definido foram utilizadas como parâmetro de comparação em relação às atividades destas enzimas nas fermentações realizadas em hidrolisado.

Tabela 3 - Parâmetros fermentativos observados durante fermentação de meio semi definido por *Candida guilliermondii*.

	Tempo (h)				
	6	12	24	36	48
Assimilação de xilose (%)	16,7	32,4	77,7	96,2	99,5
Xilitol formado (g/l)	3,4	7,3	16,0	17,3	16,3
Y _{Pts} (g/g)	0,61	0,68	0,62	0,54	0,50
Q _p (g/Lh ⁻¹)	0,56	0,61	0,66	0,48	0,34
y _{xs} (g/g)	0,33	0,30	0,19	0,21	0,23
Massa celular formada (g/l)	2,26	3,59	5,25	6,97	7,82

**Figura 10** -Atividade das enzimas xilose redutase (~) e xilitol desidrogenase (1) de *Candida guilliermondii* durante fermentação de meio semi definido (MS).

4.2.2 - Fermentações em hidrolisados

As fermentações realizadas a partir de inóculo não adaptado ao hidrolisado tiveram a finalidade de avaliar o comportamento da levedura, frente a diferentes concentrações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Os

resultados quanto à assimilação de xilose e formação de xilitol, apresentados na **Figura 11** demonstram que a xilose foi assimilada pela levedura desde as primeiras horas de fermentação, independente do fator de concentração do hidrolisado. No hidrolisado HS foi observado consumo de xilose menor que 1% do valor inicial nas primeiras 12 horas de fermentação.

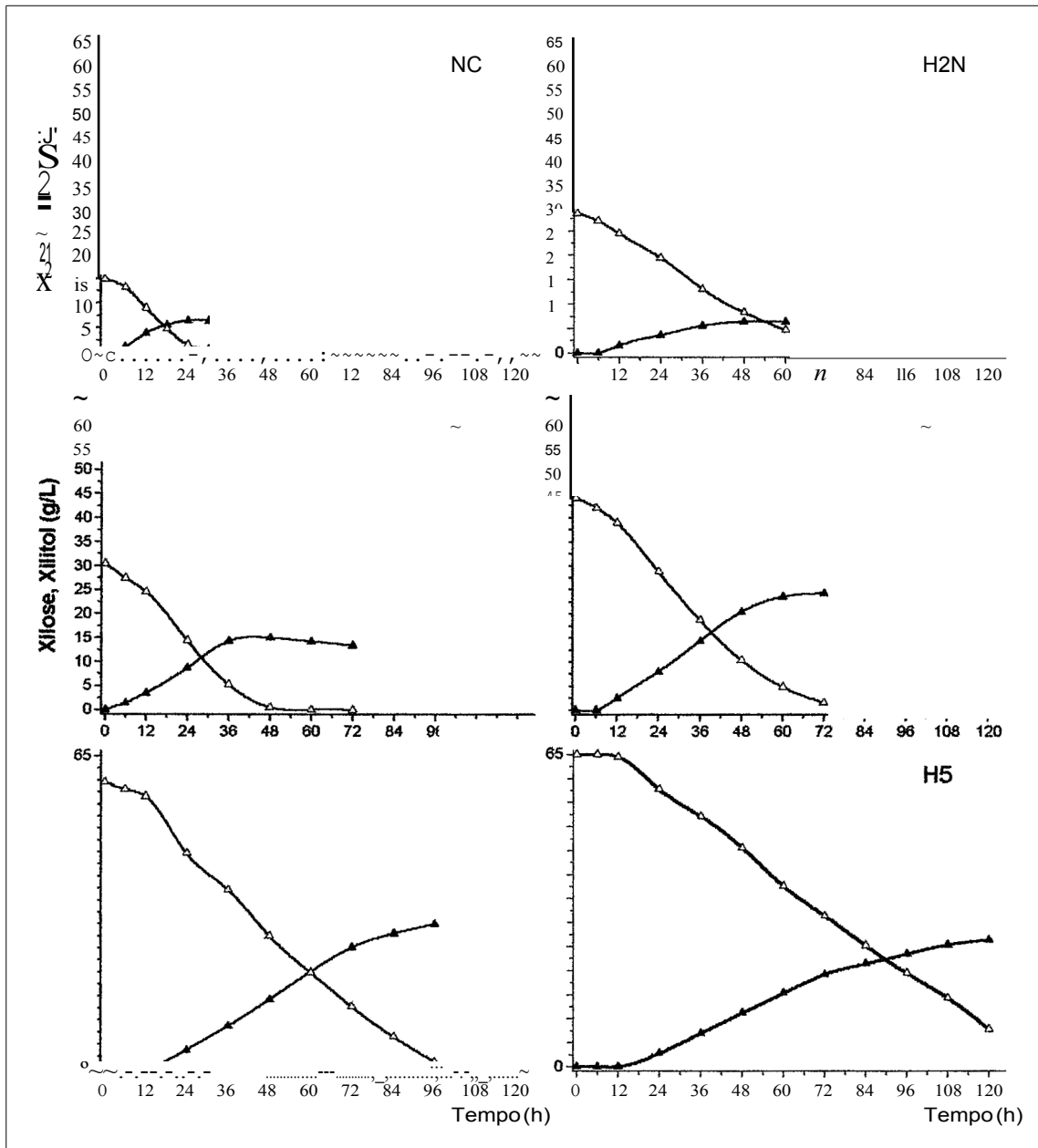


Figura 11 - Concentrações de xilose (~) e xilitol (•) durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisado duas vezes concentrado não tratado (H2N), tratado não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco vezes (H5).

De acordo com os dados apresentados na **Figura 11** observa-se também que as concentrações iniciais de xilose nos hidrolisados H2 a HS são superiores à 22g/L, consideradas por SILVA e AFSCCHAR (1994) como favoráveis à formação de xilitol pela levedura. A maior formação de xilitol (30g/L) foi observada no hidrolisado H4 com 96 horas de fermentação. A maior concentração de xilose inicial no hidrolisado HS não favoreceu a formação de xilitol, possivelmente pela maior a concentração de inibidores neste hidrolisado. Segundo FELIPE et al. (1997b) o aumento do fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar favoreceu a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* quando a concentração inicial de xilose alcançou 54g/L.

Ainda na **Figura 11**, é possível observar que o tratamento do hidrolisado é necessário para uma melhoria na formação de xilitol, uma vez que as concentrações iniciais de xilose nos hidrolisados tratado (H2) e não tratado (H2N) sejam semelhantes(-30g/L), a formação de xilitol na fermentação do hidrolisado tratado foi 170% superior à de 6,4g/L, obtida no hidrolisado não tratado (H2N).

4.3 - FERMENTAÇÕES A PARTIR DE INÓCULO ADAPTADO

A **Figura 12** apresenta os resultados observados quanto ao consumo de xilose e formação de xilitol nos diferentes hidrolisados em relação à adaptação do inóculo e ao fator de concentração do hidrolisado. Assim como nas fermentações sem a adaptação do inóculo, observa-se a assimilação da xilose desde as primeiras horas de fermentação. A melhoria na assimilação de xilose em função da adaptação do inóculo foi mais acentuada nos hidrolisados H2N e HS, correspondendo também aos hidrolisados em que se observou melhoria de 60,9 e 47%, respectivamente na formação de xilitol pela levedura, em relação às fermentações sem a adaptação do inóculo. A máxima formação de xilitol (38,9g/L) foi observada em função da adaptação do inóculo na fermentação do hidrolisado com maior fato de concentração (HS). A melhoria na conversão de xilose em xilitol pela adaptação celular ao hidrolisado também foi relatada por outros autores

(CHEN e GONG, 1985; FELIPE et al., 1996; SENE et al., 1998, 2001). SENE et al. (1998) observaram uma melhoria de 46 a 50% na formação de xilitol em função da adaptação de células de *C. guilliermondii* ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

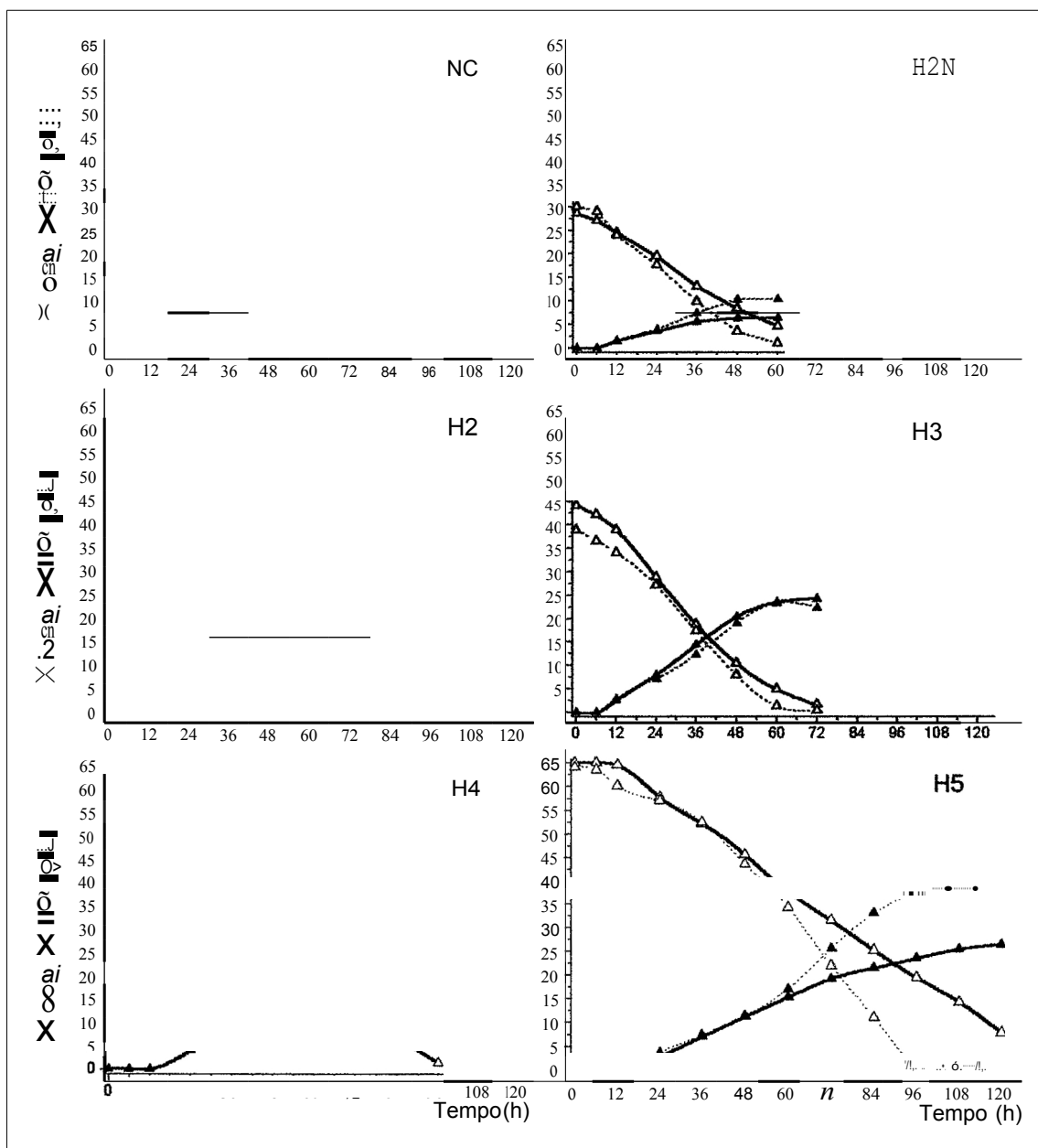


Figura 12 - Concentrações de xilose (X) e xilitol (X̃) durante fermentações de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisado duas vezes concentrado não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Inóculo com células não adaptadas(-) e adaptadas (- - -) ao hidrolisado.

Correlacionando-se os resultados apresentados na **Figura 12** com a caracterização dos hidrolisados tratados (**Tabela 2**) é possível constatar uma relação direta entre a necessidade da adaptação celular para o aumento da produção de xilitol em hidrolisados com concentração de fenóis totais superiores a 4,0g/L, observada nos hidrolisados H2N e HS. Em fermentações com até 3,55g/L de fenóis totais (hidrolisado H4) a adaptação celular não resultou em melhoria na formação de xilitol pela levedura. Segundo CLARK e MACKIE (1984), concentrações de 2,0g/L de fenóis em hidrolisado de *Pinus radiata* são capazes de exercer efeito tóxico sobre *Saccharomyces cerevisiae*.

Com relação à assimilação de glicose, a baixa concentração (0,75 a 3,25g/L) nos hidrolisados foi totalmente consumida pela levedura nas primeiras horas de cultivo, independente do fator de concentração do hidrolisado e da adaptação do inóculo (**Figura 13**). A rápida assimilação da glicose pela levedura *C. guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar também foi relatada por SENE et al. (1998) e MORITA et al. (2000).

Na **Figura 14** estão apresentados os resultados quanto à assimilação de arabinose pela levedura em função da adaptação do inóculo. Observa-se uma lenta assimilação desta pentose pela levedura, sendo totalmente assimilada somente nas fermentações dos hidrolisados NC e H2. Segundo o perfil de consumo de arabinose nestes hidrolisados, observa-se que o consumo desta pentose é favorecido com baixas concentrações de xilose no meio de fermentação (**Figuras 12 e 14**), semelhante ao observado na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos de eucalipto por *Pichia stipitis* (FERRARI et al., 1992). A lenta assimilação de arabinose pela levedura *C. guilliermondii* durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar também já foi observado por outros autores (FELIPE et al., 1995; SILVA, 2001; SENE et al. 2001; LIMA, 2002). Foi possível observar, que a adaptação do inóculo favoreceu a assimilação desta pentose a partir de 36 horas de fermentação nos hidrolisados H2N, H3 e H5.

O favorecimento na assimilação deste açúcar em função da adaptação do inóculo ao hidrolisado também foi observado em *C. guilliermondii* por SENE et al. (2001).

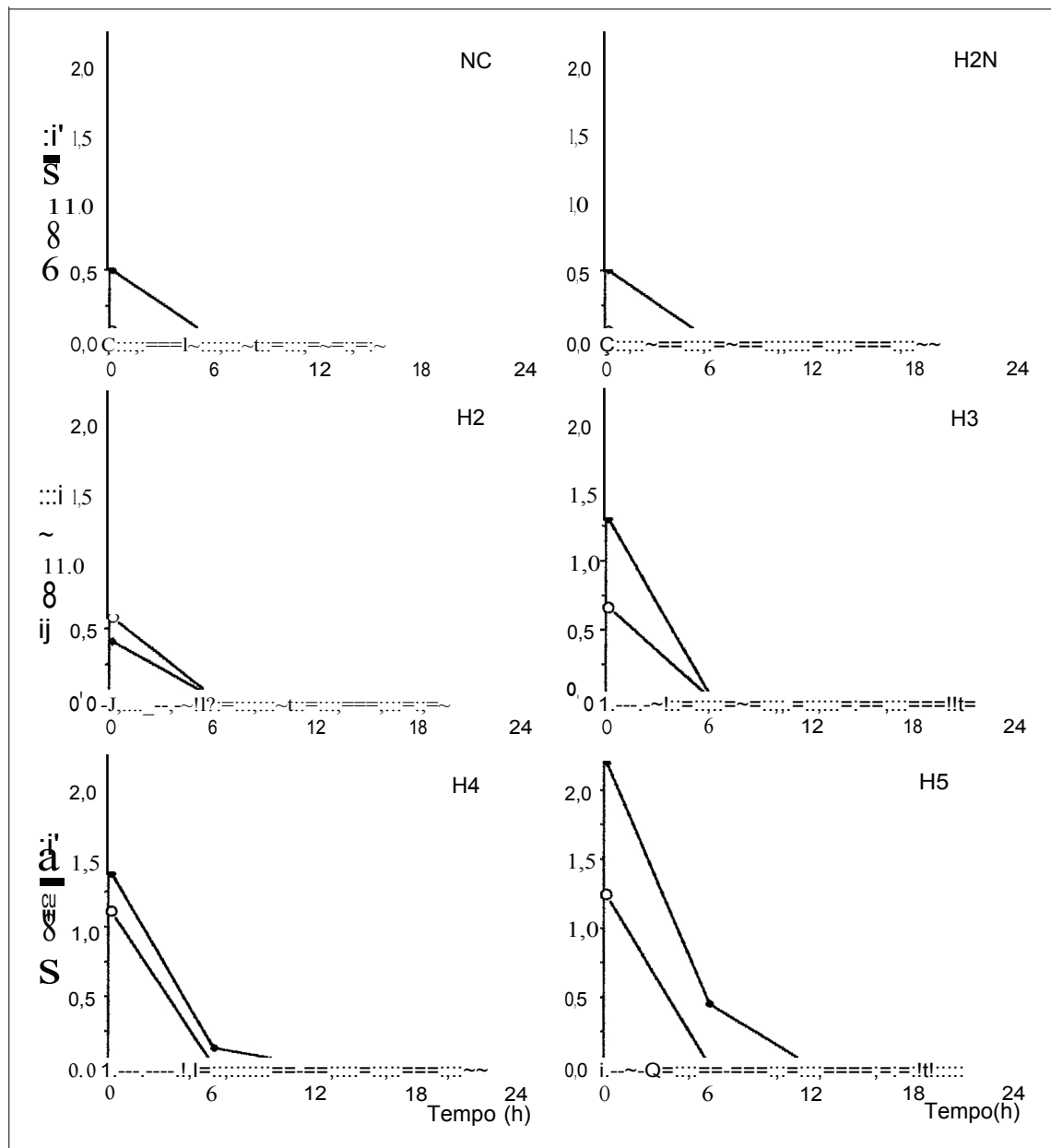


Figura 13 - Concentrações de glicose durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Inóculo com células não adaptadas (•) e previamente adaptadas (o) ao hidrolisado.

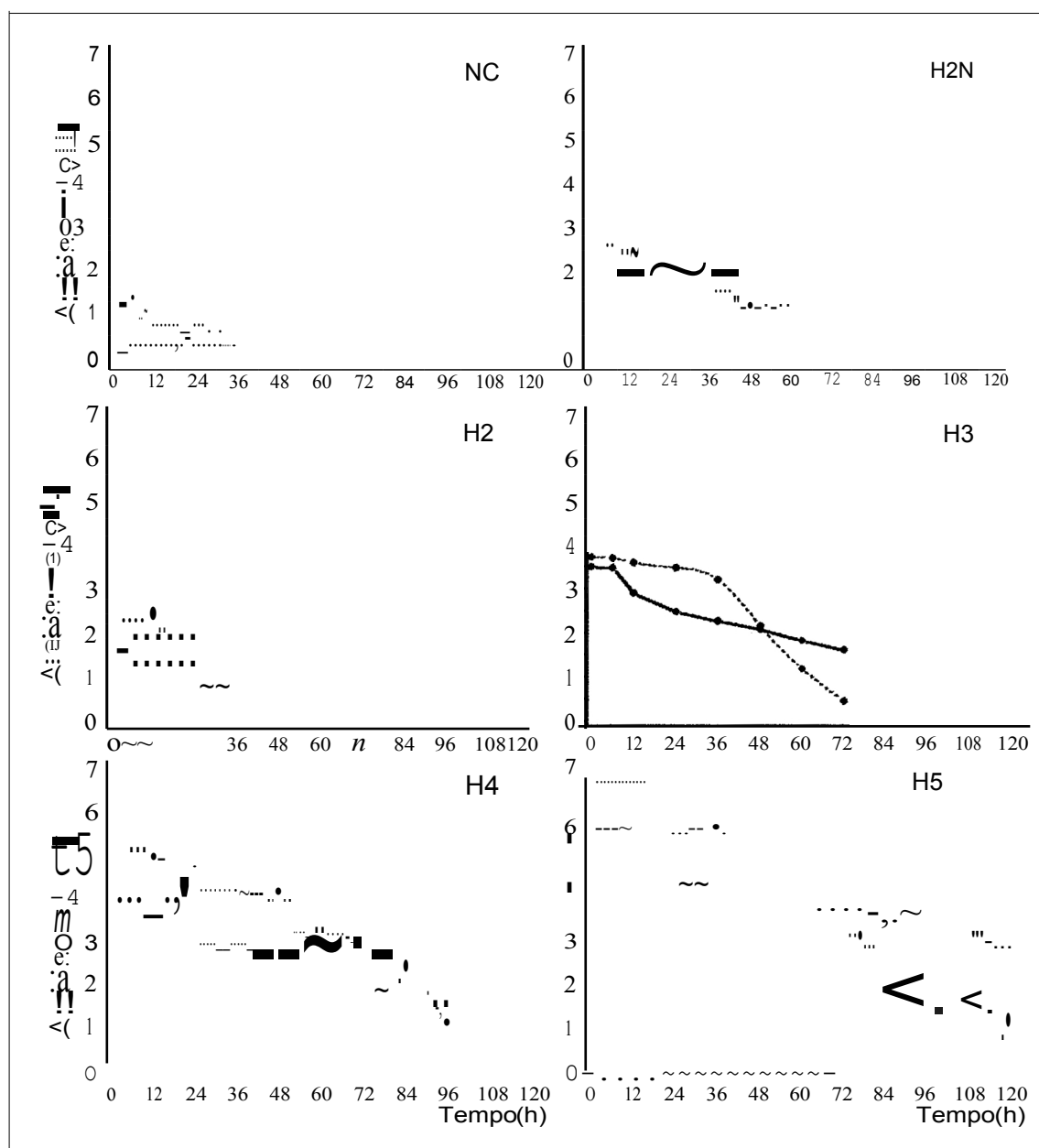


Figura 14 - Concentrações de arabinose durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Inóculo com células não adaptadas(-) e adaptadas {- -} ao hidrolísado.

Quanto ao crescimento celular, os dados apresentados na Figura 15 demonstram que este foi favorecido em função da adaptação do inóculo, principalmente nas fermentações dos hidrolisados H2 e H3, enquanto que nos hidrolisados H4 e H5, a formação de massa celular praticamente não foi afetada, também observado por FELIPE et al. (1996) em hidrolísado contendo 53g/L de xilose.

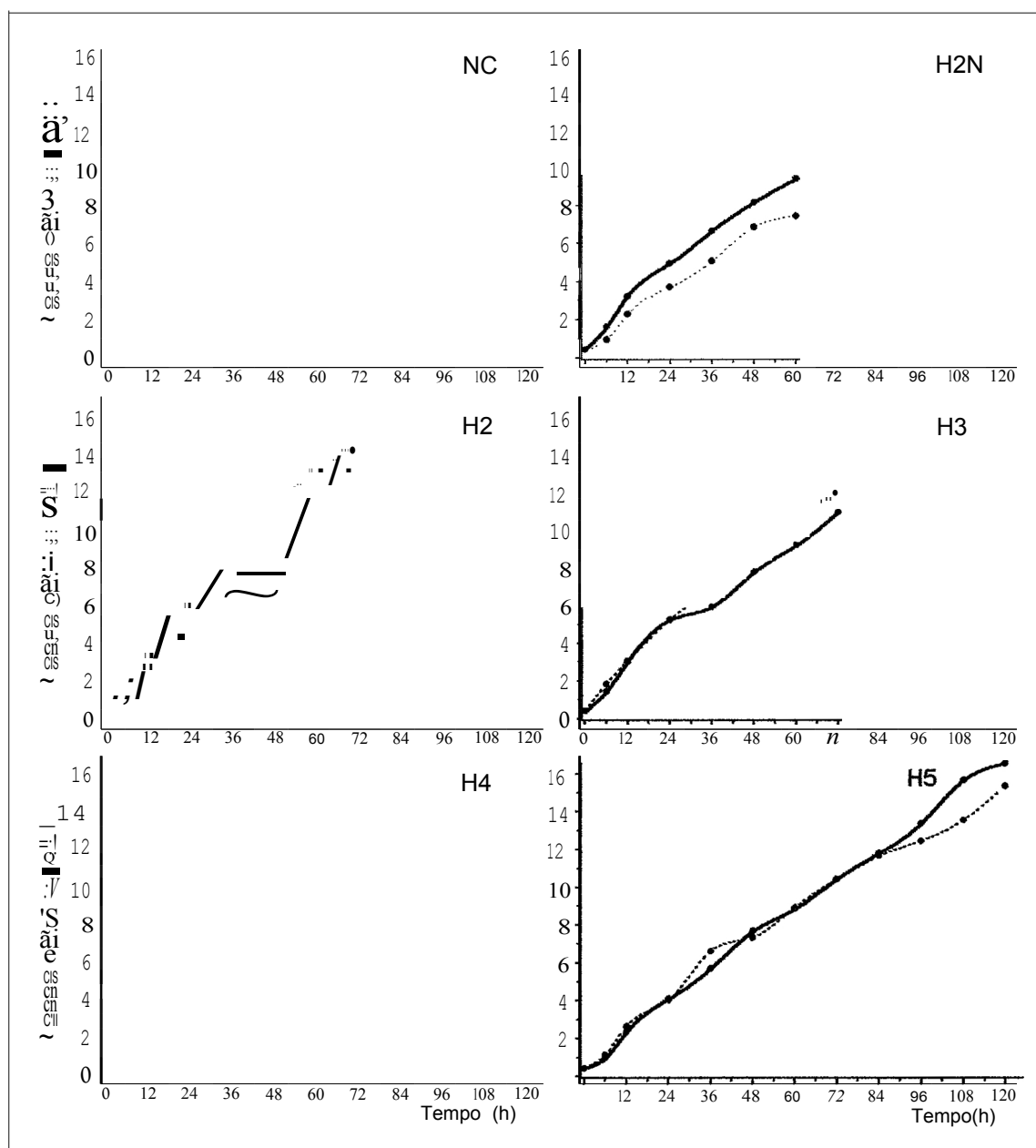


Figura 15 - Massa celular durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Inóculo com células não adaptadas(-) e adaptadas (- -) ao hidrolisado.

A Tabela 4 apresenta dados sobre a velocidade de consumo de xilose e arabinose durante as fermentações realizadas com e sem a adaptação do inóculo, bem como a taxa de formação de massa celular. Os resultados demonstram que a maior velocidade de consumo de xilose ($0,619/Lh^{-1}$) foi observada no hidrolisado

H4 quando foi empregado inóculo não adaptado. Foi observado também que, quanto maior o fator de concentração do hidrolisado, maiores as velocidades de consumo de xilose (**Tabela 4**). Assim como observado para a formação de xilitol, a adaptação do inóculo favoreceu a velocidade de consumo de xilose nos hidrolisados com maior teor de fenóis (H2N e H5). O aumento na velocidade de consumo de xilose em função da adaptação do inóculo ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar também foi observado em *C. guilliermondii* por SENE et al. (1998) e em *Candida sp.* por CHEN e GONG (1985).

Tabela 4-Velocidades de consumo (V) de xilose e arabinose, taxa de formação de células (Ox) de *Candida guilliermondii* durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar duas vezes concentrado não tratado (H2N) e em hidrolisados tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

	Vn.ose (g/Lh ⁻¹)		VARABIHOSE (g/Lh ⁻¹)		Qx (g/Lh ⁻¹)	
	N	A	N	A	N	A
NC	0,41	0,37	0,014	0,027	0,25	0,19
H2N	0,40	0,49	0,008	0,028	0,15	0,14
H2	0,42	0,38	0,023	0,040	0,18	0,19
H3	0,59	0,53	0,026	0,045	0,15	0,16
H4	0,61	0,50	0,029	0,043	0,13	0,13
H5	0,48	0,53	0,024	0,052	0,13	0,12

N = inóculo não adaptado, A = Inóculo adaptado

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 4** observa-se também que a velocidade de consumo de xilose pela levedura foi superior à de arabinose, independente do fator de concentração do hidrolisado e da adaptação do inóculo utilizado. Nota-se também que a adaptação do inóculo foi capaz de favorecer o consumo de arabinose nos hidrolisados sendo a máxima velocidade (0,052g/Lh⁻¹) observada no hidrolisado de maior fator de concentração (H5) com a utilização de inóculo adaptado. Os resultados indicam que a adaptação do inóculo favorece a assimilação de arabinose independente do fator de concentração do hidrolisado,

enquanto que a melhoria na assimilação de xilose é mais acentuada nos hidrolisados com maiores teores de compostos tóxicos. O favorecimento na assimilação de arabinose em função da adaptação da levedura *C. guilliermondii* ao hidrolisado de bagaço de cana também foi observado por SENE et al. (2001).

Em relação ao crescimento celular, foi observada uma diminuição da taxa de formação de massa celular com o aumento do fator de concentração do hidrolisado (**Tabela 4**), interferência possivelmente causada pela alta concentração de compostos inibidores. A maior velocidade de formação de massa celular (0,25g/Lh⁻¹) foi observada no hidrolisado não concentrado (NC) e sem a adaptação do inóculo.

Os parâmetros fermentativos observados durante as fermentações realizadas estão apresentados nas **Figuras 16 e 17**. De acordo com os dados apresentados na **Figura 16** observa-se que o maior rendimento do xilitol (0,66g/g) foi obtido no hidrolisado NC após 12 horas de cultivo com inóculo não adaptado, resultado possivelmente relacionado com o menor teor de tóxicos neste hidrolisado. Foi possível observar também que a adaptação do inóculo favoreceu o rendimento do xilitol nos hidrolisados H3, H4 e H5. No hidrolisado H4 a adaptação do inóculo promoveu uma melhoria de 13,8% (de 0,54 para 0,62g/g), enquanto que no hidrolisado H5 a melhoria foi de 8,6% (de 0,58 para 0,63g/g) (**Figura 16**).

Com relação à produtividade do xilitol (**Figura 17**), o máximo valor obtido (0,43g/Lh⁻¹) ocorreu durante a fermentação do hidrolisado H3 com inóculo não adaptado. Foi observado também que a adaptação do inóculo resultou em melhoria de 26% (de 0,15 para 0,21g/Lh⁻¹) na produtividade do xilitol na fermentação do hidrolisado não tratado (H2N) e de 44% (de 0,27 para 0,39g/Lh⁻¹) no hidrolisado H5, corroborando com a idéia da necessidade de adaptação celular para hidrolisados com elevado teor de compostos tóxicos.

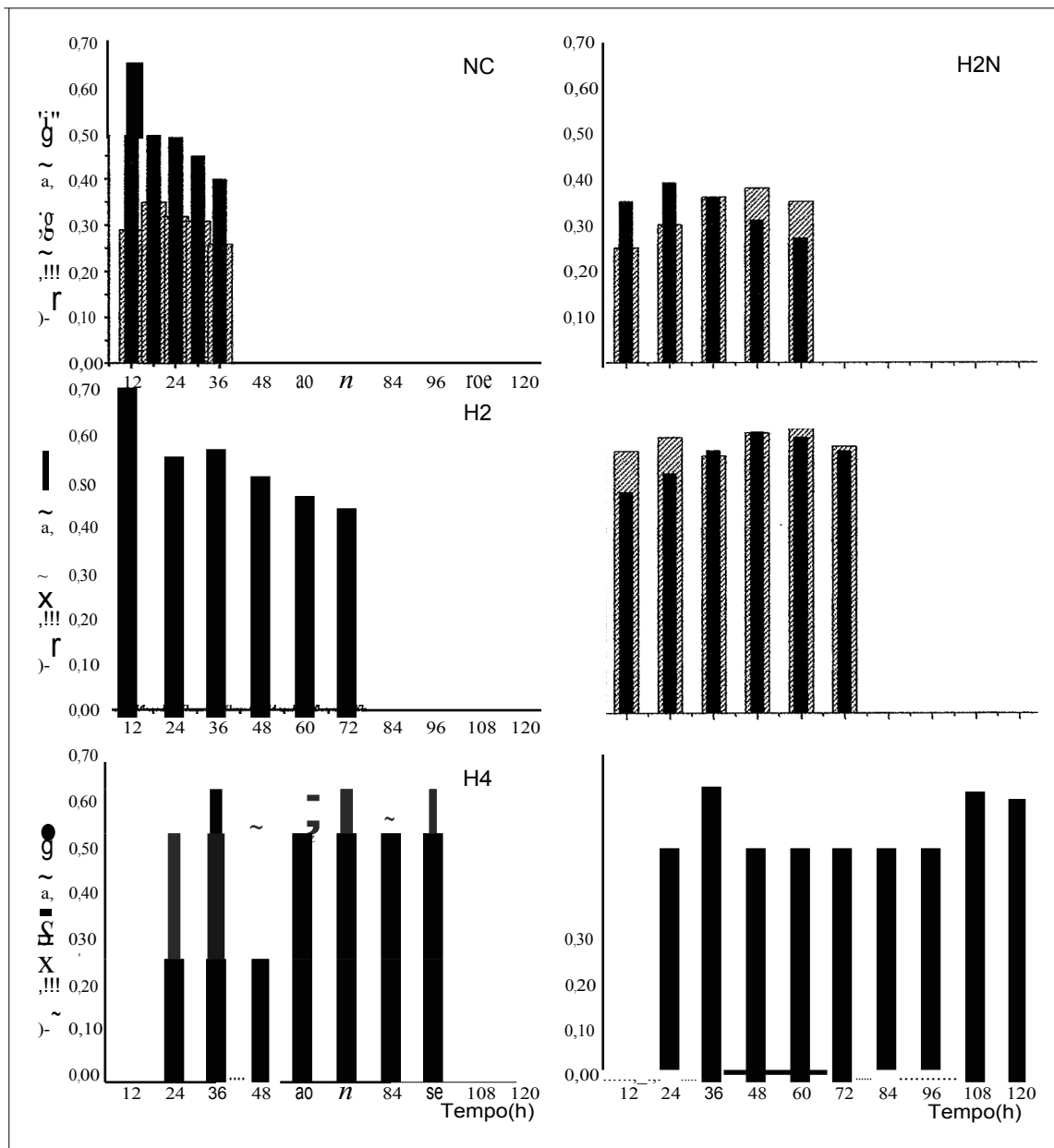


Figura 16 - Rendimento do xilitol durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Inóculo com células não adaptadas (I) e adaptadas (III) ao hidrolisado.

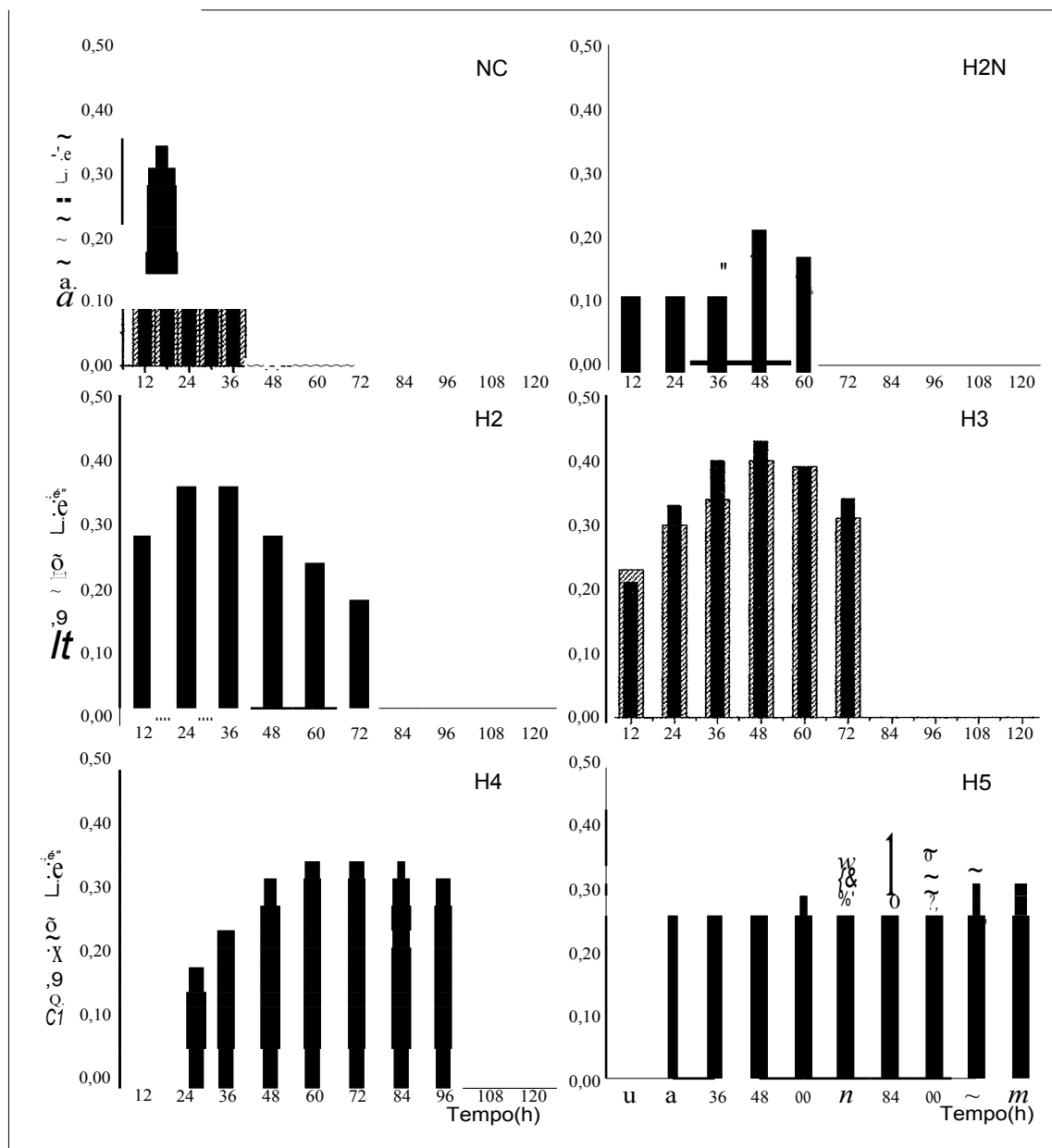


Figura 17 - Produtividade volumétrica do xilitol observada durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Inóculo com células não adaptadas (1) e adaptadas (Wt) ao hidrolisado.

Com relação à eficiência de conversão de xilose em xilitol, apresentada na **Tabela 5**, observa-se que os maiores valores (-68%) são obtidos nas fermentações de hidrolisados com maior fator de concentração e em função da adaptação do inóculo, comprovando, conforme já observado por SILVA e AFSCHAR (1994), que a concentração inicial de xilose é um fator importante na

bioconversão de xilose em xilitol e que, segundo SENE et al. (2001), a adaptação do inóculo pode minimizar os efeitos inibitórios dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado, favorecendo a formação de xilitol.

Tabela 5 - Eficiência de formação de xilitol em relação ao valor teórico durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

Meios de fermentação	T} (% do valor teórico)												
	Tempo (h)												
	6	12	18	24	30	36	48	60	72	84	96	108	120
NC	71	72	60	53	49	44							
	0	32	38	35	34	28							
H2N	0	38	-	43	-	38	34	29					
	0	27	-	33	-	40	42	39					
H2	54	66		60		62	55	51	48				
	0	54	-	60	-	60	56	49	48				
H3	0	53	-	57	-	--			--				
	0	1											
H4	0	0		~		~	~	ffi	~	~	~		
	0	0											
H5	0	0		43		59	63	61	62	59	56	55	50
	0	0	-	56	-	68	61	62	66	68	65	67	65

(-) tempo não avaliado, (~) Inóculo adaptado.

Durante as fermentações foi possível constatar também que a levedura foi capaz de assimilar lentamente o ácido acético desde as primeiras horas de cultivo, independente do fator de concentração do hidrolisado (**Figura 18**). Observou-se maior assimilação do ácido acético nas fermentações dos hidrolisados NC, H2N e H3, quando da utilização de inóculo adaptado.

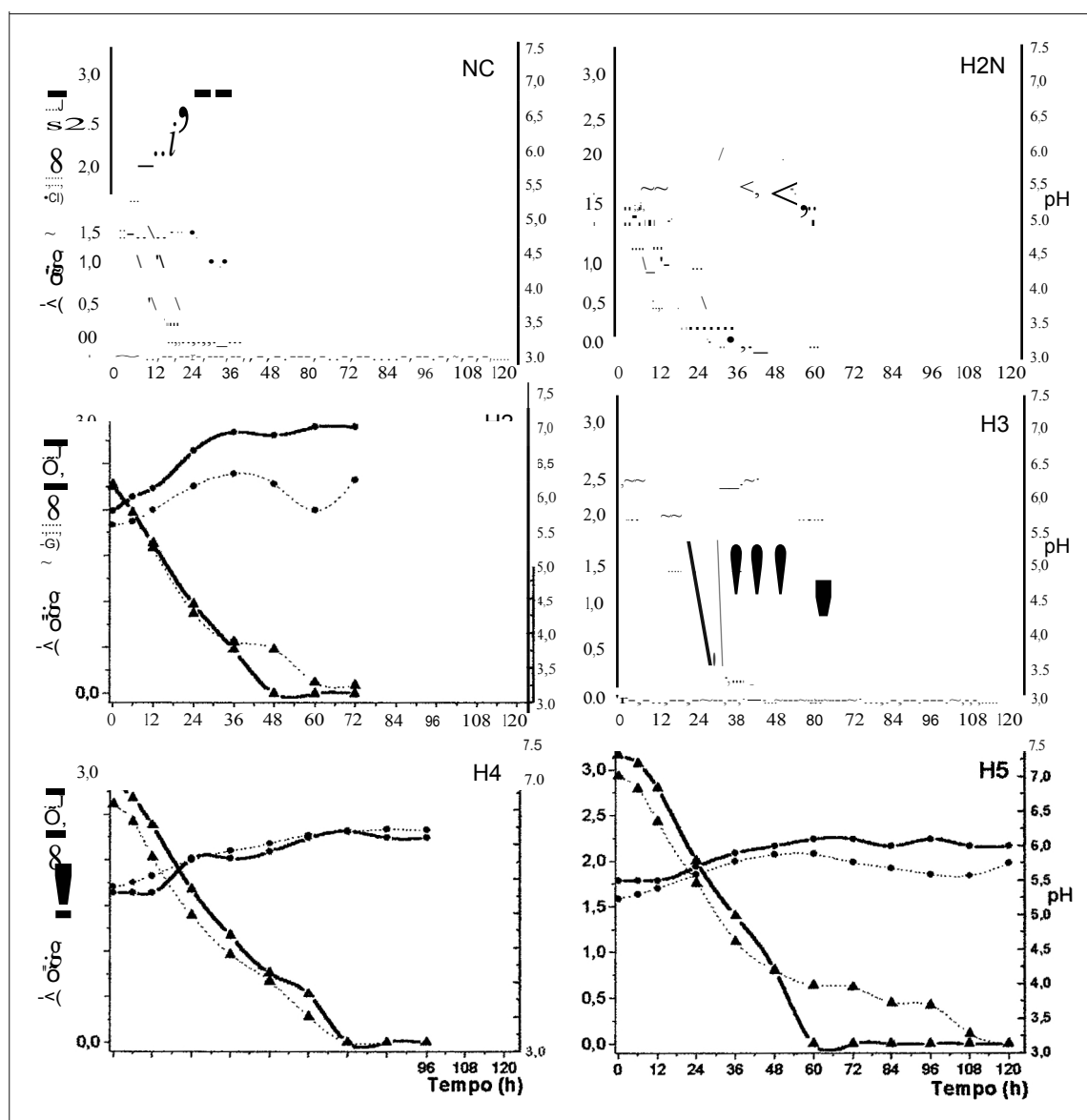


Figura 18 - Concentrações de ácido acético (●) e variação de pH (▲) durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Inóculo com células não adaptadas(—) e adaptadas (- - -) ao hidrolisado.

De acordo com os dados apresentados na **Figura 13** verifica-se também que, coincidentemente com o esgotamento da xilose, o ácido acético foi totalmente assimilado nos cinco diferentes meios empregados, também coincidindo com o aumento no pH do meio de fermentação (**Figura 18**). O consumo de ácido acético por *C. guilliermondii* também foi observado em meio semi definido por FELIPE et

ai. (1995) e em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por RODRIGUES et ai. (2003). De acordo com FELIPE et ai. (1997a) a inibição na conversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em presença de ácido acético foi observada em valores superiores a 3,0g/L, desta forma, as concentrações de ácido acético nos diferentes hidrolisados, apresentadas na **Tabela 2** sugerem que este pode não ser o principal componente inibidor ao metabolismo da levedura. LOHMEIER-VOGEL et ai. (1998) destacam, no entanto, que existem evidências de que pode ocorrer inibição da fermentação de hidrolisados hemicelulósicos em função do efeito sinérgico entre os diferentes componentes tóxicos presentes nestes meios.

Conforme podemos observar na **Figura 19**, durante a fermentação dos hidrolisados, além da formação de xilitol, também foi observada a formação dos subprodutos etanol e glicerol pela levedura. A máxima formação de etanol (2,14g/L) foi observada na fermentação do hidrolisado HS com a adaptação do inóculo. Verifica-se também que a formação de etanol ocorreu a partir das primeiras horas de cultivo em todos os meios, independente do fator de concentração do hidrolisado e da adaptação do inóculo, seguido de sua assimilação ao longo das fermentações. A formação de etanol pode estar relacionada ao consumo de glicose, hexose rapidamente assimilada pela levedura nas primeiras horas de fermentação, comportamento também observado na fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por *C. guilliermondii* por SENE et ai. (2001). Estes autores, no entanto, não observaram consumo do etanol formado ao longo da fermentação.

Quanto à formação de glicerol, composto formado durante a fermentação em todos hidrolisados, observa-se que (**Figura 19**) a máxima concentração (2,52g/L) foi obtida na fermentação do hidrolisado não tratado (H2N), sem a adaptação do inóculo. Observa-se também, nas fermentações sem a adaptação do inóculo, uma tendência de aumento na formação deste composto com o aumento do fator de concentração do hidrolisado, comprovando os relatos da literatura (NEVOIGHT e STAHL, 1997) de que o glicerol é um soluto compatível produzido em condições

adversas de cultivo. Também foi possível verificar que, houve menor formação de glicerol pela levedura em função da adaptação do inóculo, indicando que possivelmente esta técnica promoveu, uma diminuição do efeito dos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados sobre o metabolismo.

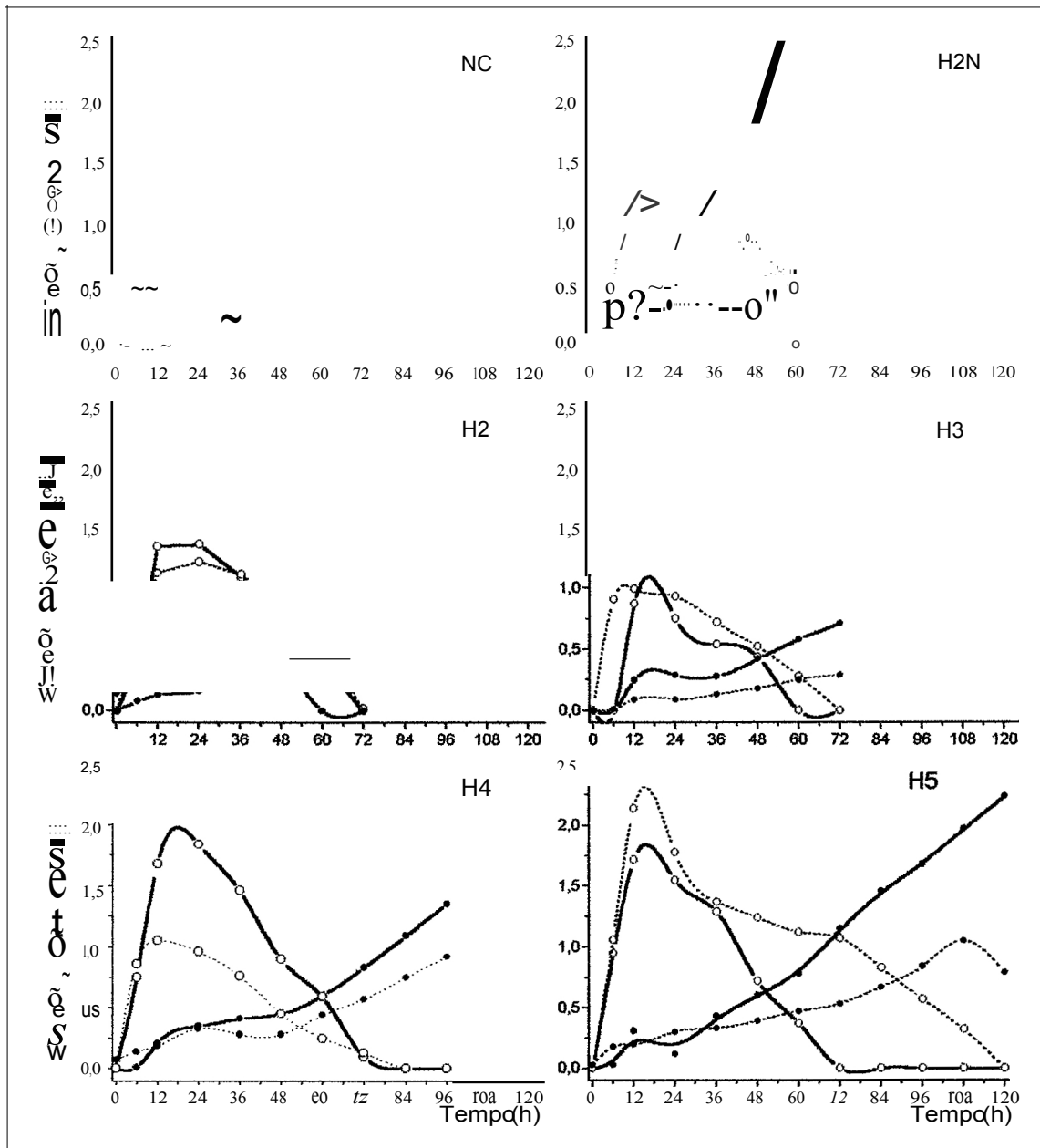


Figura 19 - Concentrações de etanol {o} e glicerol {•} durante fermentações dos hidrolisados hemícélulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Inóculo com células não adaptadas (-) e adaptadas (- -) ao hidrolisado

Na **Tabela 6** estão apresentados os parâmetros fermentativos nos tempos em que observou-se a maior formação de xilitol. Observa-se que na fermentação controle, realizada em meio semi definido, foram observados os melhores valores destes parâmetros.

Tabela 6 - Parâmetros fermentativos observados durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

	MS	NC	H2N						H2N	H2	H3	H4	H5	
Tempo (h)	24	24	60						48	48	60	96	108	
Xilose inicial	33,0	15,0	28,8						3,6	30,1	27,4	38,9	52,9	64,1
Cons. xilose (%)	77,7	89,5	83,8						93,9	88,8	98,6	93,8	90,4	98,3
Xilitol (g/L)	17,0	6,5	6,4	15,8	24,3	30,1	26,4	4,0	10,3	13,8	23,3	28,0	38,9	
Y _{Pts} (g/g)	0,62	0,49	0,27	0,50	0,57	0,52	0,46	0,31	0,38	0,51	0,62	0,59	0,62	
Q _p (g/L.h ⁻¹)	0,66	0,27	0,11						0,13	0,21	0,29	0,39	0,29	0,36
Y _{t/s} (g/g)	0,19	0,46	0,37						0,50	0,25	0,38	0,26	0,26	0,21

= Inóculo adaptado.

De acordo com a **Tabela 6**, tanto os valores de rendimento como de produtividade do xilitol observados nas fermentações dos hidrolisados são inferiores aos obtidos em meio semi definido. A adaptação do inóculo, no entanto, foi capaz de melhorar este comportamento, uma vez que em função desta técnica, o rendimento do xilitol alcançou o valor de 0,62g/g, também observado em meio semi definido. Quanto à produtividade, a adaptação do inóculo promoveu favorecimento deste parâmetro nos hidrolisados H2N e HS, indicando que a taxa metabólica de conversão é favorecida com a adaptação do inóculo, no entanto, os compostos tóxicos presentes no hidrolisado ainda interferem no metabolismo da levedura e os valores ainda são inferiores aos observados em meio semi definido. Os valores de produtividade observados em função da adaptação do inóculo

atingiram valores de até 0,39g/L-h⁻¹ (hidrolisado H3, **Tabela 6**), corresponde a 40% do valor (0,66g/L-h⁻¹) alcançado em meio semi definido. Ainda nesta tabela observa-se que o menor valor para o rendimento em células foi de 0,19g/g, obtido em MS, o que vem a comprovar que a bioconversão de xilose em xilitol foi favorecida neste meio.

Em comparação à condição em que foi utilizado o inóculo com células não adaptadas, é possível observar ainda que a adaptação do inóculo promoveu melhoria de 61% na formação de xilitol no hidrolisado H2N e de 47% no hidrolisado HS, também sendo observada redução na formação de glicerol nestes meios.

Correlacionando-se os dados apresentados sobre a formação de xilitol (**Figura 12**) com a presença de fenóis totais e ácido acético no hidrolisado (**Tabela 2**) observa-se que o efeito inibitório no metabolismo da levedura está relacionado principalmente com a elevada concentração dos compostos fenólicos, uma vez que a melhoria na assimilação de xilose e formação de xilitol em função da adaptação do inóculo foi observada na fermentação dos hidrolisados com maior concentração de fenóis totais.

Com base nos resultados observados é possível relacionar a formação de glicerol como resposta ao estresse celular, apontando os compostos fenólicos como principais interferentes e a adaptação celular como técnica capaz de minimizar o efeito destes tóxicos no metabolismo da levedura. Segundo PALMQVIST et al. (2000), o efeito inibitório dos compostos fenólicos ocorre devido à capacidade destes compostos associarem-se à membranas biológicas, causando perda de integridade.

4.4 - EFEITO DA ADAPTAÇÃO DO INÓCULO NAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE

Os resultados referentes às atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) nas fermentações dos diferentes hidrolisados com ou sem a adaptação do inóculo estão apresentados nas **Figuras 20 e 21**.

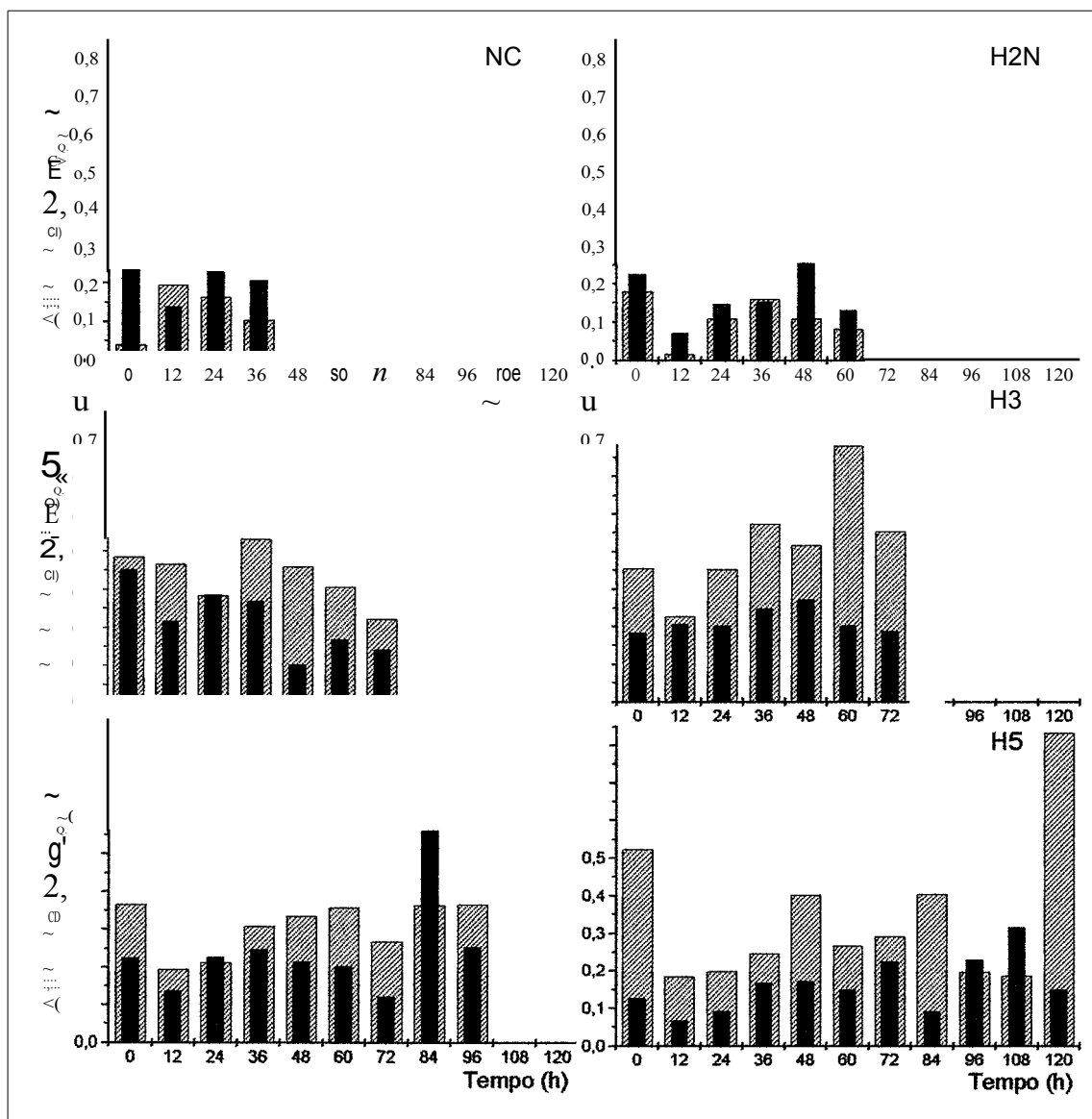


Figura 20 - Atividade da enzima xilose redutase de *Candida guilliermondii* durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Fermentações com inóculo adaptado (1) e não adaptado (~).

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 20** observa-se que a máxima atividade da enzima XR (0.8327U/mgPRor) foi observada após 120 horas na fermentação do hidrolisado HS sem a adaptação do inóculo, coincidindo com o esgotamento da xilose no meio de fermentação. Assim como na fermentação do hidrolisado HS, ao final da fermentação do hidrolisado H3 (60 horas) foi observada

a maior atividade da enzima XR (0,6808U/mgPRor), também sem a adaptação do inóculo (**Figura 12**). Por outro lado a adaptação do inóculo favoreceu a atividade da enzima XR nas fermentações dos hidrolisados NC e H2N (**Figura20**).

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 20** observa-se também que a máxima atividade da enzima XR em função da adaptação do inóculo (0,5628U/mgPRor), verificada na fermentação do hidrolisado H4. Verifica-se ainda que as máximas atividades enzimáticas são observadas coincidentemente com os tempos de máxima formação de xilitol pela levedura, com exceção do hidrolisado H2 (**Tabela 6**). Observa-se (**Figura 20**) uma tendência de melhoria nas atividades da enzima XR de *C. guilliermondii* a partir das primeiras horas de fermentação, comportamento também descrito para a levedura *Pachysolen tannophilus* (DITZELMULLER et al., 1984) e *C. guilliermondii* (RODRIGUES, 2002).

A máxima atividade da enzima XDH (0,4592U/mgPRor) foi observada após 96 horas de fermentação do hidrolisado H4 com a utilização do inóculo adaptado (**Figura 21**). A adaptação do inóculo foi capaz de favorecer as atividades da enzima XDH de *C. guilliermondii*, principalmente nos hidrolisados NC, H2N, H4 e H5.

De acordo com os dados apresentados nas **Figuras 20 e 21**, nas fermentações dos hidrolisados com maior fator de concentração (H3, H4 e H5) observa-se, em relação ao início da fermentação, uma tendência de diminuição nas atividades das enzimas XR e XDH, seguido de uma tendência de aumento ao longo da fermentação. Possivelmente a queda inicial nas atividades enzimáticas ocorra devido à presença de glicose, enquanto que o posterior aumento tenha relação com o esgotamento da glicose e à necessidade de assimilação de xilose pela levedura. Este comportamento também foi observado em *C. guilliermondii* por RODRIGUES (2002).

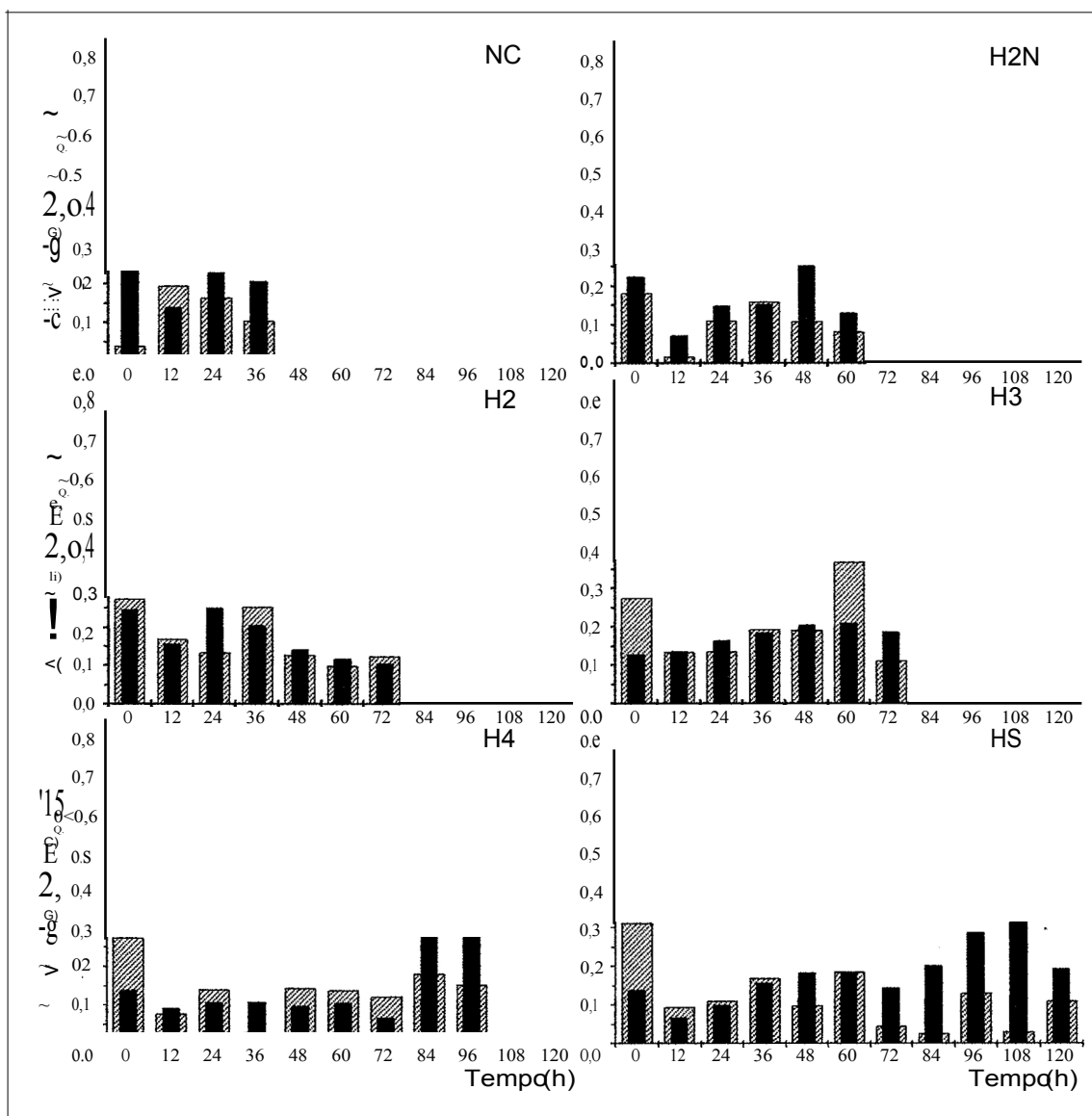


Figura 21 - Atividade da enzima xilitol desidrogenase de *Candida guillienondii* durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes. Fermentações com inóculo adaptado (1) e não adaptado (~).

Segundo os dados apresentados na **Tabela 7**, a média das atividades da enzima XR, observadas nas fermentações dos diferentes hidrolisados sem a adaptação do inóculo são semelhantes à observada em meio semi definido (0,3133U/mgPRor). Observa-se também que a adaptação do inóculo foi capaz de melhorar a atividade média da enzima XR no hidrolisado não tratado (H2N). De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 7**, supõe-se que a inibição da

atividade desta enzima está relacionada ao elevado teor de tóxicos neste tipo de hidrolisado. Estes resultados estão de acordo com os observados por ALVES et al. (2001) para a fermentação do hidrolisado de bagaço por esta levedura. Segundo ROSA et al. (1998), elevadas concentrações de xilose também podem interferir nas atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *C. guilliermondii*. Os autores observaram em meio semi definido contendo 60g/L de xilose, que as atividades destas enzimas foram 50% inferiores quando comparadas às observadas em meio contendo 15g/L desta pentose, enquanto que ALVES et al. (2001) observaram relação entre fator de concentração e as concentração de inibidores no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com queda nas atividades das enzimas XR e XDH de *C. guilliermondii*.

Tabela 7 - Atividade média da enzima xilose redutase de *Candida guilliermondii* durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

	Atividade XR (U/mgPRor)		Atividade XDH (U/mgPRor)	
	N	A	N	A
MS	0,3133		0,2330	
NC	0,3528	0,3717	0,1260	0,2167
H2N	0,1595	0,2588	0,1094	0,1635
H2	0,3362	0,2196	0,1686	0,1746
H3	0,4224	0,2153	0,2002	0,1729
H4	0,3082	0,2438	0,1390	0,1733
H5	0,3392	0,1625	0,1185	0,1861

N = inóculo não adaptado, A = Inóculo adaptado

Quanto à atividade da enzima XDH, os dados apresentados na **Tabela 7** demonstram, assim como observado para a enzima XR, que a atividade média observada nos cultivos em hidrolisados foi inferior à observada em MS. A adaptação foi capaz de melhorar o desempenho médio da enzima no cultivo em

hidrolisados, com exceção da fermentação no hidrolisado H3. Não foi observada, no entanto, relação entre o fator de concentração do hidrolisado com a redução nas atividades médias desta enzima, diferente do observado por ALVES et al. (2001).

4.5 - FERMENTAÇÕES COM RECICLO DE CÉLULAS

As fermentações realizadas com reciclo de células tiveram a finalidade de avaliar o comportamento da levedura, frente a reutilização de células em sucessivas etapas de fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados quanto à assimilação de xilose e formação de xilitol, apresentados na **Figura 22A e 8** demonstraram que houve uma lenta assimilação da xilose nas primeiras 12 horas de fermentação (**Figura 22A**), comportamento semelhante ao observado nas fermentações em que se avaliou a adaptação do inóculo. Também foi observado maior consumo de xilose nas duas primeiras fermentações com reciclo de células (R1 e R2) (**Figura 22B**).

De acordo com os dados apresentados na **Figura 228**, observa-se que a maior formação de xilitol (47,64g/L) ocorreu na terceira fermentação com reciclo de células (R3). Comparando-se a formação de xilitol nas fermentações do hidrolisado H5 sem adaptação de inóculo (26,4g/L, **Tabela 6**) com a obtida com o reciclo de células (27,15 a 47,64g/L; **Figura 228**) observa-se uma melhoria entre 2,8 e 80,5% na formação de xilitol em função do reciclo, demonstrando que a adaptação do inóculo juntamente com o reciclo de células favorece a formação de xilitol no hidrolisado com elevado fator de concentração. O favorecimento na formação de xilitol por *C. guilliermondii* em função da reutilização de células na fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar também foi verificado por outros autores (SENE et al., 1998; SILVA et al., 1999; CARVALHO et al., 2002).

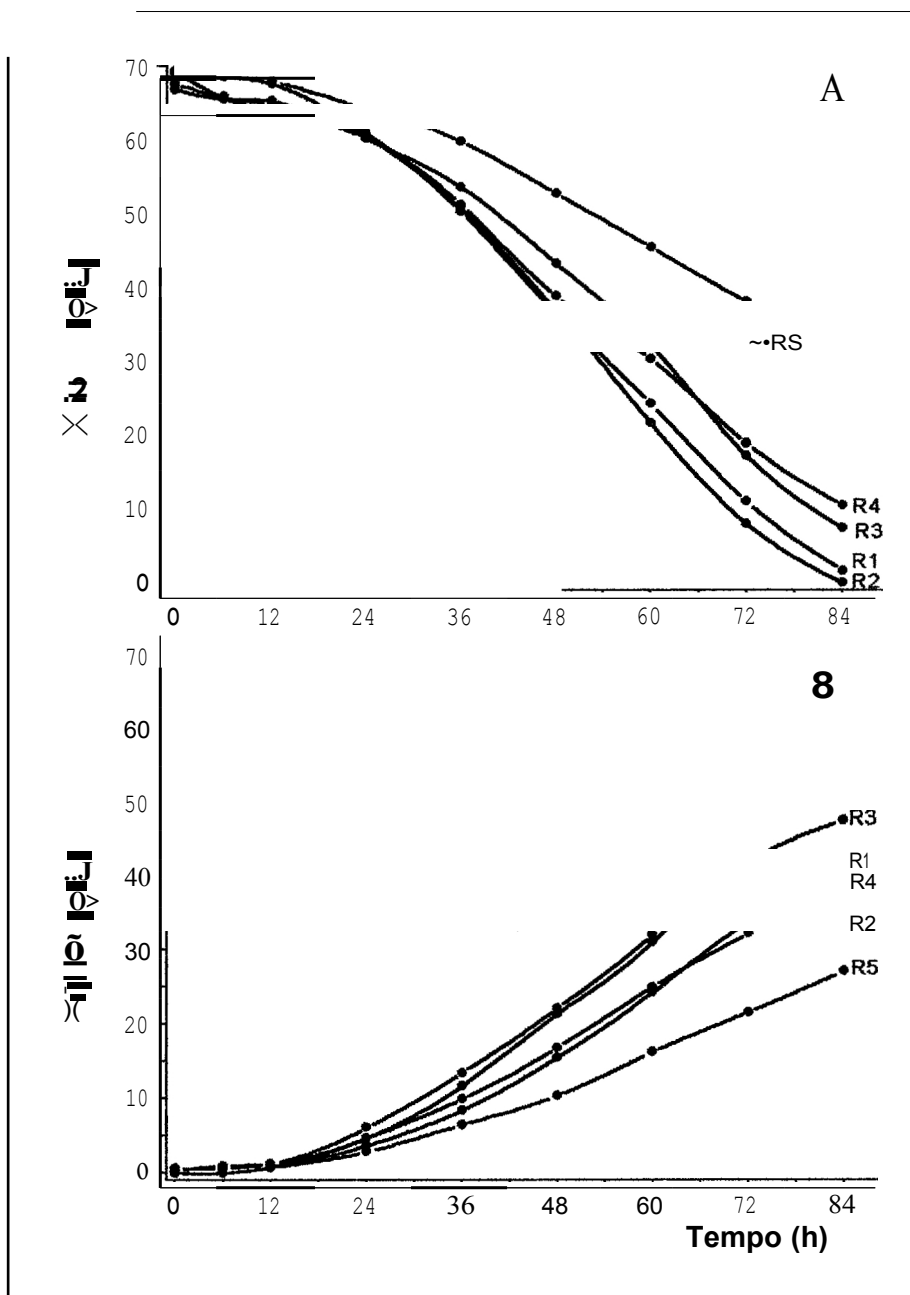


Figura 22 - Assimilação de xilose (A) e formação de xilitol (B) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Foi observado que na segunda fermentação com reciclo de células (R2) o xilitol foi assimilado pela levedura após 72h de cultivo (**Figura 228**), comportamento também observado nas fermentações do meio semi definido e dos hidrolisados, independente da adaptação do inóculo (**Figuras 8 e 12**). Em todas estas condições o consumo do xilitol ocorreu nas últimas horas de fermentação, coincidente ao consumo superior a 96% da xilose presente no meio.

Comportamento semelhante também foi observado em *C. guilliermondii* por RODRIGUES et al. (2003).

Observa-se na **Figura 23** que durante todo o processo de reciclo a glicose foi totalmente consumida nas primeiras horas de fermentação, comportamento semelhante ao observado nas fermentações em meio semi definido e em hidrolisado durante a avaliação da adaptação do inóculo, conforme já apresentado anteriormente. Devido à baixa concentração de glicose nos hidrolisados e devido ao seu rápido consumo não foi possível estabelecer uma relação entre o reciclo de células e a assimilação desta hexose.

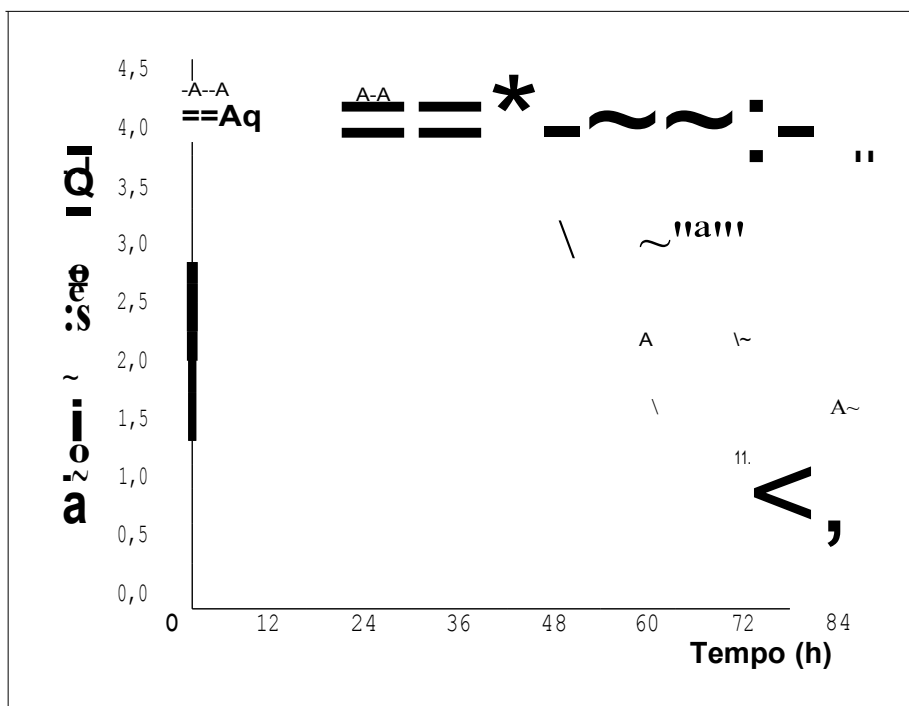


Figura 23 - Assimilação de glicose (•) e arabinose (à) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Com relação ao consumo de arabinose, observa-se uma lenta assimilação desta pentose durante as fermentações com reciclo de células (**Figura 23**). Em todas as etapas do reciclo o consumo de arabinose foi menor que 1,0g/L nas primeiras 36 horas de cultivo, semelhante ao observado por SENE (1996). O

consumo mais acentuado desta pentose ao final da fermentação R2 parece estar associado ao esgotamento da xilose do meio de fermentação, no entanto, as fermentações R4 e R5 não apresentam esta correlação. Desta forma, o aumento da assimilação de arabinose ao longo da reciclagem de células (**Figura 23**) indica uma alteração no metabolismo da levedura, o qual pode estar associado à escassez nutricional ou ao elevado tempo de exposição das células aos compostos tóxicos do hidrolisado.

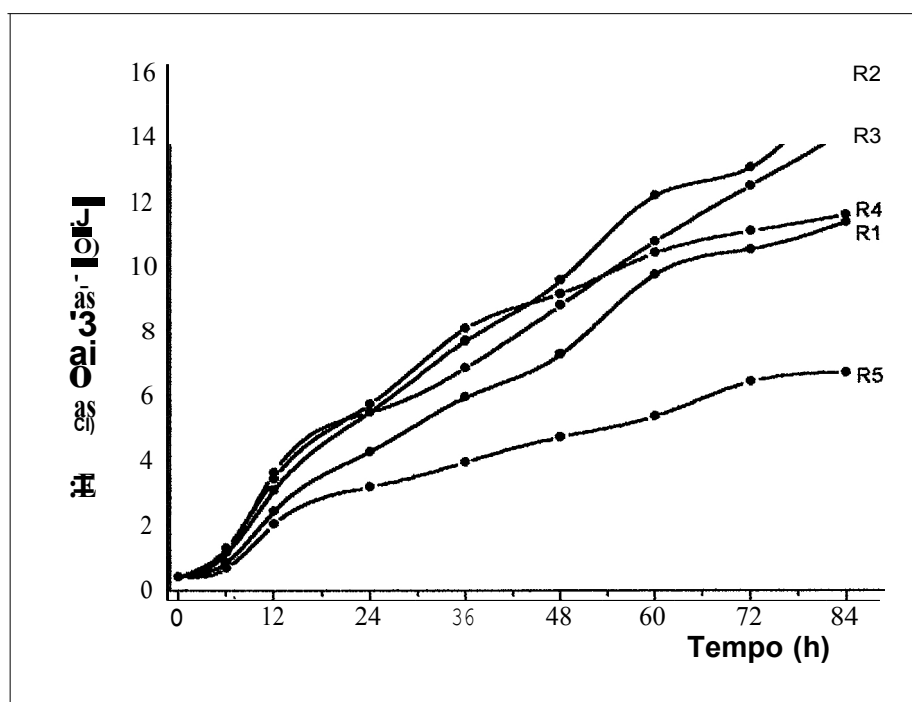


Figura 24 - Massa celular formada durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guillienondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Quanto ao crescimento celular, observa-se (**Figura 24**) que a fermentação R2 apresentou maior formação de massa celular (15,97g/L). Durante as quatro primeiras fermentações com reciclo a formação de massa celular foi semelhante, enquanto que na quinta fermentação (R5) foi observada menor formação, em relação às fermentações anteriores. Os resultados apresentados na **Figura 24** em relação ao crescimento celular podem ser correlacionados com os observados na **Figura 22** quanto à assimilação de xilose e formação de xilitol, indicando que na

segunda e terceira reciclagem de células a atividade metabólica da levedura foi favorecida, apresentando maior assimilação de xilose, formação de xilitol e células. Observando-se também diminuição destes parâmetros também na fermentação R5.

De acordo com a **Tabela 8**, a velocidade de assimilação de xilose é superior à de arabinose em todas as etapas de reciclo, entretanto, verifica-se uma progressiva redução ao longo das fermentações com reciclo de células. Estes resultados diferem dos observados em *C. guilliermondii* por SENE et al. (1998) e CARVALHO et al. (2002), no entanto, o fator de concentração do hidrolisado e tempo de fermentação utilizados por estes autores (concentração semelhante ao H3 com ciclos de 48h de fermentação) foram inferiores ao deste trabalho (H5 com ciclos de 84 horas).

Tabela 8-Velocidades de consumo M de xilose e arabinose, taxa de formação de células (O_x) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Fermentação	VXJLose (g/L·h⁻¹)	VARABINose (g/L·h⁻¹)	Qx (g/L-h⁻¹)
R1	0,71	0,009	0,13
R2	0,82	0,028	0,19
R3	0,80	0,003	0,16
R4	0,68	0,043	0,13
R5	0,44	0,020	0,07

Os dados apresentados na **Tabela 8** demonstram que, ao contrário do observado para assimilação de xilose, a assimilação da arabinose pela levedura não diminui ao longo das etapas de reciclo celular. Também é possível observar que não houve correlação entre o aumento da velocidade de assimilação de arabinose nas fermentações R4 e R5 com a taxa de crescimento celular. De acordo com KONDARZEWKY et al. (2003), a formação de células de *C.*

guilliermondii é favorecida em fermentações onde a concentração de arabinose é superior à de xilose.

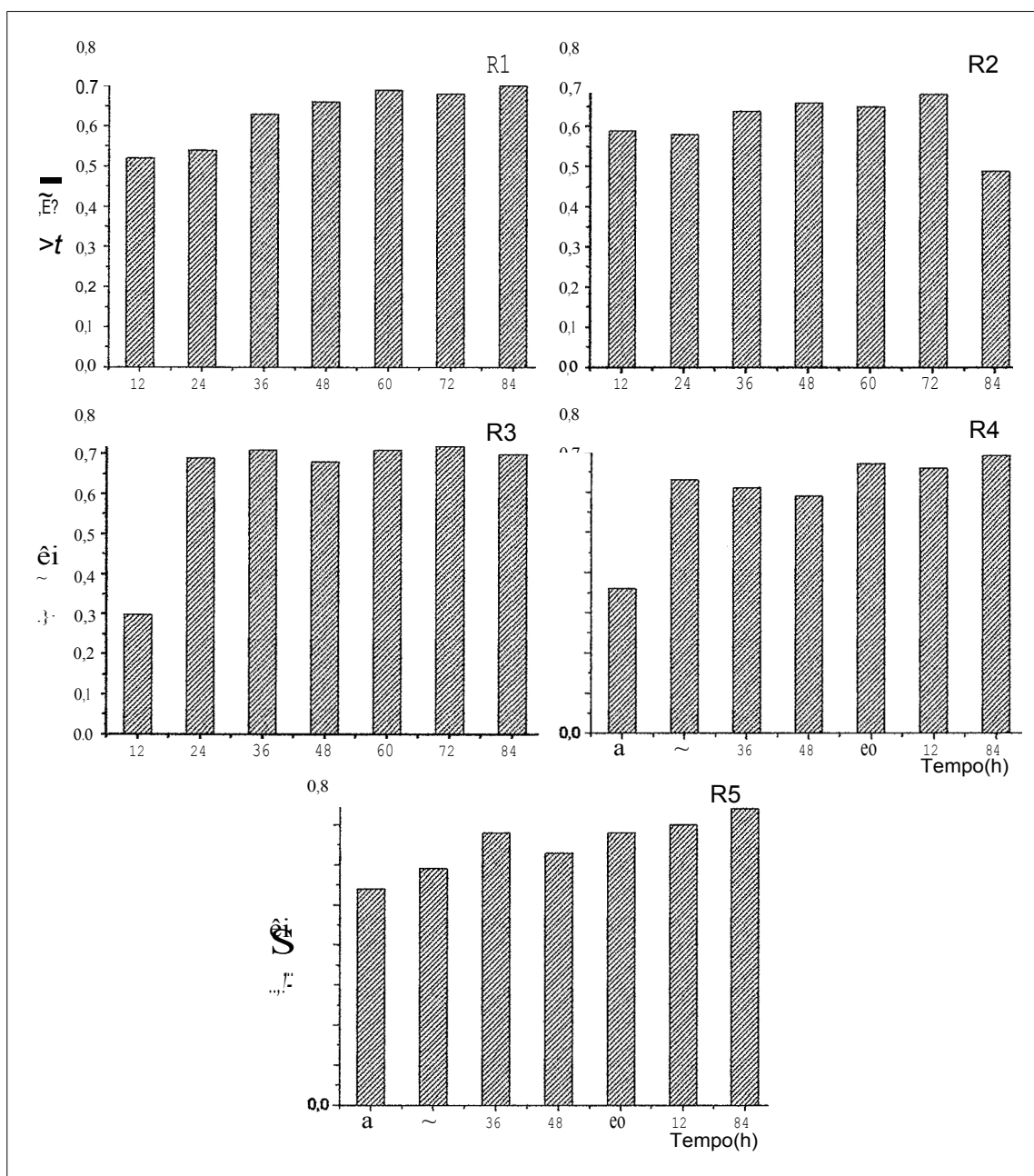


Figura 25 - Rendimento do xilitol (YPls) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-da-açúcar.

De acordo com os dados apresentados na **Figura 25** observa-se que o maior rendimento do xilitol (0,74g/g) é alcançado na quinta etapa de reciclo (R5) com 84 horas de fermentação, correspondendo a uma eficiência de conversão de 80,2%

em relação ao valor teórico (**Tabela 9**). Este resultado é superior inclusive ao observado na fermentação em meio semi definido onde o maior valor foi de 0,68g/g porém após 12 horas de cultivo (**Tabela 3**). Observa-se ainda na **Figura 24** que os valores de rendimento do xilitol são semelhantes ao longo das fermentações com reciclo celular.

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 9** em relação à eficiência de conversão de xilose em xilitol verifica-se que o reciclo favoreceu a conversão de xilose em xilitol, sendo obtida uma conversão superior 74% em todas as etapas de reciclo, sendo inclusive superiores à observada em meio semi definido (74,4%). Valores próximos a 80% de conversão foram observados em quase todos os tempos de fermentação com reciclo de células. A eficiência de conversão observada também é superior ao valor de 69% observado por SENE et al. (1998) pelo reciclo de *C. guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana no fator de concentração semelhante ao R3.

Tabela 9 - Eficiência de conversão de xilose em xilitol em relação ao valor teórico durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

11 (% do valor teórico)								
Fermentação	Tempo (h)							
	6	12	24	36	48	60	72	84
R1	0,0	56,4	59,0	68,9	71,6	75,7	74,1	76,7
R2	0,0	64,1	62,7	69,3	72,5	71,0	74,6	53,6
R3	21,4	33,1	75,4	77,4	73,9	77,2	78,7	76,7
R4	60,3	38,9	68,5	66,3	64,1	72,7	72,0	75,4
R5	0,0	58,5	64,0	74,1	68,2	74,5	76,0	80,2

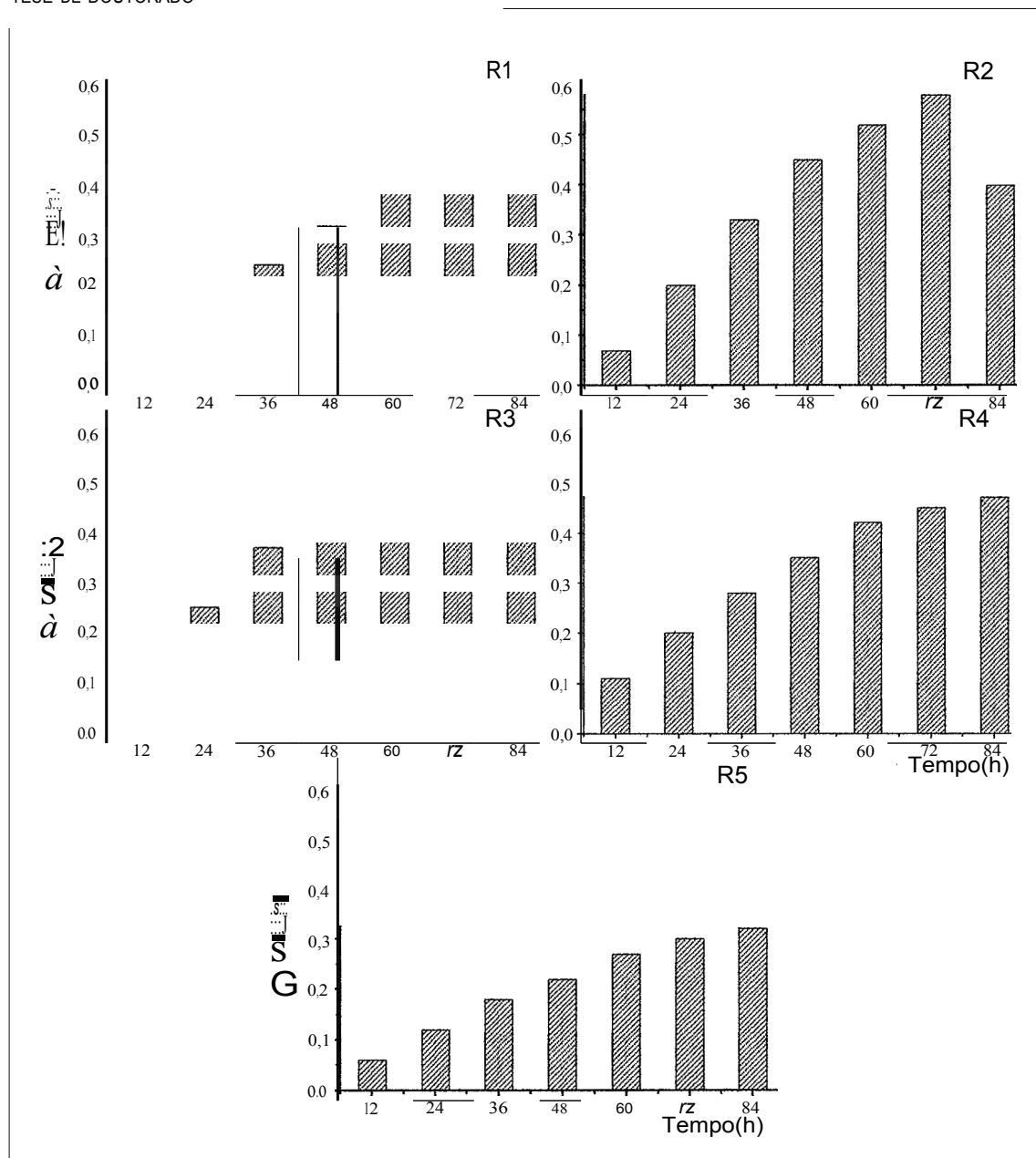


Figura 26 - Produtividade volumétrica do xilitol (Q_p) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

De acordo com os dados apresentados na **Figura 26**, observa-se que os máximos valores de produtividade de xilitol ($0,58$ e $0,59\text{g/L-h}^{-1}$) foram observados em 72horas nas fermentações R2 e R3, respectivamente, coincidindo com as fermentações em que foi observada maior formação de xilitol pela levedura (**Figura 228**). Estes valores representam uma melhoria de 118% em relação ao obtido na fermentação do hidrolisado H5 (**Figura 18**). Uma comparação entre os parâmetros

de rendimento e produtividade do xilitol ao longo de cinco fermentações com reciclo de células (**Figuras 25 e 26**) aponta que, embora o rendimento seja mantido ao longo das fermentações, a produtividade apresenta queda nas fermentações R4 e R5, sendo esta redução também refletida na formação de xilitol. Destaca-se que, devido ao elevado fator de concentração do hidrolisado utilizado neste trabalho (H5) o tempo de fermentação para que ocorra o consumo da xilose também sumo, de forma que foram necessárias 420 horas de cultivo para a realização das cinco fermentações consecutivas, o que possivelmente permitiu observar o máximo desempenho da levedura (fermentação R3) e a redução da produtividade em função da reutilização de células por um longo período de tempo. A manutenção no rendimento do xilitol ao longo de cinco fermentações com reciclo de células de *C. guilliermondii* no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar também foi observada por SENE et al. (1998) e CARVALHO et al. (2002), no entanto, a redução na produtividade observada a partir do terceiro reciclo (R4 e R5) não foi observada por estes autores, possivelmente pela realização de fermentações em hidrolisado com um menor fator concentração, o que permitiu acompanhar o reciclo por 240 horas de cultivo.

A Figura 27 apresenta uma comparação dos parâmetros observados durante as fermentações com ou sem a adaptação do inóculo e com o reciclo de células. Observa-se que ocorreu o favorecimento da produtividade e rendimento do xilitol em função da adaptação do inóculo assim como do reciclo de células, destacando-se o reciclo como a técnica que apresentou os melhores resultados e a produtividade como o parâmetro mais favorecido. Além de reduzir em 36 horas o tempo para a máxima obtenção deste adoçante na fermentação do hidrolisado H5, o reciclo de células favoreceu o rendimento do xilitol em 27,6% e produtividade em 11815%, comparando-se com os resultados observados na fermentação sem adaptação ou reciclo de células (**Figura 27**).

Possivelmente a adaptação e reciclo de células minimizou os efeitos dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado, favorecendo a atividade metabólica

da levedura neste meio e refletindo no aumento da velocidade de assimilação de xilose, conforme já demonstrado na **Tabela 8**. Em função de uma conversão favorável ($Y_{p/s}$ superior a $0,6g1g^{-1}$), a maior velocidade de assimilação de xilose reflete também em uma maior velocidade de formação de subproduto (xilitol). Desta forma, a melhoria na produtividade observada em função da adaptação do inóculo e reciclo de células é resultado de uma conversão mais eficiente combinada a uma maior assimilação de xilose.

De acordo com os dados apresentados na **Figura 27** é possível verificar também que os melhores resultados de produtividade com o reciclo de células, embora favoráveis ao processo industrial, ainda são 12% inferiores ao máximo valor observado em meio semi definido ($0,66g/Lh^{-1}$; **Tabela 3**), indicando que a presença de inibidores nos hidrolisados é um fator que, mesmo sendo parcialmente contornado com a utilização de adaptação do inóculo e reciclo de células, continua interferindo na bioconversão de xilose em xilitol pela levedura, em comparação aos resultados obtidos em meio na ausência de inibidores.

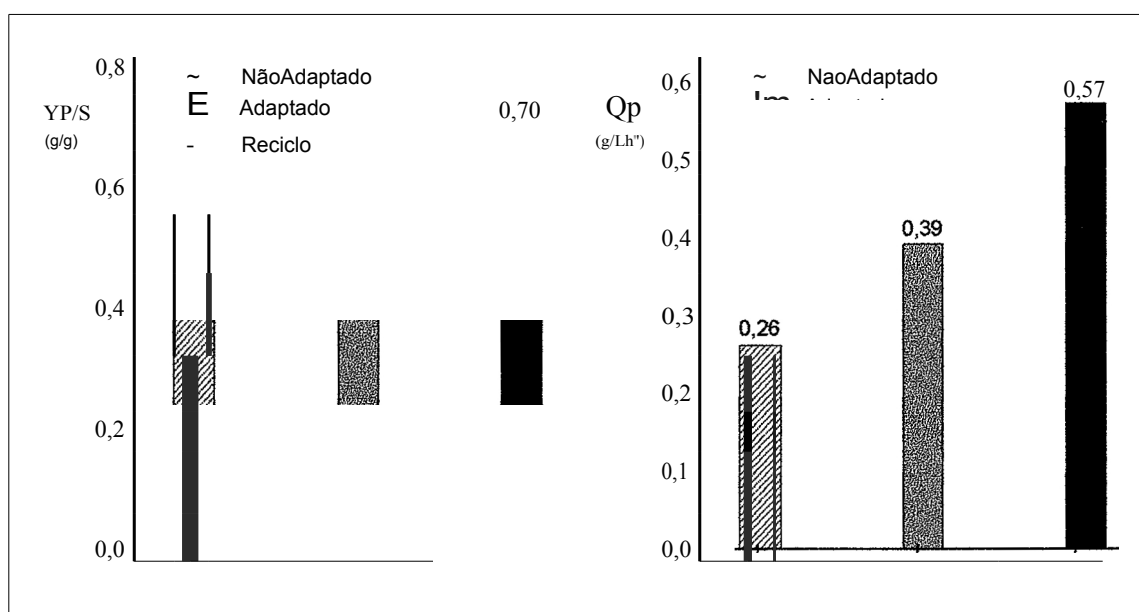


Figura 27 - Rendimento ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica de xilitol (Q_p) em fermentações com ou sem adaptação do inóculo ou reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Em relação ao ácido acético, os dados apresentados na **Figura 28A** indicam que ocorreu assimilação deste ácido durante as primeiras 36 horas de fermentação, independente da etapa de reciclo, sendo possível observar o aumento do pH (**Figura 28B**) no meio de fermentação como consequência desta assimilação.

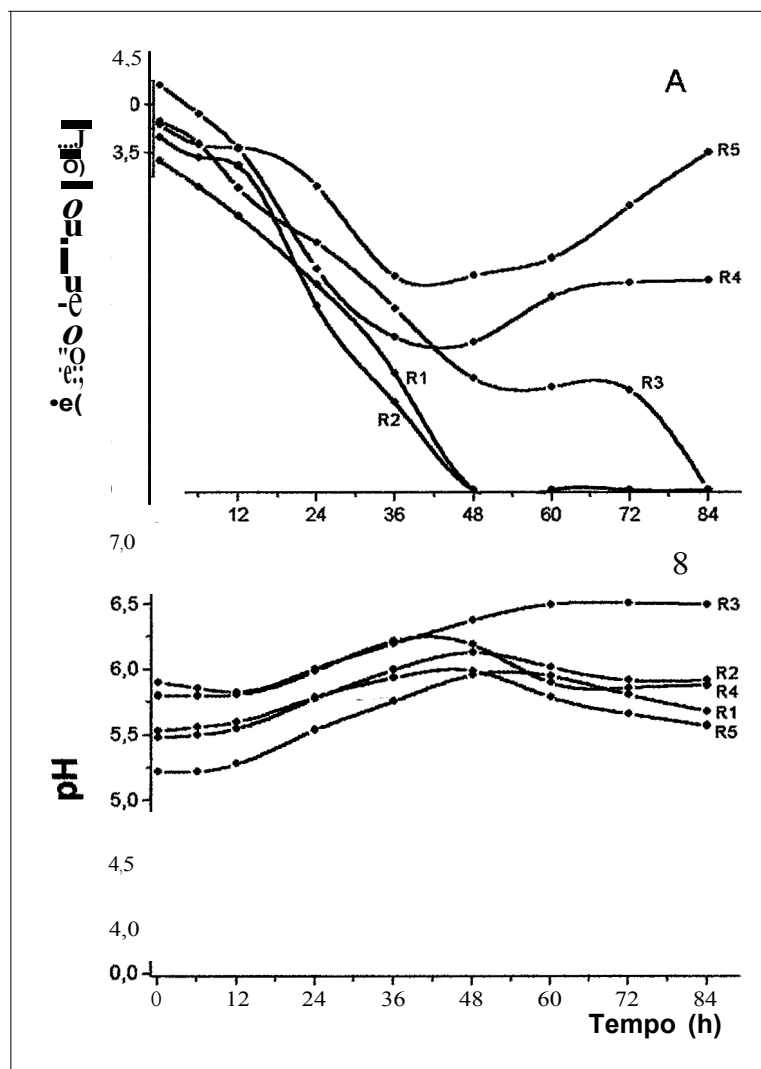


Figura 28 - Concentrações de ácido acético (A) e pH (B) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

De acordo com os dados apresentados na **Figura 28B**, observa-se que o pH manteve-se em torno de 5,0 a 6,0. A terceira fermentação com reciclo de células (R3) alcançou valor de pH superior ao observado em outras etapas de reciclo.

Estes resultados estão de acordo com os observados por SENE et al. (1998) onde a variação de pH em fermentações com reciclo celular ficou entre 5,1 e 7,3; sendo o maior valor observado na terceira etapa de reciclo.

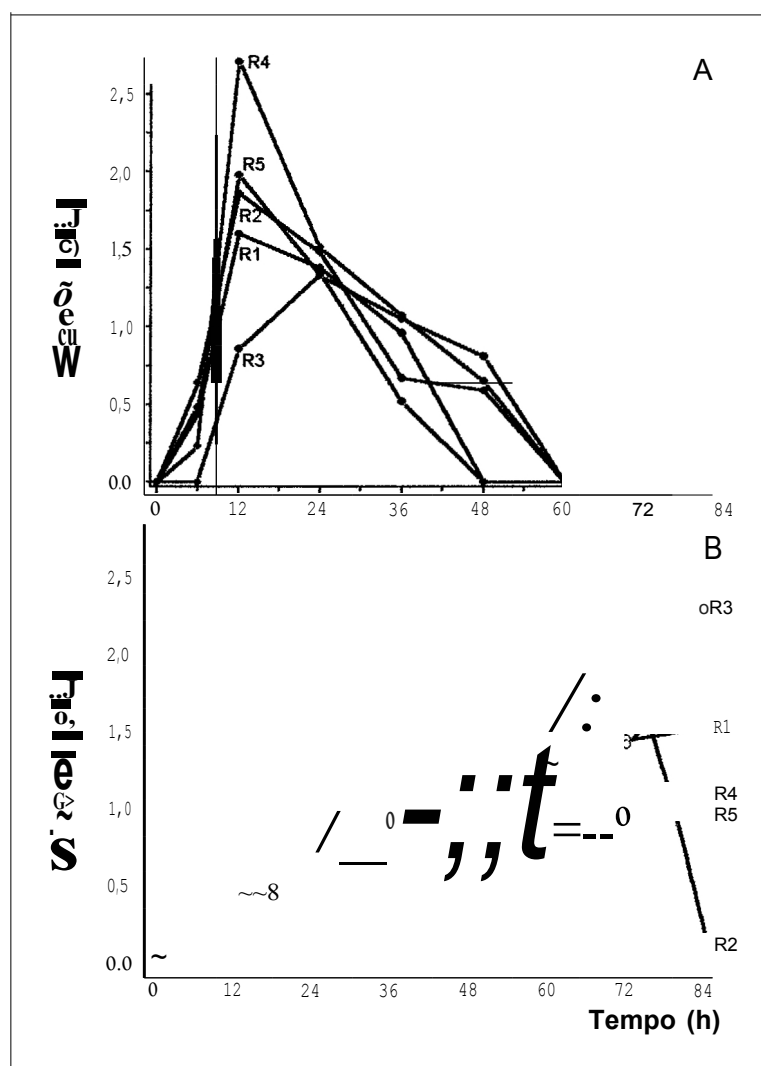


Figura 29 - Concentrações de etanol (A) e glicerol (B) durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Assim como observado durante a avaliação da adaptação do inóculo, foi possível observar a formação de etanol e glicerol durante as fermentações com reciclo de células (**Figura 29**). A formação de etanol é observada nas primeiras horas de fermentação, seguida de sua assimilação pela levedura, enquanto o glicerol é continuamente formado ao longo das fermentações com reciclo,

comportamento também observado na fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por *C. guilliermondii* por RODRIGUES et al. (2003). Foi observada a assimilação de glicerol pela levedura na fermentação R2 (**Figura 298**), estando relacionada com o esgotamento da xilose no meio de fermentação, comportamento também observado na fermentação do hidrolisado H5 em função da adaptação do inóculo.

Como a composição do hidrolisado é semelhante em todas as etapas do reciclo, a maior formação de glicerol observada nas três primeiras fermentações com reciclo de células (**Figura 298**) parece não estar diretamente ligada aos componentes do meio de fermentação mas sim com a maior assimilação de xilose pela levedura (**Figura 22**), indicando maior atividade metabólica e, conseqüentemente, maior formação de subproduto.

4.6 - EFEITO DO RECICLO DE CÉLULAS NAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE E XILITOL DESIDROGENASE

As atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) de *C. guilliermondii* foram determinadas durante as cinco fermentações sucessivas com reciclo de células em hidrolisado H5. De acordo com os resultados apresentados na **Figura 30** observa-se que a máxima atividade da enzima XR (0,3391 U/mgPRor) foi obtida após 60 horas na fermentação R1. Observa-se também que nos tempos em que foram observadas as máximas atividades desta enzima não correspondem aos que apresentaram maior rendimento do xilitol (**Figura 16**), comportamento também já observado em *C. guilliermondii* por SENE (2000) e LIMA (2002). A atividade da enzima XR apresentou redução ao longo das etapas de reciclo (**Figura 30**).

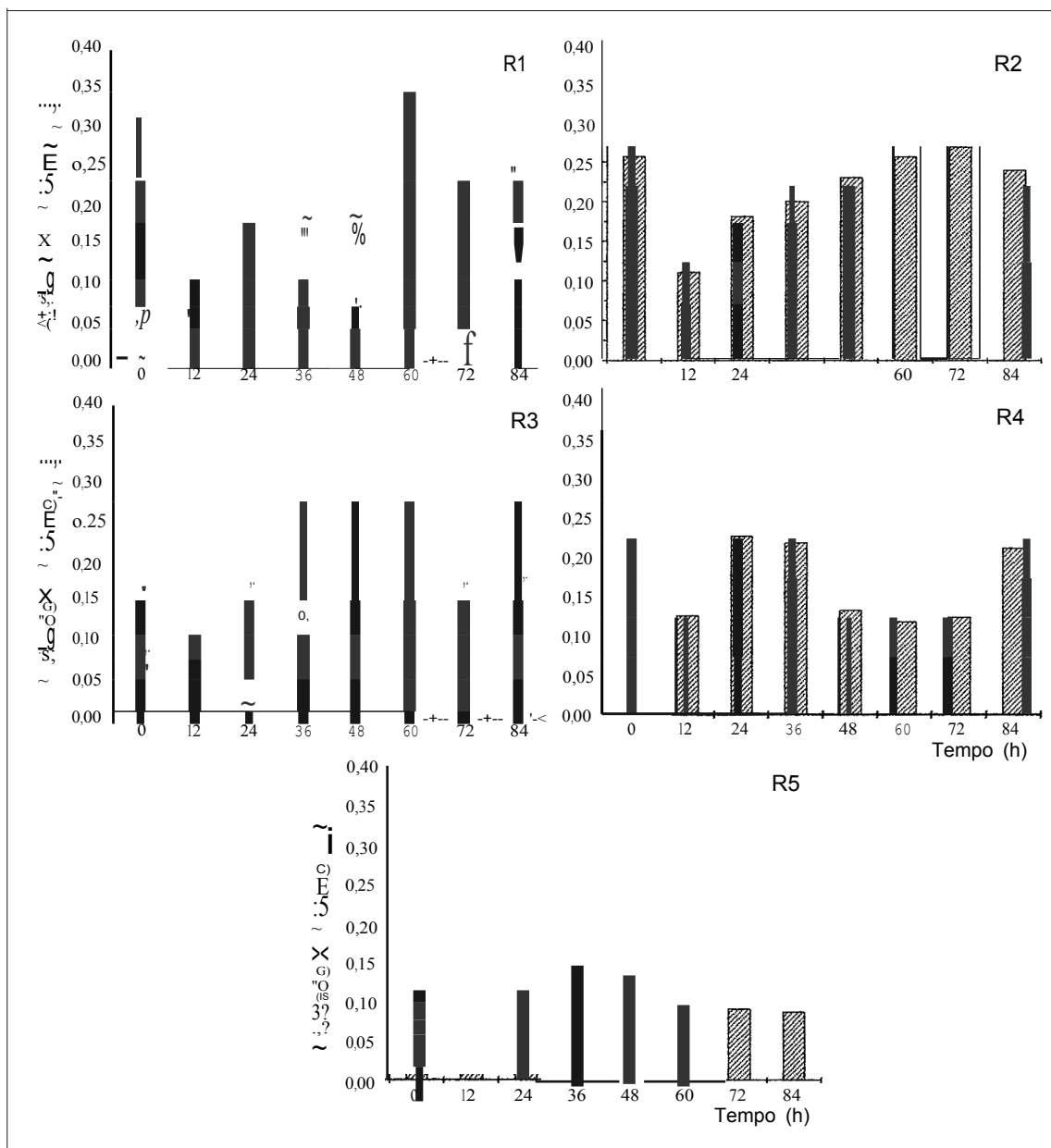


Figura 30 - Atividades da enzima xilose redutase de *Candida guilliermondii* durante cinco fermentações consecutivas com reciclo de células em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

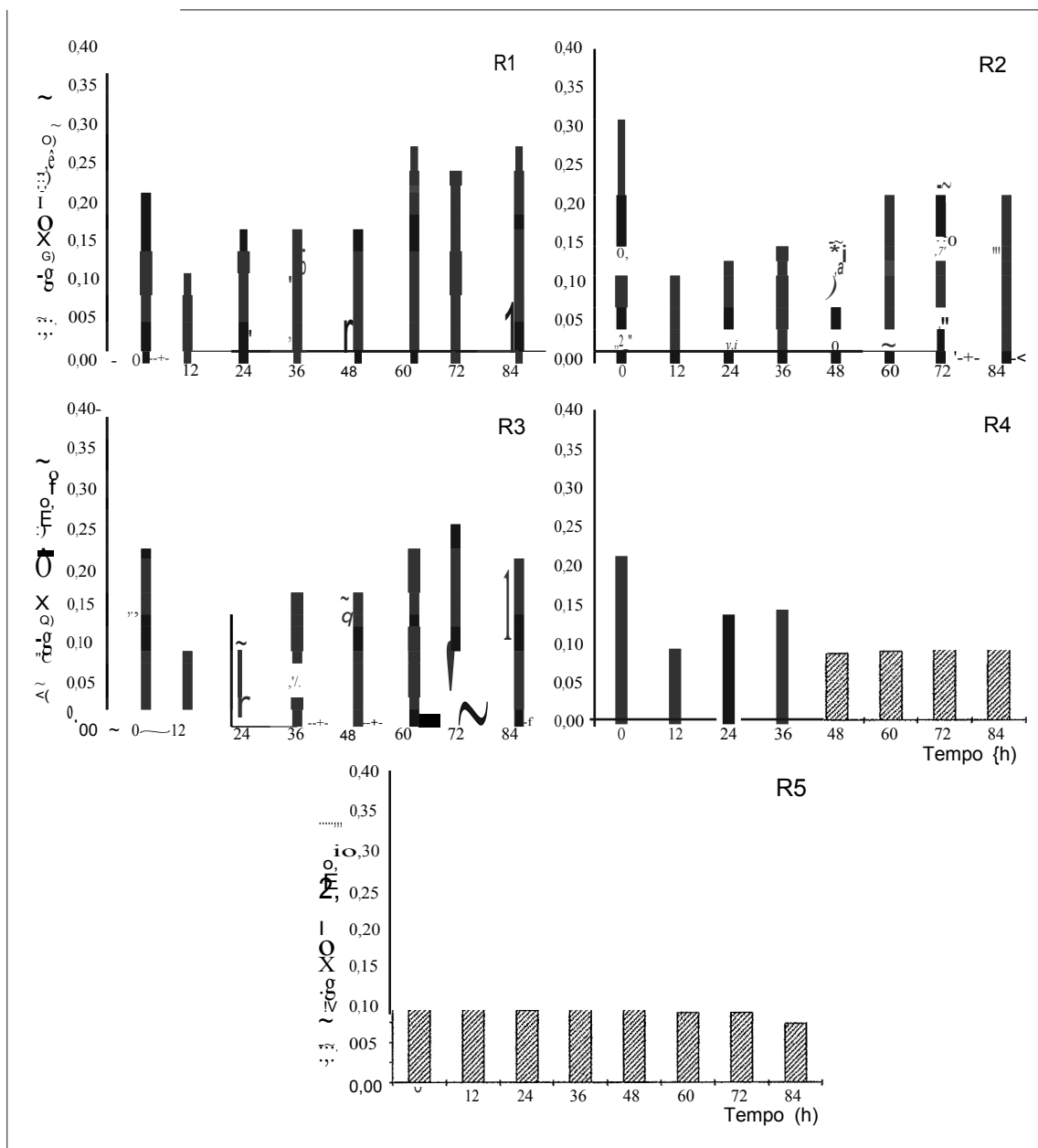


Figura 31 - Atividades da enzima xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* durante cinco fermentações consecutivas com reciclo de células em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

De acordo com os dados apresentados na **Figura31** observa-se que durante as fermentações com reciclo de células a maior atividade da enzima XDH (0,2638U/mgPRor) foi observada após 84 horas de cultivo na fermentação R1. Assim como para a enzima XR, a atividade enzima XDH apresentou redução ao longo das etapas de reciclo (**Figura31**).

A comparação das atividades da enzima XDH apresentadas na **Figura 31** com a velocidade de assimilação da xilose apresentada na **Tabela 8** evidencia a correlação entre a queda na atividade da enzima XDH com a queda da velocidade de assimilação de xilose na quarta e quinta fermentação com reciclo de células. Este comportamento pode estar relacionado ao longo tempo de exposição das células ao hidrolisado, uma vez que até a quarta etapa de reciclo, as células estão a 372 horas expostas aos compostos tóxicos, passando por um período de esgotamento da xilose durante o final da fermentação R2 (**Figura 19**). De acordo com os dados apresentados nas **Figuras 30 e 31** observa-se que o aumento das atividades específicas das enzimas XR e XDH nas fermentações R1, R2 e R3 estão relacionados com a fase exponencial de crescimento da levedura (**Figura 24**), comportamento também observado em *C. guilliermondii* por ROSA et al. (1998) e em *C. tenuis* por KERN et al. (1997).

Tabela 10 - Atividade média das enzimas XR e XDH de *Candida guilliermondii* durante cinco fermentações consecutivas com reciclo (R) de células em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

	Atividade (U/mgPRor)		
	XR	XDH	XR/XDH
R1	0,2338	0,1929	1,21
R2	0,2181	0,1886	1,16
R3	0,2293	0,1830	1,25
R4	0,1716	0,1200	1,43
R5	0,1107	0,0928	1,19

Os dados apresentados na **Tabela 10** demonstram que a atividade da enzima XR foi até 43% superior à da XDH nas cinco etapas de reciclo realizadas. Embora tenha sido observada a melhoria na produção do xilitol pela levedura nas fermentações R2 e R3 (**Figura 21**), não foi observada correlação entre as atividades enzimáticas ao longo destas etapas de reciclo. Observou-se também

que, assim como durante as fermentações para a avaliação da adaptação do inóculo, as atividades das enzimas XR e XDH apresentaram nas primeiras 12 horas de fermentação, redução em relação à atividade inicial e, em seguida ao longo do tempo de fermentação. Este comportamento foi mais acentuado nas três primeiras fermentações com reciclo, também sendo observado em *Pachyso/en tannophilus* por DITZTELMULLER et ai. (1984) e em *C. guilliermondii* por RODRIGUES (2002).

O acompanhamento das atividades das enzimas XR e XDH de *C. guilliermondii* nas fermentações do hidrolisado H5, apresentados na **Tabela 10**, e a relação destas com os parâmetros fermentativos indicam que o reciclo de células não afeta a relação entre as atividades das enzimas (XR/XDH), possivelmente porque os constituintes do hidrolisado que atuam como ativadores ou inibidores da atividade da enzima XR também tenham efeito semelhante sobre a atividade da XDH. Outra justificativa para que a relação entre as atividades das enzimas (XR/XDH) seja semelhante (**Tabela 10**) é a dependência da enzima XR em relação à via das fosfopentoses para a recuperação do cofator (NADPH), desta forma a atividade da enzima XR depende da reação catalisada pela enzima XDH. Este comportamento parece ser refletido no rendimento do xilitol, que também não apresentou redução ao longo de cinco fermentações com reciclo de células (**Figura 24**). Desta forma, a conversão de xilose em xilitol pela levedura *C. guilliermondii* parece ter rendimento inerente à fisiologia da levedura, e, desta forma, o aumento na formação do xilitol pode ser alcançado com o aumento da velocidade de assimilação de xilose, favorecendo a atividade metabólica e, com isto a formação de xilitol.

5- CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que:

- O bagaço de cana-de-açúcar apresenta-se como potencial substrato para a obtenção biotecnológica de xilitol em larga escala sendo necessária a utilização das técnicas de adaptação e reciclagem de células para a melhoria dos parâmetros fermentativos da formação de xilitol pela levedura *C. guilliermondii*.
- O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado como substrato para a obtenção das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* com elevadas atividades específicas.
- Durante as fermentações as atividades da enzima XR foram superiores às da XDH nos diferentes hidrolisados e em função da adaptação do inóculo ou do reciclo de células.
- O fator de concentração do hidrolisado assim como o tempo de cultivo para a otimização das atividades enzimáticas não correspondem aos que devem ser empregados para a produção de xilitol.
- A atividade da enzima XDH é favorecida em função da adaptação do inóculo, principalmente nos hidrolisados com alto teor de tóxicos.
- O cultivo da levedura por elevado tempo no hidrolisado hemicelulósico de bagaço é um fator que contribui para a redução nas atividades das enzima XR e XDH.

- A formação de glicerol pela levedura *C. guilliermondii* pode ser uma resposta metabólica quanto à presença de compostos tóxicos no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com elevado fator de concentração.
- A adaptação de inóculo ao hidrolisado de maior fator de concentração (H5) resultou em melhoria de 47% na formação de xilitol pela levedura.
- A adaptação de inóculo, combinada à reciclagem de células em sucessivas fermentações resultou em melhoria de até 80,5% na formação de xilitol pela levedura.

6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho possibilitou avaliar a atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, assim como a formação de xilitol em fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em função da adaptação do inóculo e do reciclo de células de *Candida guilliermondii* em sucessivas fermentações; identificando-se os seguintes pontos para a possível realização de trabalhos futuros:

- 1 - Devido aos parâmetros favoráveis de rendimento e produtividade observados em função da adaptação e reciclo celular, sugere-se estudar a possibilidade de ampliação de escala, juntamente com uma avaliação econômica da obtenção biotecnológica do xilitol.
- 2 - Uma vez que neste trabalho o reciclo foi realizado em intervalos fixos de 84 horas de cultivo, sugere-se avaliar as condições ideais de concentração de xilose e/ou tempo de fermentação para a realização do reciclo celular.
- 3 - Avaliar as condições de cultivo e possibilidade de redução de etapas no preparo do inóculo com células adaptadas a elevados fatores de concentração de hidrolisado.
- 4 - Avaliar as condições e etapas para a purificação do xilitol a partir do meio fermentado.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências de acordo com a norma NBR 6023 da ABNT de Agosto de 2002

AGUIAR, C. L.; OETTERER, M.; MENEZES, T. J. 8. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Piracicaba, v. 33, n. 2, p. 184-193, 1999.

ALANEN, P.; ISOKANGAS, P.; GUTMAN, K. Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in estonian children. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, Copenhagen, v. 28, p. 218-224, 2000.

ALVES, L. A. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 70-72, p. 89-98, 1998.

ALVES, L. A. **Efeito do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes tratamentos sobre a atividade da xilose redutase de *Candida guilliermondii***. 2001. 193f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2001.

ALVES, L. A. et al. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of *Candida guilliermondii* as a function of different treatments of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate employing experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98-100, p. 403-413, 2002.

AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolysed hemicellulose achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 281-283, 1996.

AMARTEY, S. A. et al. Fermentation of a wheat straw acid hydrolysate by *Bacillus stearothermophilus* T-13 in continuous culture with partial cell recycle. **Process Biochemistry**, London, v. 34, p. 289-294, 1999.

ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 11, p. 187-198, 2000.

BADET, C. et al. Adaptation of salivary *Lactobacillus* strains to xylitol. **Archives of Oral Biology**, New York, v. 49, p. 161-164, 2004.

BARBOSA, M. F. S. et al. Screening of yeasts for production of xylitol from o-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 241-251. 1988.

BERGMEYER, H. U. 1983. **Methods of enzymic analysis**. Vol. 2 Ed. Verlag Chemie. 3ª. ed. Weinheim.

BOLEN, P. L.; DETROY, R. W. Induction of NADPH-Linked o-xylose reductase and NAD-Linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* by o-xylose, L-arabinose or D-galactose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 27, p. 302-307, 1985.

BOLEN, P. L.; HAYMAN, G. T.; SHEPHERD, H. S. Sequence and analysis of an aldose (xylose) reductase gene from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. **Yeast**, Davis, v. 12, n. 13, p. 1367-1375, 1986.

BRADSHAW, D. J.; MARSH, P. D. Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. **Caries Research**, Basel, v. 28, n. 4, p. 251-6, 1994.

CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 323-331, 2002.

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

CARVALHO, W. et al. Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use of a repeated-batch immobilized cell system. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 57c, p. 109-112, 2002.

CARVALHO, W. et al. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. **Enzyme and Microbial Technology** New York, v. 32, p. 553-559, 2003.

CARVALHO, W. et al. A study of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry** London, 2004 (in press).

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v. 18, n. 4, p.295-331, 1998.

CHEN, L-F; GONG, C-S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 226-228, 1985.

CLARK, T. A.; MACKIE, K. L. Fermentation inhibitors in wood hydrolyses derived from the softwood *Pinus radiata*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 34b, p. 101-110, 1984.

DELAZARI, I. Obtenção de xilitol a partir do xilano e os enzimas envolvidos no processo. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 52, p. 28-74, 1980.

DITZELMÜLLER, G. et al. Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 30, p. 1330-1336, 1984.

DOMINGUEZ, J. M.; GONG, C-S.; TSAO G. T. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 57-58, p. 49-56, 1996.

DUARTE, H. C. **Hidrólise de bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado**. 1989. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de Campinas - UNICAMP, Campinas, 1989.

EDGAR, W. M. Sugar substitutes, chewing gum and dental caries - a review. **British Dental Journal**, London, v.184, n. 1, p. 29-32, 1998.

EMODI, A. Xylitol. Its properties and food applications. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 1, p. 28-32, 1978.

FELIPE, M. G. A. et al. Preparation of xylitol by fermentation of a hydrolyzate of hemicellulose obtained from sugarcane bagasse. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 36, n. 1, p. 103-114, 1993.

FELIPE, M. G. A. et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 35, n. 3, p. 171-77. 1995.

FELIPE, M. G. A.; VITTOLO, M.; MANCILHA, I. M. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* grown in a sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate: effect of aeration and inoculum adaptation. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 73-79, 1996.

FELIPE, M. G. A., et ai. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of ph. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 13, n. 1-2, p. 11-14, 1997a.

FELIPE, M. G. A. et ai. Environmental parameters affecting xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 251-254. 1997b.

FENGEL, D. e WEGENER, G. eds. **Wood Chemistry, ultrastructure, reactions**. Bellin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRARI, M. D. et ai. Ethanol production from eucalyptus wood hemicelulose hydrolysate by *Pichia stiptis*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 40, p.753-759, 1992.

FURLAN, S. A.; CASTRO, H. F. Xylitol prodruction by *Candida parapsi/osis* under fed-batch culture. **Brazilian Archivies of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 2, p. 125-128, 2001.

GALES, M. A.; NGUYEN, T. M. Sorbitol compared with xylitol in prevention of dental caries. **The Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 34, n.1, p. 98-100, 2000.

GHOSH, P.; SINGH, A. Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 39, p. 295-333, 1993.

GÍRIO, M. F.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Characterization of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 56, p. 79-88, 1996.

GONG, C-S. et ai. Conversion of hemicellulose carbohydrates. **Advances Biochemical Engineering**, New York, v. 20, p. 93-118, 1981.

HYVÖNEN, L.; KOIVISTONEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xyilitol. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 28, p. 373-403, 1982.

KERN, M. et ai. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS4435. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.149, p.31-37, 1997.

KIM, S-Y.; OH, D-K.; KIM, J-H. Evaluation of xylitol production from com cob hemicellulose hydrolysate by *Candida parapsi/osis*. **Biotechnology Letters** Kew, v. 21, p. 891-895, 1999a.

KIM J-H, RYU Y-M, SEO J-H. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** San Diego, v. 22, p. 181-186, 1999b.

KIM, Y. e YOO, Y. Peroxidase production form carrot hairy root cell culture. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.18, p.535-553. 1996.

KONDARZEWSKY, M; MATOS, G. S.; FELIPE, M. G. A. Crescimento de *Candida guilliermondii* durante fermentação de meio contendo mistura de xilose e arabinose. VI **Encontro de Iniciação Científica e II Encontro Pós-Graduação - UNIVAP**, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos - SP, Anais de Trabalhos Completos, 2003.

KUHAD, R. C. Lignocellulose biotechnology: current and futura prospects. **Critical Reviews in Biotechnology** Cleveland, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

LEE, H.; SOPHER, C. R.; YAU, Y. F. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 65, n. 4, p. 375-379. 1996.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology** Amsterdam, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEE, H. The structure and function of yeast xylose (aldolase) reductases- Review. **Yeast**, Davis, v. 14, p. 977-984, 1998.

LIMA, L. H. A. **Efeito do ácido acético nas enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii***. 2002. 72p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL, Lorena, 2002.

LOHMEIER-VOGEL, E. M.; SOPHER, C. R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibitors of xylose fermentation by yeast. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** San Diego, v.20, p.75-81, 1998.

MALTA, S. **Saúde: Encontro discute fibrose cística**. Disponível em : <http://www.2roche.com.br/hospitalar/correiodabahia_fibrosec.html>. Acesso em: 10 outubro 2001.

MANZ, U. , VANNINEN, E.; VOIROL, F. **Xylitol - its properties and use as a sugar substitute in foods.** In: Food Symposium on Sugar And Sugar Replacements, London, 10 October 1973.

MARTÍNEZ, E. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Aspects of xylitol formation in sugarcane bagasse hydrolysate by *Candida guilliermondii* in the presence of tetracycline. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Clifton, v. 77-79, p. 347-354, 1999.

MARTÍNEZ, E. A. et al. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry** London, v. 38, p. 1677-1683, 2003.

MARTON, J. M. et al. Importance of pretreating sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate with activated charcoal for xylitol production. **Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**- Book of abstracts, Campinas, p.13. 2000.

MARTON, J. M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol.** 2002. 110p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL, Lorena, 2002.

MARTON, J. M.; et al. A. Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 3, p. 45-53, 2003.

MATOS, G. S. **Bioconversão de hemicelulose em xilitol, a partir de fibra de soja** 2001. 72 f.. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). UFRGS, Faculdade de Agronomia. Porto Alegre, 2001.

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.

MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. Production of xylitol by *Candida mogii* from rice straw hydrolysate: Study of environmental effects using statistical design. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Clifton, v. 70-72, p. 149-159, 1998.

MEJALA, A. J.; HÄMÄLÄINEN, L. Process for making xylitol U S n.4.008.285. 18 jun. 1975. 15 fev. 1977.

MEYRIAL, V. et ai. Xylitol production from o-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behavior. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 13, n. 4, p. 281-286, 1991.

MITRANI, R. 8. et ai. IN: Manual dos derivados da cana-de-açúcar. ABIPTI e ICIDCA Eds. Cap. 2.3, Brasília, 474p, 1999.

MORITA, T. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, p. 751-759, 2000.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 23, p. 1681-1684, 2001.

NATAH, S. S. et ai. Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 65, n. 4, p. 947-950. 1997.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 231-241, 1997.

NIDETZKY, 8. et ai. Strategies to an efficient enzymatic production of xylitol. Annals of the New York academy of sciences. **Enzyme Engineering**, New York, v. 14, n.864, p.442-445, 1998.

NIGAM, P.; SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol - A sugar substitute. **Process Biochemistry**, London, v. 30, n. 2, p. 117-124, 1995.

NOLLEAU, V. et ai. Xylitol production from xylose by two yeasts strains: sugar tolerance. **Current Microbiology**, New York, v.27, p. 191-197, 1993.

ODUMERO, J. A. et ai. Effects of heat shock and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 111-116. 1992.

OH, O-K.; KIM, S-Y.; KIM, J-H. Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 58, n. 4, p. 440-444, 1998.

OJAMO, H.; YLINEN, L.; LINKO, M. Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivation of *Candida guilliermondii*. Wo Patent n.88/05467. 08 dez. 1987. 28 jul. 1988.

PALLADINO, F.; SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; Avaliação do efeito xilose/xilitol na fermentação de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*. XIV Simpósio Nacional de Fermentações - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-Se, Anais de Trabalhos, Agosto de 2003. CD ROM.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÅGERDAL, S. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology*, Essex, v. 74, p.25-33,2000.

PANDEY, A. et al. Bioechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, Essex, v. 74, p. 69-80. 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Xylitol from wood: study of some operational strategies. *Food Chemistry*, Oxford, v. 57, n. 4, p. 531-535, 1996.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, Essex, v. 65, n. 3, p. 191-201, 1998a.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, Essex, v. 66, n.t, p.25-40. 1998b.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. Perry's chemical engineering handbook. Seven Edition, McGraw-Hill, New York, USA, 1997.

PESQUISA FAPESP. Álcool a partir do bagaço de cana. Pesquisa FAPESP, São Paulo, n. 95, p. 64, Janeiro, 2004.

PESSOA Jr, A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, São Paulo, v.14, n.3, p.309-312. 1997.

PIRT, S. J. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1975.

RIVERAS, Y. Usinas podem dobrar a geração de energia. *Jornal Valor Econômico*, São Paulo, caderno B, 23/05/2001.

RIZZI, M. et al. Xylose fermentation by yeasts. 4. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Clifton, v. 29, p. 2-2, 1988.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; de MANCILHA, I. M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n. 6, p. 348-350, 1996.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 17, p. 171-176, 2003.

ROCHA, G. F. M. **Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar assistida por oxigênio**. 2000. 136p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2000.

RODRIGUES, D. C. G. A. et al. Biotechnological production of xylitol from agroindustrial residues: evaluation of bioprocesses. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Clifton, v. 70-72, p. 869-75, 1998.

RODRIGUES, D. C. G. A. **Xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* obtidas em cultivo descontínuo alimentado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2002. 164p. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

RODRIGUES, R. C. L. B. **Avaliação das condições de concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para a produção de xilitol**. 1999. 109 f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1999.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 299-311, 2001a.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** São Paulo, v. 18, n. 3, p. 299-311, 2001b.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 26, p. 103-107, 2003.

ROSA, S. M. A. et al. Xylose reductase production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Clifton, v.70-72, p.127-135, 1998.

ROSEIRO, J. C. et al. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 156, n. 6, p. 484-490, 1991.

ROSSI, I. H. et al. Shiitake *Lentinula edodes* production on a sterilized bagasse substrate enriched with rice bran and sugarcane molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 66-71, 2003.

RUSSO, J. R. Xylitol. Anti-caries sweetener ? **Food Engineering International**, Highlands Ranch, v. 1, n. 4, p. 37-39, 1976.

SENE, L. **Adaptação e reciclagem da levedura *Candida guilliermondii* FTI20037 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de xilitol.** 1996. 70p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1996.

SENE, L. et al. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in bagasse hydrolysate. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 38, n. 11 p.61-69, 1998.

SENE, L. et al. Effects of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Clifton, v. 84-86, p. 371-380, 2000.

SENE, L. et al. Metabolic study of the adaptation of the yeast *Candida guilliermondii* to sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology** New York, v. 57, p. 738-743, 2001.

SENE, L. et al. Sugarcane bagasse as alternative packing material for biofiltration of benzene polluted gaseous streams: a preliminary study. **Bioreseource Tcechnology**, Essex, v. 83, p. 153,157. 2002.

SEVERO, J. R. Setor canavieiro terá super-safra em 2003/2004. Informativo técnico. **Revista Gleba**, São Paulo, n. 196, Dezembro/2003. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/Gleba03/Dez/CanadeAcucar.htm>>. Acesso em 17 Abril de 2004.

SHI, N-Q. et al. Characterization and complementation of a *Píchia stípítis* mutant unable to grown on d-xylose or 1-arabinose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, p. 201-216, 2000.

SILVA, D. D. V. et al. Xylitol: alternativa sweetener obtained by biotechnological process from sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**- Book of abstracts. Campinas, p.32. 2000.

SILVA, D. D. V. **Efeito do ácido acético na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2001.

SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; RODRIGUES, R. C. L. 8. Influência da relação glicose/xilose nas atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana. In: VI Congresso Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2004, Rio de Janeiro. **Resumos**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004. p. 155.

SILVA, S. S. et al. Xilitol: Um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 5, p. 109-117, 1993/94.

SILVA, S. S.; AFSCHAR, A. S. Microbial production of xylitol from o-xylose using *Candida tropicalis*. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 11, n. 4, p. 129-134, 1994.

SILVA, S. S. et al. Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. **Process Biochemistry**, London, v.31, n. 6, p. 549-553, 1996.

SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 70-72, p. 331-339, 1998.

SILVA, S. S. et al. A preliminary information about continuous fermentation using cell recycling for improving microbial xylitol production rates - scientific note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 77-79, p. 571-575, 1999.

SILVA, S. S. et al. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 903- 907, 2003.

SIRISANSANEYAKUL, S.; STANISZEWSKI, M.; RIZZI, M. Screening of yeasts for production of xylitol from o-Xylose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, n. 6, p. 565-570, 1995.

SIRISANSANEYAKUL, S. et al. Continuous production of xylitol by cell recycling system. **Thai Journal of Agricultural Science**, Bangkok, v. 33, n. 3-4, p. 99-106, 2000.

STAMBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**, 2 ed., New York, Pergamon, 1995. Cap. 2.

TANZER, J. M. Xylitol chewing gum and dental caries. **International Dental Journal**, Bristol, v. 45, supl. 1, p. 65-76. 1995.

TAPIAINEN, T. et al. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**, Springfield, v.109, n.2, p.19. 2002.

THONART, P. et al. Bioconversion of xylose into xylitol by *Pachyosolen tannophilus*. **Mededelingen Faculteit. Landbouwwetenschap Ryksuniversitat Guent**, Guent, v. 52, n.4, p. 1517-1528, 1987.

UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, Kidlington, v.19, p.s144-s147. 2001.

VAN EYS, J. et al. Xylitol as a therapeutic agent on glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Sipple, H.L., McNutt, K.W. **Sugar in Nutrition**, Academic Press, p.613. 1974.

VANDESKA, E. et al. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 213-218, 1995.

VASCONCELOS, Y. Não sobra nem o bagaço. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 77, p. 66-70, Julho, 2002.

WALKER G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology** England: Ed. John Wiley & Sons, 1998. 350p.

WEBB, S.R.; LEE, H. Characterization of xylose reductase from yeast *Pichia stipitis*: evidence for functional thiol and histidyl groups. **Journal of General Microbiology**, London, v. 138, p. 1857-1863, 1992.

YANG, V.W.; JEFFRIES, T.W. Purification and properties of xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 26, n. 2, p. 197-206, 1990.

YOKOYAMA, S.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZAWA, K. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent o-xylose reductases from *Candida tropicalis*. **Journal of fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 79, p. 217-223, 1995.

ZABNER, J. et al. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v.97, n.21, p.1164-11619. 2000.

8-ANEXOS

Tabela 11 - Assimilação de xilose durante fermentações de meio semi definido (MS) e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

Assimilação de xilose (o/o)													
Meios de fermentação	Tempo (h)												
	6	12	18	24	30	36	48	60	72	84	96	108	120
MS	16,7	32,4	-	77,7	-	96,2	99,5						
NC	11,2	39,6	67,3	89,5	95,4	98,2							
NC	5,5	28,9	56,2	76,5	93,9	96,8							
H2N	5,2	14,5	-	31,9	-	54,2	71,1	83,8					
H2N	3,8	20,7	-	41,5	-	67,4	88,8	96,9					
H2	9,9	19,2	-	52,4	-	82,5	98,3	99,9	100				
H2	4,5	18,8	-	56,8	-	87,2	98,6	99,0	99,3				
H3	4,6	11,8	-	34,7	-	57,5	76,4	88,9	96,4				
H3	6,0	12,6	-	30,3	-	55,7	79,8	96,8	98,9				
H4	2,7	5,1	-	24,9	-	37,6	53,7	66,5	78,4	88,9	97,7		
H4	3,0	6,3	-	14,4	-	30,2	43,2	55,5	68,3	79,7	90,4		
H5	0	0,7											
H5	0,8	6,2											

(-) tempo não avaliado, () Inóculo adaptado.

Tabela 12 - Xilitol formado durante fermentações de meio semi definido (MS) e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

Meios de fermentação	Xilitol formado (g/L)												
	Tempo (h)												
	6	12	18	24	30	36	48	60	72	84	96	108	120
MS	3,3	7,3	-	16,0	-	17,3	16,3						
NC	1,1	3,9	5,6	6,5	6,5	5,9							
NC	0	1,2	2,7	3,4	4,0	3,4							
H2N	0	1,5	-	3,6	-	5,5	6,3	6,4					
H2N	0	1,5	-	3,8	-	7,4	10,3	10,3					
H2	1,5	3,5	-	8,7	-	14,3	15,0	14,3	13,4				
H2	0	2,6	-	8,6	-	13,2	13,8	12,1	11,8				
H3	0	2,5	-	8,0		14,4	20,5	23,6	24,3				
H3	0	2,8	-	7,1	-	12,2	19,0	23,3	22,4				
H4	0	0		3,8	-	8,8	14,3	20,1	25,2	28,1	30,1		
H4	0	0	-	4,2	-	8,3	13,3	18,3	22,0	25,4	28,0		
HS	0	0		2,8		7,0	11,2	15,3	19,2	21,4	23,5	25,4	26,4

(-) tempo não avaliado, () Inóculo adaptado.



Tabela 13 - Rendimento de xilose em xilitol durante fermentações de meio semi definido (MS) e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

		Y_{pls} (g xilitol / g xilose)												
Meios de fermentação	Tempo (h)													
		6	12	18	24	30	36	48	60	72	84	96	108	120
MS		0,61	0,68	-	0,62	-	0,54	0,50						
NC		0,65	0,66	0,55	0,49	0,45	0,40							
NC		0	0,29	0,35	0,32	0,31	0,26							
H2N		0	0,35	-	0,39	-	0,36	0,31	0,27					
H2N		0	0,25	-	0,30	-	0,36	0,38	0,35					
H2		0,49	0,60	-	0,55	-	0,57	0,50	0,47	0,44				
H2		0	0,49	-	0,55	-	0,55	0,51	0,45	0,44				
H3		0	0,48	-	0,52	-	0,57	0,61	0,60	0,57				
H3		0	0,57	-	0,60	-	0,56	0,61	0,62	0,58				
H4		0	0	-	0,26	-	0,39	0,45	0,51	0,54	0,53	0,52		
H4		0	0	-	0,55	-	0,52	0,58	0,62	0,61	0,60	0,59		
H5		0	0	-	0,39	-	0,54	0,58	0,56	0,57	0,54	0,51	0,50	0,46
H5		0	0	-	0,52	-	0,63	0,56	0,57	0,60	0,62	0,59	0,62	0,60

(-) tempo não avaliado, () Inóculo adaptado.

Tabela 14 - Produtividade volumétrica de xilitol durante fermentações de meio semi definido (MS) e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

Meios de fermentação	Q_p (g xitol / L ³ h ⁻¹)												
	Tempo (h)												
	6	12	18	24	30	36	48	60	72	84	96	108	120
MS	0,56	0,61	-	0,66	-	0,48	0,34						
NC	0,18	0,33	0,31	0,27	0,21	0,16							
NC	0	0,10	0,15	0,14	0,13	0,09							
H2N	0	0,12	-	0,15	-	0,15	0,13	0,11					
H2N	0	0,13	-	0,16	-	0,20	0,21	0,17					
H2	0,25	0,29	-	0,36	-	0,40	0,31	0,24	0,19				
H3	0	0,21	-	0,33	-	0,40	0,43	0,39	0,34				
H3	0	0,23	-	0,30	-	0,34	0,40	0,39	0,31				
H4	0	0	-	0,16	-	0,24	0,30	0,34	0,35	0,33	0,31		
H4	0	0	-	0,17	-	0,23	0,28	0,30	0,31	0,30	0,29		
H5	0	0	-	0,12	-	0,19	0,23	0,26	0,27	0,26	0,24	0,23	0,22

(-) tempo não avaliado, () núcleo adaptado.

Tabela 15 - Fator de conversão de D-xilose em células durante fermentações de meio semi definido (MS) e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2), três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

Meios de fermentação	Y_{xJs} (g células / g Idose)												
	Tempo (h)												
	6	12	18	24	30	36	48	60	72	84	96	108	120
MS	0,26	0,26	-	0,17	-	0,19	0,21						
NC	0,71	0,47	0,45	0,46	0,54	0,61							
NC	0,68	0,47	0,43	0,44	0,50	0,53							
H2N	1,22	0,68	-	0,44	-	0,40	0,37	0,37					
H2N	0,36	0,27	-	0,19	-	0,26	0,25	0,29					
H2	0,26	0,40	-	0,29	-	0,28	0,28	0,37	0,43				
H2	1,01	0,57	-	0,35	-	0,33	0,38	0,49	0,51				
H3	0,50	0,50	-	0,31	-	0,22	0,22	0,22	0,25				
H3	0,61	0,54	-	0,41	-	0,30	0,27	0,26	0,30				
H4	0,35	0,59	-	0,25	-	0,24	0,23	0,19	0,20	0,21	0,21		
H4	0,68	0,70	-	0,57	-	0,36	0,29	0,27	0,26	0,26	0,26		
H5			-	0,51	-	0,41	0,17	0,31	0,30	0,29	0,28	0,30	0,28
H5	1,33	0,56	-	0,51	-	0,53	0,36	0,28	0,24	0,21	0,19	0,21	0,24

(-) tempo não avaliado, () Inóculo adaptado.

Tabela 16 - Produtividade volumétrica em células de *Candida guilliermondii* durante fermentações de meio semi definido (MS) e dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Hidrolisados não tratado (H2N), tratados não concentrado (NC) e concentrados nos fatores duas (H2}, três (H3), quatro (H4) e cinco (H5) vezes.

Meios de fermentação	Qx (g células / Lh-1)												
	6	12	18	24	30	36	48	60	72	84	96	108	120
MS	0,31	0,26	-	0,20	-	0,18	0,15						
NC	0,20	0,23	0,25	0,26	0,26	0,25							
NC	0,09	0,15	0,18	0,19	0,21	0,19							
H2N	0,31	0,24	-	0,17	-	0,17	0,15	0,15					
H2N	0,07	0,14	-	0,10	-	0,14	0,14	0,14					
H2	0,13	0,19	-	0,20	-	0,20	0,17	0,19	0,18				
H2													
H3	0,17	0,22		0,20		0,15	0,15	0,15	0,15				
H3	0,23	0,22	-	0,20	-	0,18	0,17	0,16	0,16				
H4	0,09	0,15	-	0,16	-	0,15	0,15	0,13	0,13	0,13	0,13		
H4	0,18	0,20	-	0,18	-	0,16	0,14	0,13	0,13	0,13	0,13		
H5	0,09	0,16	-	0,15	-	0,15	0,07	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14	0,13

(-) tempo não avaliado, () Inóculo adaptado.

Tabela 17 -Assimilação de xilose durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Assimilação de xilose (%)								
Fermentação	Tempo (h)							
	6	12	24	36	48	60	72	84
R1	1,7	2,2	10,2	19,9	35,2	52,1	74,5	88,9
R2	0,7	2,0	11,8	26,7	46,5	68,8	88,5	100
R3	4,7	5,9	12,7	27,3	47,0	65,1	84,2	97,6
R4	2,5	5,3	11,0	24,2	42,3	55,4	72,2	84,6
RS	0,8	2,0	7,1	13,8	23,9	34,2	44,8	53,2

Tabela 18 - Xilitol formado durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Xilitol formado (g/L)								
Fermentação	Tempo (h)							
	6	12	24	36	48	60	72	84
R1	0,00	0,75	3,70	8,46	15,52	24,28	34,00	41,99
R2	0,00	0,81	4,72	11,73	21,39	31,03	41,92	34,01
R3	0,64	1,24	6,11	13,47	22,15	32,01	42,21	47,64
R4	0,95	1,27	4,70	9,99	16,85	25,03	32,31	39,62
RS	0,00	0,73	2,88	6,52	10,39	16,24	21,66	27,15

Tabela 19 - Rendimento de xilose em xilitol durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Y_{pls} (g xilitol / g xilose)								
Fermentação	Tempo (h)							
	6	12	24	36	48	60	72	84
R1	0,00	0,52	0,54	0,63	0,66	0,69	0,68	0,70
R2	0,00	0,59	0,58	0,64	0,66	0,65	0,68	0,49
R3	0,20	0,30	0,69	0,71	0,68	0,71	0,72	0,70
R4	0,55	0,36	0,63	0,61	0,59	0,67	0,66	0,69
R5	0,00	0,54	0,59	0,68	0,63	0,68	0,70	0,74

Tabela 20 - Produtividade volumétrica de xilitol durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Q_p (g xilitol / t h ⁻¹)								
Fermentação	Tempo (h)							
	6	12	24	36	48	60	72	84
R1	0,00	0,06	0,15	0,24	0,32	0,40	0,47	0,50
R2	0,00	0,07	0,20	0,33	0,45	0,52	0,58	0,40
R3	0,11	0,10	0,25	0,37	0,46	0,53	0,59	0,57
R4	0,16	0,11	0,20	0,28	0,35	0,42	0,45	0,47
R5	0,00	0,06	0,12	0,18	0,22	0,27	0,30	0,32

Tabela 21 - Fator de conversão de o-xilose em células durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Y_{xls} (g células / g xiose)								
Fermentação	Tempo (h)							
	6	12	24	36	48	60	72	84
R1	0,38	1,40	0,57	0,41	0,29	0,27	0,20	0,18
R2	1,53	1,94	0,62	0,39	0,28	0,25	0,21	0,22
R3	0,23	0,78	0,57	0,34	0,26	0,23	0,21	0,20
R4	0,51	0,85	0,71	0,47	0,30	0,27	0,22	0,19
R5	0,46	0,19	0,56	0,37	0,26	0,21	0,19	0,17

Tabela 22 - Produtividade volumétrica em células durante consecutivas fermentações com reciclo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Q_x (g células/L.h-1)							
Fermentação	Tempo (h)						
	12	24	36	48	60	72	84
R1	0,17	0,16	0,15	0,14	0,16	0,14	0,13
R2	0,22	0,21	0,20	0,19	0,20	0,17	0,19
R3	0,27	0,21	0,18	0,17	0,17	0,17	0,16
R4	0,25	0,22	0,21	0,18	0,17	0,15	0,13
R5	0,14	0,11	0,10	0,09	0,08	0,08	



