



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E TURISMO
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL EM
BIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS UTILIZANDO HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR:
EFEITO DA AERAÇÃO E DO FATOR DE CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO

Rodrigo Pitanga Guedes

Lorena - SP - Brasil
2005



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E TURISMO
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL EM
BIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS UTILIZANDO HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR:
EFEITO DA AERAÇÃO E DO FATOR DE CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO

Rodrigo Pitanga Guedes



Lorena - SP - Brasil
2005

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL EM
BIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS UTILIZANDO HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR:
EFEITO DA AERAÇÃO E DO FATOR DE CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO

Dissertação de mestrado apresentada como
parte das exigências para a obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia Industrial

Banca examinadora:

Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva (FAENQUIL)

Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata (FAENQUIL)

Prof. Dr. Marco Antônio Furtado (UFJF)

Estudante:

Rodrigo Pitanga Guedes

Lorena - SP - Brasil
2005

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL EM
BIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS UTILIZANDO HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR:
EFEITO DA AERAÇÃO E DO FATOR DE CONCENTRAÇÃO DO
HIDROLISADO

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação de mestrado aprovada pela
banca examinadora



Dr. Sílvio Silvério da Silva
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Lorena - SP - Brasil
2005

*A Deus,
A meus pais,
Luiz e Teresinha,
A meus irmãos,
Rafael e Renato,
A meu primo,
Caio.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meus pais, meus irmãos, meu primo e familiares que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida.

A minha namorada Anita Dias Lopes pelo incentivo e carinho.

Ao Dr. Sílvio Silvério da Silva pela orientação, amizade, suporte científico e ensinamentos que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Marco Antônio Moreira Furtado pelo incentivo para iniciar o mestrado na FAENQUIL.

Ao meu grande amigo Mário Antônio Alves da Cunha pela amizade, acolhimento, companheirismo, boa vontade, ensinamentos e pelos momentos de descontração.

Ao Júlio César dos Santos pela ajuda incondicional, ensinamentos, boa vontade e apoio em diversos momentos.

Ao amigo Cláudio Fernando pela amizade, companheirismo e pelas conversas.

À Sylvia Talita Ferreira pela amizade, acolhimento, ajuda incondicional, paciência e pela dedicação.

À Rita de Cássia L. B. Rodrigues pela cooperação em diversos momentos, pelas conversas e atenção que sempre disponibilizou.

À Selma Souza pela amizade, cooperação para solucionar os problemas e pelo seu bom humor.

Ao Dr. Ismael Maciel de Mancilha, Dr^{ma}. Maria das Graças de A. Felipe, Dra. Inês Conceição Roberto e Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata pelo apoio constante.

A Lilian que colaborou para correção do *abstract*.

À FAENQUIL, aos seus professores e funcionários pela oportunidade, estrutura e apoio que tornaram possível a realização deste trabalho. Um agradecimento especial ao Nicamor de Assis, Jussara Canilha, Valkíria, Isnaldi e Paulo Roberto.

Aos colegas de laboratório: Juliana Polizei, Larissa Poppi, Débora Danielle, Daniela Borba, Daniela Cortez, Martha Villarreal, Walter Carvalho, Talita Marques, Marcos Paulo, Rimenes e tantos outros que colaboraram.

As funcionárias da biblioteca Mara, Regina Maria, Ludimila e Cristina.

À Capes pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

BIOGRAFIA

Rodrigo Pitanga Guedes, filho de Teresinha de Jesus Pitanga Guedes e Luiz Ângelo Guedes, nasceu em 22 de junho de 1976, em Manaus - AM.

Em 1993, formou-se no ensino médio no Colégio Militar do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ.

Em 1998, graduou-se no Bacharelado em Farmácia e em 1999, habilitou-se como Farmacêutico-Bioquímico Industrial na Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG.

Em setembro de 2002, ingressou no curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, nível de mestrado, no Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena - SP.

CONTEÚDO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE TABELAS | I |
| LISTA DE FIGURAS | III |
| RESUMO | VI |
| ABSTRACT | VII |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| | |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1. MATÉRIAS PRIMAS LIGNOCELULÓSICAS | 4 |
| 2.1.1. BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR | 7 |
| 2.1.2. <i>Utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana como fonte de carbono e energia para produção de xilitol.</i> | 9 |
| 2.2. XILITOL | 10 |
| 2.2.1. PROPRIEDADES E EMPREGO | 10 |
| 2.2.2. <i>Produtos com xilitol em diferentes países</i> | 1-1 |
| 2.2.3. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE XILITOL | 16 |
| 2.2.4. EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO | 16 |
| 2.2.5. CONVERSÃO DAXILOSE POR VIA QUÍMICA | 17 |
| 2.2.6. CONVERSÃO MICROBIOLÓGICA DAXILOSE | 19 |
| 2.3. BIORREATORES | 23 |
| 2.3.1. BIORREATORES COM CÉLULAS LIVRES | 25 |
| 2.3.2. BIORREATORES DE COLUNA DE BOLHAS | 28 |
| 2.4. MODO DE CONDUÇÃO DO PROCESSO | 30 |
| | |
| 3.0. OBJETIVOS | 31 |
| 3.1. GERAL | 31 |
| 3.2. ESPECÍFICOS | 31 |
| | |
| 4. MATERIALE MÉTODOS | 32 |
| 4.1. OBTENÇÃO E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR | 32 |
| 4.1.1. MATÉRIAPRIMA | 32 |
| 4.1.2. HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR | 32 |
| 4.2. CONCENTRAÇÃO E TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO | 33 |
| 4.3. MICROORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO | 33 |
| 4.4. PREPARO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO | 34 |
| 4.5. BIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO | 34 |
| 4.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL | 36 |
| 4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS | 37 |
| 4.7.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR | 37 |
| 4.7.2. VIABILIDADE E PUREZA DA CULTURA | 37 |
| 4.7.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR | 38 |
| 4.7.4. DETERMINAÇÃO DO PH, TEOR DE AÇÚCARES, XILITOL, ÁCIDO ACÉTICO | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 4.7.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FURFURAL E HIDROXI-METIL-FURFURAL | 38 |
| 4.7.6. DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS DE FERMENTAÇÃO | 39 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1. CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR | .40 |
| 5.1.1. <i>Caracterização parcial do hidrolisado hemicelulosico de bagaço de cana de açúcar antes e após a etapa de concentração</i> | .40 |
| 5.1.2. <i>Caracterização parcial do hidrolisado hemicelulosico de bagaço de cana de açúcar após a etapa de tratamento</i> | .42 |
| 5.2. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL | .43 |
| 5.3. AVALIAÇÃO CINÉTICA | 56 |
| 5.4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS VAZÃO DE AR E FATOR DE CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO NAS RESPOSTAS YP/s, QP, E, Yx/s, P E CONCENTRAÇÃO CELULAR | 59 |
| 5.4.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO FATOR DE CONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL | 59 |
| 5.4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA EM XILITOL | 63 |
| 5.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO FATOR DE CONVERSÃO DE XILOSE EM CÉLULAS | 67 |
| 5.4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONCENTRAÇÃO FINAL DE XILITOL | 71 |
| 5.4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EFICIÊNCIA DE CONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL | 75 |
| 6. CONCLUSÕES | 79 |
| 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 80 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA1: Composição de hidrolisados hemicelulósicos provenientes de diversas matérias-primas expressos como porcentagem de açúcar total | 11 |
| TABELA2: Propriedades físico-químicas do xilitol.. | 13 |
| TABELA3: Codificação dos níveis para as variáveis avaliadas | 36 |
| TABELA4: Matriz do planejamento fatorial 2 ² para o estudo da influência das variáveis: vazão de ar e fator de concentração de hidrolisado | 37 |
| TABELA5: Caracterização físico-química dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar não tratados | 40 |
| TABELA6: Caracterização físico-química dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar tratados | 42 |
| TABELA7: Consumo de xilose (A), arabinose (B) e ácido acético (C); concentração final de xilitol (D) e etanol (E); produtividade volumétrica em xilitol (F); eficiência de conversão de xilose em xilitol (G) e concentração celular (H), determinados para todos os ensaios fermentativos | 46 |
| TABELA8: Variação da concentração da glicose e da arabinose em função do tempo no experimento 4 | 49 |
| TABELA9: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para o fator de conversão em xilitol (Y _p /s) segundo o planejamento fatorial 2 ² | 59 |
| TABELA10: Análise de variância do planejamento fatorial 2 ² para o fator de conversão em xilitol. | 60 |
| TABELA11: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para a produtividade volumétrica em xilitol (Q _p , g xilitol/l.h) segundo o planejamento fatorial 2 ² | 63 |
| TABELA12: Análise de variância do planejamento fatorial 2 ² para a produtividade volumétrica em xilitol (Q _p , g xilitol/l.h) | 64 |
| TABELA13: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para o fator de conversão de xilose em células (Y _x /s, g xilitol/ gcélulas) segundo o planejamento fatorial 2 ² | 67 |
| TABELA14: Análise de variância do planejamento fatorial 2 ² para o fator de conversão de xilose em células (Y _x /s, g xilitol/ gcélulas) | 68 |

| | |
|--|----|
| TABELA 15: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para a concentração de xilitol (g/l) segundo o planejamento fatorial 2 ² | 71 |
| TABELA16: Análise de variância do planejamento fatorial 2 ² para a concentração de xilitol (g/l) | 72 |
| TABELA17: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para a eficiência de conversão de xilose em xilitol (E) segundo o planejamento fatorial 2 ₂ | 75 |
| TABELA18: Análise de variância do planejamento fatorial 2 ² para a eficiência de conversão de xilose em xilitol (%)..... | 76 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA1: Balas e chicletes com xilitol.. | 14 |
| FIGURA2: Produtos odontológicos com xilitol.. | 15 |
| FIGURA3: Adoçantes com xilitol. | 15 |
| FIGURA4: Tecnologias disponíveis para produção de xilitol.. | 16 |
| FIGURA5: Produção de xilitol por via química | 18 |
| FIGURA6: Esquema simplificado do metabolismo de xilose em levedura | 20 |
| FIGURA7: Via Metabólica utilizada na fermentação de D-xilose por leveduras | 21 |
| FIGURA8: Biorreatores do tipo tanque com agitação: a) reator convencional, b) reator com leito empacotado em uma unidade | 27 |
| FIGURA9: Reator de coluna com borbulhamento: a) convencional, b) contendo "loop" externo para recirculação de fluxo ("air lift"), c) "air lift" com separador de partículas e d) "air lift com leito empacotado" | 29 |
| FIGURA10: Reator de hidrólise do bagaço de cana (250 litros) | 32 |
| FIGURA11: Concentrador a vácuo utilizado no presente trabalho | 33 |
| FIGURA12: Biorreator de coluna de bolhas | 35 |
| FIGURA13: Representação esquemática do biorreator de coluna de bolhas | 36 |
| FIGURA 14: Variação das concentrações de xilose e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60ml/min e fator de concentração do hidrolisado de 5 vezes)..... | 44 |
| FIGURA 15: Variação das concentrações de xilose, glicose, arabinose e xilitol no experimento 4 (vazão de aeração de 60ml/m.in e fator de concentração de hidrolisado de 5 vezes) | 48 |
| FIGURA16: Variação das concentrações de xilose, células e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60ml/ min e fator de concentração do hidrolisado de 5 vezes) | 50 |
| FIGURA17: Variação das concentrações de xilose, células e xilitol no experimento 3 (vazão de ar de 60ml/min e fator de concentração do hidrolisado de 3,5 vezes) | 51 |
| FIGURA 18: Variação das concentrações de xilose, células, etanol e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60ml/min e fator de concentração do hidrolisado de 5 vezes) | 52 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 19: Variação das concentrações de ácido acético, etanol e xilitol no experimento 3 (vazão de ar de 60ml/min e fator de concentração do hidrolisado de 3,5 vezes) | 53 |
| FIGURA 20: Variação das concentrações de ácido acético, etanol e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60ml/min e fator de concentração do hidrolisado de 5 vezes) | 53 |
| FIGURA 21: Variação das concentrações de xilose, xilitol, pH e ácido acético no experimento 4 (vazão de ar de 60ml/min e fator de concentração do hidrolisado de 5 vezes) | 55 |
| FIGURA 22: Velocidades específicas do experimento 3 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 3,50 vezes) | 56 |
| FIGURA 23: Velocidades específicas do experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes) | 56 |
| FIGURA 24: Velocidade específica de crescimento celular em função da velocidade específica de formação de xilitol e ajuste linear do experimento 3 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 3,50 vezes). Equação da reta: $y = 16,45 x$; $R^2 = 0,99699$ | 58 |
| FIGURA 25: Velocidade específica de crescimento celular em função da velocidade específica de formação de xilitol e ajuste linear do experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes). Equação da reta: $y = 15,06 x$; $R^2 = 0,99372$ | 58 |
| FIGURA 26: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para o fator de conversão de xilose em xilitol (Y_p/s) utilizando a levedura <i>Candida guilliermondii</i> cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar | 62 |
| FIGURA 27: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para a produtividade volumétrica em xilitol (Q_p) utilizando a levedura <i>Candida guilliermondii</i> cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar | 66 |
| FIGURA 28: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para o fator de conversão de xilose em células ($Y_{x/s}$) utilizando a levedura <i>Candida guilliermondii</i> | |

cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 70

FIGURA 29: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para a concentração de xilitol (g/l) utilizando a levedura *Candiâa quilliermonâii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 74

FIGURA30: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para a eficiência de conversão de xilose em xilitol (E) utilizando a levedura *Candiâa quilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 78

RESUMO

Avaliação da produção biotecnológica de xilitol em reator de coluna de bolhas utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: efeito da aeração e do fator de concentração do hidrolisado. Rodrigo Pitanga Guedes. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Sílvio Silvério da Silva (Departamento de Biotecnologia, FAENQUILCP. 116, 12600-000, Lorena, SP, Brasil). Banca Examinadora: Dr. Marco Antônio Moreira Furtado e Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata. Fevereiro de 2005.

Recentes pesquisas demonstram a crescente aplicação do xilitol em diversas áreas, principalmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica. O xilitol é produzido atualmente em escala industrial por redução química da xilose derivada de hidrolisado hemicelulósico sob altas pressões e temperaturas, necessitando de etapas intensivas de purificação antes e durante o processo de catálise. Estas etapas, aliadas ao alto custo energético do processo motivam a busca de vias alternativas de produção. Uma destas é a via biotecnológica, pois algumas leveduras produzem xilitol sob condições adequadas de fermentação. Entre outras vantagens do processo fermentativo, destaca-se a possibilidade do uso direto do hidrolisado hemicelulósico e a utilização de condições amenas de temperatura e pressão.

O presente trabalho teve como objetivo determinar as condições operacionais de obtenção de xilitol em reator de coluna de bolhas utilizando células livres de *Candida quilliermondii* F'I'I 20037. As fermentações foram realizadas em bateladas simples de acordo com um planejamento fatorial 2², sendo estudadas as variáveis: vazão de aeração e o fator de concentração do hidrolisado. Como resultado dos experimentos, o maior valor de Y_{p/s} (0,46g/g) e concentração de xilitol (23,57g/l) foi obtido na vazão de ar de 60ml/min e no hidrolisado com fator de concentração de 5 vezes.

Pela análise estatística, observou-se que o modelo linear com termo de interação foi adequado para representar o efeito das variáveis estudadas na produção de xilitol neste bioreator, com nível de significância de 90%. De acordo com estes resultados, a produção de xilitol utilizando o reator de coluna de bolhas nas condições propostas, apresenta-se como uma alternativa viável.

ABSTRACT

Evaluation of biotechnological production of xylitol in a bubble column reactor using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates: effect of air flow rate and hydrolysate concentration factor. Rodrigo Pitanga Guedes. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Silvio Silvério da Silva (Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, CP. 116, 12600-000, Lorena, SP, Brasil). Banca Examinadora: Dr. Marco Antônio Moreira Furtado e Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata. Fevereiro de 2005.

Researchs have demonstrated the increasing application of xylitol in several areas, mainly in the food and pharmaceutical industries. Xylitol is nowadays produced by chemical reduction of xylose derived from hemicellulosic hydrolysates at high pressure and temperature conditions, needing intensive stages of purification before and during the catalysis. These stages associated to the high energetic cost of the process, motivate the search for alternative ways for xylitol production. The biotechnological route is one way, because several yeasts produce xylitol under adequate conditions of fermentation. The fermentation process for xylitol production has as advantages the possibility of direct use of the hemicellulosic hydrolysate and the utilization mild temperature and pressure conditions without previous xylose purification.

The objective of this work was to determine the operational conditions for xylitol obtainment in a bubble column reactor, using free cells of *Candida guilliermondii* FTI 20037. The fermentations were performed in simple batches, according to a 22 factorial experimental design. The values of air flow rate and hydrolysate concentration factor were analyzed as result of the experiments, the maximum values of $Y_{p/s}$ (0,46g/g) and xylitol concentration (23,57g/l) were obtained at 60ml/min air flowrate and with a five-fold concentrated hydrolysate.

By the statistical analysis, it was observed that the linear model with interaction term was adequate to represent the effect of the studied parameters on the xylitol production in this bioreactor, at 90% significance level. According to these results, the xylitol production using the bubble column reactor under the predicted conditions, shows to be a viable alternative.

1. INTRODUÇÃO

A crescente crise energética mundial tem motivado grupos de pesquisa a buscar fontes alternativas de energia, principalmente para obtenção de produtos de elevado valor agregado. Dentro deste contexto, os materiais lignocelulósicos são importantes por apresentar baixo custo e representarem uma fonte renovável de energia.

O xilitol é um poliol que vem se destacando nas áreas alimentícia, odontológica, farmacêutica e médica, apresentando significativo potencial de aplicação em outros segmentos industriais. Dentre suas propriedades, apresenta poder adoçante semelhante à sacarose, ação anticariogênica, é indicado para o consumo por diabéticos, para pessoas obesas e para pacientes portadores de deficiência de glicose 6-P-desidrogenase. Atualmente o xilitol é produzido em escala industrial por via química a partir de xilose pura extraída de hidrolisados hemicelulósicos, sob condições de elevada pressão e temperatura. Esta reação exige a presença do catalisador níquel, o que dificulta as etapas posteriores à produção, para remoção de resíduos deste catalisador.

Recentes pesquisas demonstram que a via biotecnológica é outra possibilidade de obtenção de xilitol, e grandes esforços estão sendo empreendidos para estabelecimento de uma tecnologia por via fermentativa para obtenção deste produto.

Apesar da não existência de estudos específicos sobre a viabilidade econômica do processo biotecnológico, acredita-se que a via fermentativa resultará em custos menores de produção quando comparada à via química utilizada e conseqüentemente no aumento do uso do xilitol e de seus benefícios à saúde humana. Atualmente, a via biotecnológica é muito estudada devido a fatores como uso de temperaturas amenas e pressão atmosférica, além da facilidade de algumas leveduras utilizarem a xilose presente no hidrolisado hemicelulósico diretamente sem prévia purificação, onde apenas um simples tratamento físico-químico do hidrolisado é necessário. Outra vantagem significativa do processo biotecnológico é a geração de efluentes que são facilmente tratáveis, reduzindo a poluição ambiental.

Atualmente, os trabalhos de pesquisa do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ)- FAENQUIL- objetivando a produção de xilitol têm sido direcionados para o estabelecimento dos variáveis operacionais e das opções de processo que maximizem a produção de xilitol. Estão em execução também investigações sobre as etapas de tratamento do hidrolisado e desenvolvimento de técnicas de separação do produto do meio fermentado.

Na bioprodução de xilitol os reatores do tipo tanque com agitação são os *mais* comuns para uso com suspensões de células livres. Estes reatores promovem a agitação do meio mecanicamente, que pode gerar desvantagens para o processo. Outro reator utilizado é o de coluna de bolhas, que promove a agitação do meio pneumáticamente. Estes reatores são importantes na indústria química e biotecnológica (MICHELEHEMPEL, 2002), e, objetivando a obtenção de melhores condições de transferência de massa, utilizou-se neste trabalho este biorreator.

Entre os fatores fundamentais que interferem na produtividade de xilitol em processos conduzidos em biorreator destacam-se:

_ a vazão de ar é um dos fatores operacionais de fundamental importância na formação de xilitol por leveduras. Esta variável influencia na quantidade de células presentes (crescimento celular) e na produtividade de xilitol e

_ o fator de concentração do hidrolisado é também uma variável que influencia na taxa de crescimento celular e na produtividade de xilitol, uma vez que o aumento da concentração do hidrolisado proporciona o aumento na concentração inicial de xilose, favorecendo a produção de xilitol.

Estas variáveis estão interligadas e direcionadas à transferência de oxigênio no reator. Desta forma é fundamental um estudo destas variáveis individuais e a verificação do efeito da interação entre elas, visando obter elevadas produtividades em xilitol, permitindo o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa que possa ter aplicação industrial.

Com relação à vazão de ar, é importante observar que nenhum estudo ainda foi realizado com relação à avaliação desta variável para produção de xilitol em reator de coluna de bolhas a partir de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células livres. Deve-se salientar também que dados da literatura (PARAJÓ et al., 1998; WINKELHAUSENÇKUSMANQVA,1998) apontam a

necessidade de que o estudo da influência da aeração na produção de xilitol seja feito considerando-se também a concentração inicial de substrato, uma vez que os efeitos combinados destas duas variáveis exercem forte influência sobre a produção de xilitol. Desta forma, é indicado que sejam avaliados simultaneamente às variáveis: vazão de ar e fator de concentração do hidrolisado, que está diretamente interligado com a concentração inicial de xilose.

Considerando estas variáveis operacionais fundamentais para o estabelecimento de uma tecnologia eficiente de obtenção de xilitol, o presente projeto teve como objetivo avaliar a influência destas variáveis no uso de células livres de *Candida guilliermondii* FTI20037, para a obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em bateladas simples utilizando um reator de coluna de bolhas.

Deve-se salientar que este trabalho é uma proposta inovadora para a obtenção de xilitol por via microbiana a partir de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, proporcionando uma melhor compreensão deste bioprocessos, o que contribuirá para estudos futuros visando a sua aplicação em escala industrial, permitindo a maior utilização de xilitol e de seus inúmeros benefícios à população brasileira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MATÉRIAS PRIMAS LIGNOCELULÓSICAS

A atual crise petrolífera tem estimulado a utilização de energias alternativas, principalmente para redução de custos dos processos industriais e conseqüentemente do produto final. Dentre as fontes alternativas de energia, destaca-se os materiais lignocelulósicos. Segundo a U. S. Department of Energy (2004), os materiais lignocelulósicos não tem sido aproveitados em todo seu potencial devido ao desconhecimento ou a não existência de tecnologias disponíveis para serem prontamente aplicadas, ou têm sido utilizadas de forma menos valorizada, como a queima direta em sistemas de co-geração de energia.

Estes materiais são fontes abundantes de compostos orgânicos, apresentando grande potencial de uso como matéria prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (MOO-YOUNG et al., 1986; TSAO, 1986; BUCHERT et al., 1989; LEE, 1997; LOWRIER, 1998; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; KADAM et al., 2000; LATIFRAJOCA, 2001).

Estes materiais são os principais constituintes da biomassa vegetal, como a de resíduos agrícolas e florestais (palha de arroz, eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho), os quais são acumulados no ambiente, ocasionando problemas de poluição devido ao risco de combustão espontânea, como por exemplo do bagaço de cana armazenado (LAVARA et al., 2000) e representando a perda de valiosos recursos (KUHAD; SING, 1993). Assim, é importante que se desenvolvam técnicas para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos na obtenção de produtos úteis à humanidade e, com este objetivo, o emprego de processos fermentativos tem sido bastante estudado. Como exemplo, citam-se trabalhos de pesquisa sobre o uso dos carboidratos presentes na biomassa vegetal para a produção de butanocliol (FRAZER; McCASKEY, 1989), etanol (LEE, 1997; SUN; CHENG, 2002), proteína microbiana (MEYER et al., 1992) e xilitol (FELIPE et al., 1993; FELIPE et al., 1997a; MARTINEZ et al., 2002). Encontram-se publicações recentes que descrevem bioprocessos que têm sido desenvolvidos utilizando matérias primas para a produção de produtos de valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e metabólicos secundários ativos biologicamente,

dentre outros produtos (PANDEY et al., 2000b; PANDEY et al., 1988; PANDEY, 1992; PANDEY, 1994; VANDENBERGH et al., 2000; PANDEY et al., 1999a; PANDEY et al., 1999b; PANDEY et al., 1999c).

O potencial e as características específicas das técnicas para o uso destes materiais relacionam-se intimamente à sua constituição. Resíduos lignocelulósicos são constituídos basicamente por três componentes macromoleculares: dois deles - celulose e hemicelulose - são formados por polissacarídeos e o outro por um material polifenólico, a lignina, sendo que a composição e a proporção entre estes constituintes variam de acordo com a espécie vegetal da qual se originaram (KUHAD;SING, 1993; KLEMM et al., 1998).

A celulose, material orgânico mais abundante na natureza (PANDEY et al., 2000a), é um polímero linear de alta massa molecular, insolúvel em água, constituído por unidades de celobiose ligadas entre si por ligações $\sim 1,4$ glicosídicas (KLEMM et al., 1998). O grau de polimerização, medido pelo número de resíduos de glicose, varia de 1000 a 50000, dependendo da origem (TSAO, 1986; FENGEL; WENEGER, 1989). Este polímero natural é a substância base de muitos produtos, como papel, filmes, fibras e aditivos (FENGEL;WENEGER, 1989). É amplamente utilizada na fabricação de papel e sua maior fonte é a madeira (ANFPC, 1995).

A hemicelulose, podendo representar até 40% do material da parede celular dos vegetais (TOIVAR et al., 2001) e agindo como composto de reserva e sustentação, é um heteropolímero formado por pentoses (xilose e arabinose) e por hexoses (glicose, manose e galactose) e seus correspondentes ácidos urônicos. Esta fração é geralmente acetilada e sua composição varia amplamente, dependendo da espécie considerada, do tipo de crescimento do tecido e do método de extração. O grau de polimerização deste heteropolímero é geralmente inferior a 200 unidades (FENGEL;WEGNER,1989).

Outra fração dos materiais lignocelulósicos é a lignina, uma macromolécula polifenólica amorfa composta principalmente por unidades de fenilpropano, cuja estrutura provém da polimerização iniciada por enzimas, dos seguintes precursores primários: álcool trans-coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool trans-para-cumárico. O mecanismo de biossíntese da lignina ocorre a partir da reação destes três diferentes álcoois cinâmicos precursores (FERRAZ,2001). Na biomassa vegetal, está associada a celulose e

hemicelulose, o que impede a degradação destes materiais, ou seja, a lignina confere rigidez e baixa reatividade ao conjunto de fibras dos vegetais. Além disso, tecidos lignificados resistem ao ataque de microorganismos, impedindo a penetração de enzimas destruidoras no tecido celular (D'ALMEIDA, 1988; FENGEL; WENEGER, 1989).

Uma das limitações para o aproveitamento integral de todas as frações dos resíduos lignocelulósicos é a própria estrutura da biomassa. Geralmente, é necessária a ruptura do complexo lignina-celulose-hemicelulose ou a remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento e deslignificação. Sem este tratamento preliminar é difícil a biomassa ser aproveitada em processos industriais, pois a associação de suas frações constituintes lhe confere grande resistência ao ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos (PURI; PEARCE, 1986; FENGEL; WENEGER, 1989). Segundo PARAJÓ et al. (1998b), a separação simultânea dos três principais grupos de polímeros da biomassa em sua forma polimérica não é possível com o uso dos procedimentos convencionais de separação (como cristalização, precipitação ou extração). Pelo menos um dos polímeros é degradado por tratamentos baseados nas diferenças em suas propriedades químicas. Celulose e hemicelulose, por exemplo, são menos susceptíveis à oxidação que a lignina mas, em contraste, ambas podem ser hidrolisadas por ácidos, ao contrário do polímero fenólico, que permanece como um resíduo sólido no meio ácido.

Diversos métodos têm sido empregados para hidrólise dos componentes dos materiais lignocelulósicos (SUN; CHENG, 2002), tornando-os úteis para uso em bioprocessos. Como exemplo destes métodos, pode-se citar hidrólise alcalina (FENGEL; WENEGER, 1989); explosão a vapor (SILVA, 1989), hidrólise enzimática (TSAO, 1986) e hidrólise ácida (PESSOA Jr., 1991). A fração hemicelulósica, por apresentar uma estrutura aberta, tem a difusão do catalisador facilitada dentro da cadeia polimérica, o que aumenta o rendimento das reações de hidrólise. Este fato, associado a sua estrutura heterogênea e baixo grau de polimerização, faz com que este constituinte da biomassa seja bastante atrativo para uso em processos fermentativos (JEFFRIES, 1983; MAGGE; KOSARIC, 1985). A hidrólise da hemicelulose usando soluções de ácido diluído tem sido estudada por diferentes pesquisadores (NGYUEN et al., 1999; KIM et al., 2000b; NEUREITER et al., 2002). Os resultados obtidos dependem claramente do tipo de matéria prima e

condições operacionais utilizadas. A hidrólise da fração hemicelulósica resulta a solubilização e a destruição parcial dos açúcares produzidos. Como conseqüência, a quantidade de açúcar recuperado da matéria prima depende do tempo de reação, temperatura e concentração do ácido (PESSOA et al., 1996). De acordo com NEUREITER et al. (2002), a concentração do ácido é o parâmetro mais importante que afeta o rendimento da hidrólise, enquanto para a formação de subprodutos da degradação de açúcares (inibidores do metabolismo microbiano), a temperatura tem maior impacto. A hidrólise ácida tem sido a mais eficiente na obtenção de açúcares, a partir da fração hemicelulósica, para uso como fonte de carbono em fermentações, sendo o ácido sulfúrico (NGYUEN et al., 2000; NGUYEN et al., 1999) e clorídrico os mais comumente empregados para este fim (FENGEL; WENEGER, 1989; PESSOA Jr., 1991; PARAJÓ et al., 1998b).

Especificamente, quando a presença de xilose no hidrolisado é desejada, a matéria prima deve ser submetida a uma hidrólise ácida branda e seletiva (pré-hidrólise) para a obtenção de uma solução rica neste açúcar e um resíduo sólido de celulose e lignina. O hidrolisado rico em xilose obtido pode ser usado como meio fermentativo para produção de xilitol (ROBERTO et al., 1999; SILVA et al., 2001a; SILVA et al., 2001b). Esta pré-hidrólise é vantajosa quando usada para este fim, prevenindo a formação de produtos de degradação e aumentando a susceptibilidade da celulose (macromolécula não solúvel no hidrolisado) à hidrólise subsequente. Além disso, reduz o requerimento do uso de equipamentos protegidos contra corrosão, o que torna o processo mais barato (MAGEE; KOSARIC, 1985; PARAJÓ et al., 1998b).

2.1.1. Bagaço de cana de açúcar

No Brasil, o mais abundante resíduo lignocelulósico é o bagaço de cana-de-açúcar, material fibroso obtido após a moagem da cana e extração do caldo. Enquanto a produção mundial de bagaço de cana-de-açúcar é de cerca de 234 milhões de toneladas de por ano (ORLANDO et al., 2002), no Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura (2004), a produção de cana de açúcar em 2003 foi estimada em 386 milhões de toneladas, o que corresponde a uma produção de bagaço de cerca de 103 milhões de toneladas, segundo a proporção indicada por PROCKNOR(2000). Além da indústria açucareira

(produção de açúcar de 7,2 milhões de toneladas por ano), em função do projeto PROÁLCOOL (Programa Brasileiro do Alcool), a produção de álcool no Brasil é grande (cerca de 12,3 milhões de metros cúbicos por ano) (RIPOL et al., 2000). Assim, a geração de resíduos de cana-de-açúcar será ainda mais intensificada (BELIK; SILVA, 1999). Em termos energéticos as indústrias de açúcar e álcool são sustentáveis, onde cerca de 90% do bagaço (poder calorífico de 18,322 KJ.Kg-1) é utilizado; no entanto, o consumo pode ser reduzido para cerca de 70%, se o sistema de geração de vapor for otimizado. De acordo com FAIRBANKS (1999), apesar de grande parte deste resíduo ser utilizada pela própria indústria como fonte de energia, o excedente tende a aumentar em um futuro próximo devido à oferta do gás natural boliviano, disponibilizado ao mercado brasileiro através do gasoduto Bolívia-Brasil. Ainda de acordo com este autor, a chegada do gás natural pode colocar em risco a queima do bagaço de cana-de-açúcar e incentivar a valorização deste produto, uma vez que o gás é um combustível eficiente, não deixa resíduos e reduz a poluição ambiental. O bagaço pode também ser utilizado como suplemento em ração animal, mas ainda assim há um grande excedente deste material. Outras alternativas potenciais de utilização do bagaço como matéria prima são a produção de xilitol, etanol, hidróxi-metil-furfural, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, forragem para agricultura, álcool, alcalóides e enzimas (LACÔRTE et al., 1986; DOMINGUEZ et al., 1996; PANDEY et al., 2000a).

O bagaço de cana-de-açúcar e outros resíduos agro-industriais como palha de arroz, eucalipto e sabugo de milho, fazem parte da biomassa vegetal, e são acumulados no ambiente, ocasionando problemas de poluição e representando a perda de valiosos recursos (KUHADŞINO, 1993; PANDEY et al., 2000a). Assim, é importante que se desenvolvam técnicas para o aproveitamento destes resíduos que apresentam uma fonte de compostos de carbono abundante e barata na obtenção de produtos úteis à humanidade (LEATHERS 2003; LATIF, 2001) e, com este objetivo, o emprego de processos fermentativos tem sido bastante estudados (FRAZER; McCASKEY, 1989; MEYER et al., 1992; FELIPE et al., 1993; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; SOCCO et al., 2003).

Entre as alternativas que têm sido pesquisadas, uma que tem se mostrado bastante promissora é o uso de hidrolisados hemicelulósicos de

bagaco de cana-de-açúcar para a produção de xilitol, adoçante alternativo com importantes aplicações industriais (MOLWITZ et al., 1996; PANDEY et al., 2000a).

2.1.2. Utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana como fonte de carbono e energia para produção de xilitol

Hidrolisados hemicelulósicos obtidos de resíduos têm sido freqüentemente utilizados em estudos para desenvolvimento de bioprocessos tecnicamente e economicamente viáveis para obtenção de xilitol (McMILLAN, 1994). O baixo custo do hidrolisado hemicelulósico utilizado como substrato para a fermentação (KIM, 1999; WHISTLETI, 1993; KIM, 2000a) é uma das principais vantagens para utilizá-lo como meio fermentativo.

O maior problema associado com a utilização de hidrolisados lignocelulósicos como meio de cultura é sua pobre fermentabilidade, principalmente quando ele contém alta concentração de xilose. Durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, além da mistura de açúcares (hexoses e pentoses) diluídos, diferentes compostos tóxicos são formados, tais como: furfural e hidroximetil-furfural (produtos de degradação de açúcar), compostos aromáticos e poliaromáticos (produtos de degradação de lignina) e ácido acético (substância liberada da estrutura da hemicelulose), dentre outros. Estas substâncias são inibidoras do metabolismo microbiano (LEE; McCASKEY, 1983; JEFFRIES, 1985; PALMQVIST, 2000).

Hidrolisados hemicelulósicos tem uma mistura complexa de açúcares que incluem xilose, arabinose, glicose, galactose e manose (PEREGO et al., 1990; ROBERTO et al., 1995; HESPELL et al., 1997). Estes açúcares podem influenciar o rendimento e a produtividade de xilitol durante a fermentação da xilose (WALTHER et al., 2001). Na TABELA 1, encontra-se a composição de hidrolisados hemicelulósicos provenientes de diversas matérias primas.

Para a produção de xilitol usando hidrolisados hemicelulósicos, o processo é afetado pela concentração de açúcares no meio fermentativo, pela proporção entre estes açúcares e pelos compostos tóxicos liberados durante o processo de hidrólise. Por exemplo, altas concentrações de monoses podem causar "estresse" osmótico, inibir a indução de enzimas redutoras de xilose ou levar a uma produção de etanol que excede o nível de tolerância da levedura. Adicionalmente, a proporção entre as monoses pode influenciar no transporte

ou cinética enzimática, nos casos onde ambos açúcares competem pelo mesmo sistema de transporte ou são simultaneamente metabolizados (WALTHER et al., 2001).

2.2. XILITOL

2.2.1. Propriedades e emprego

O xilitol é um poliol encontrado nos organismos de mamíferos, sendo produzido em pequena quantidade como produto intermediário do metabolismo de carboidratos (PEPPER; OLINGER, 1988). Apresenta características físico-químicas que o tornam um produto de grande aplicabilidade em vários segmentos industriais (TABELA2). Dentre estas características destacam-se a sua alta solubilidade em água e sua boa estabilidade física e biológica, o que o torna uma substância adequada para diversas aplicações alimentícias e farmacêuticas (MANS et al., 1973; EMODI, 1978; BÄR, 1991; PARAJÓ, 1998; AGUIAR, 1999). Seu calor de dissolução (34,8 cal/ g - endotérmico) promove um prazeroso efeito refrescante, o que o torna adequado para uso em balas e gomas de mascar (PARAJÓ et al., 1996; KIM et al., 1999). O poder de adoçação do xilitol é muito semelhante ao da sacarose, ou seja, a mesma quantidade deste ou daquele tem igual efeito nos alimentos (MAKINEN 2000a). Existem várias características que fazem do xilitol uma substância atrativa para uso em diferentes produtos comerciais. Seu uso é indicado para pessoas diabéticas, uma vez que seu metabolismo é independente de insulina (YLIKAHRI, 1979; PEPPER; OLINGER, 1988; HEIKILLÄ et al., 1991; MAKINEN 2000b; RANGASWAMI; AGBLEVOR, 2002). É ainda indicado para pacientes portadores de deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (BÄR, 1991) e como adoçante dietético (MAKINEN, 1976; EMODI, 1978). Entre as principais propriedades deste composto, entretanto, destaque deve ser dado a seu poder anti e não cariogênico (SCHINIM et al., 1975; AGUIRRE-ZERO et al., 1993; ALANEN et al., 2000; RANGASWAMI; AGBLEVOR, 2002). É não cariogênico, uma vez que os microrganismos normalmente encontrados na cavidade oral não são capazes de metabolizá-lo, o que impede que os mesmos produzam ácidos que ataquem o esmalte dos dentes provocando as lesões que produzem cárie. Além disso, estudos têm

demonstrado que o xilitol auxilia na remineralização de lesões iniciais, fenômeno ainda não completamente explicado, que interfere no fluxo, na composição da saliva e no equilíbrio entre desmineralização e remineralização do esmalte (SCHINIMet al., 1975; AGUIRRE-ZEROet al., 1993). MÄKINEN; ISOKANGAS(1988) relatam diversos estudos realizados em diferentes países que comprovaram a eficácia do uso de xilitol na prevenção de cáries em crianças. Por isto é usado em produtos de higiene oral para redução de cáries em crianças (MAKINEN2000a; MAKINEN, 2000b).

IWATAet al. (2003) comprovaram a eficácia de pastas de dentes contendo xilitol e flúor na efetividade da redução da retenção de glicose quando comparados com pastas de dentes somente com flúor ou com aqueles que não possuem flúor e xilitol (FIGURA2).

Atualmente é utilizado pela sua capacidade de prevenir otite (RANGASWAM& AGBLEVOR,2002), e de ser usado como um adoçante (FIGURA 3) ou excipiente em xaropes, tônicos e formulações vitamínicas (BAKR,1997). Devido a suas propriedades farmacêuticas únicas, a demanda mundial está aumentando (EMODI,1978; MAKINEN2000b).

Outras aplicações deste poliálcool têm sido estudadas, como é o caso do uso do mesmo como agente de prevenção de infecções em crianças (UHARIet al., 2000) e novas aplicações na área médica encontram-se em estudo. Além disto, é considerado um aditivo GRAS(Generally Recognised as Safe)pela FDA (Food and Drug Administrations - USA),o que permite o seu uso em produtos sem riscos a saúde humana. Comercialmente já são encontrados vários produtos que contêm xilitol em sua formulação. No Brasil, observa-se um crescente interesse no uso de xilitol em diversos produtos. Na área de dentífricos podem ser destacados os cremes dentais Fluotrat e Sorriso (Ação total), entre outros. Existem também guloseimas formuladas à base de xilitol como, por exemplo, o chiclete Tridente a bala Smints (FIGURA1).

TABELA2: Propriedades físico-químicas do xilitol (HYVONEN et al., 1982; BAR, 1986).

| | |
|--------------------------------|--|
| Fórmula Molecular | C ₅ H ₁₂ O ₅ |
| Massa Molecular | 152,15 g/mol |
| Aparência | Pó cristalino de cor branca |
| Odor | Não apresenta |
| Sabor | Doce |
| Ponto de fusão | 92-96 °C |
| Ponto de ebulição | 216 °C |
| Solubilidade à 20 °C | 169g/ 100gH ₂ O, parcialmente solúvel em etanol e metanol |
| pH da solução 5% (p/v) | 5-7 |
| Densidade da solução | 10%, 1,03g/ml; 60%, 1,23 g/ml |
| Viscosidade da solução à 20 °C | 10%, 1,23 cP; 60%, 20,63 cP |
| Calor de dissolução | - 34,8 cal/g |
| Poder adoçante | Semelhante ao da sacarose, maior que os do sorbitol e manitol |
| Valor calórico | 4 Kcal/g |
| Estabilidade | Estável à 120°C, não sofre caramelização; estável também sob condições usuais em processamento de alimentos; caramelização ocorre se aquecido por alguns minutos em temperatura próxima à do ponto de ebulição |

2.2.2. Produtos com xilitol em diferentes países



FIGURA1: Balas e chicletes com xilitol.



FIGURA 2: Produtos odontológicos e farmacêuticos com xilitol.

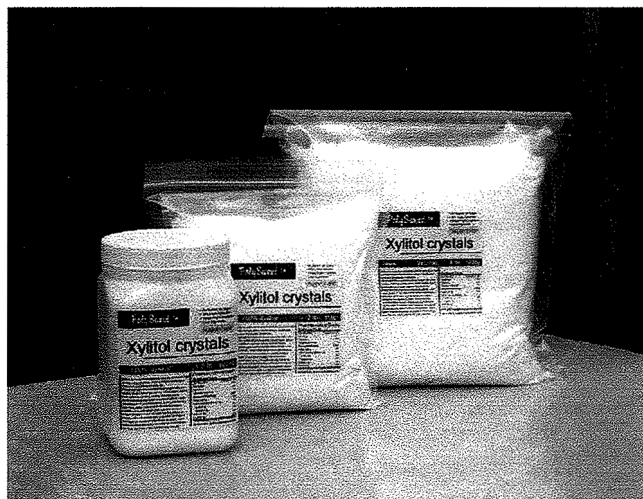
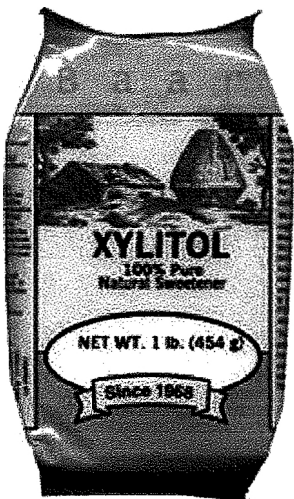


FIGURA3: Adoçantes com xilitol.

2.2.3. Processos de produção de xilitol

O xilitol ocorre naturalmente em pequenas quantidades em certos frutos e vegetais, entretanto, a extração a partir dessas fontes é economicamente inviável devido às baixas concentrações encontradas (MEYRIA et al., 1991). O xilitol pode ser obtido por extração sólido-líquido (PARAJÓ et al., 1998a), por síntese química (MELAJAR; HAMALAINEN, 1997 apud SILVA et al., 1994; MIKKOLA et al., 2000) ou por síntese microbológica utilizando microorganismos como catalisadores (HEIKKILA, 1992; FELIPE et al., 1997a; CARVALHO et al., 2003). A Figura 4 apresenta um esquema das tecnologias possíveis de obtenção de xilitol.

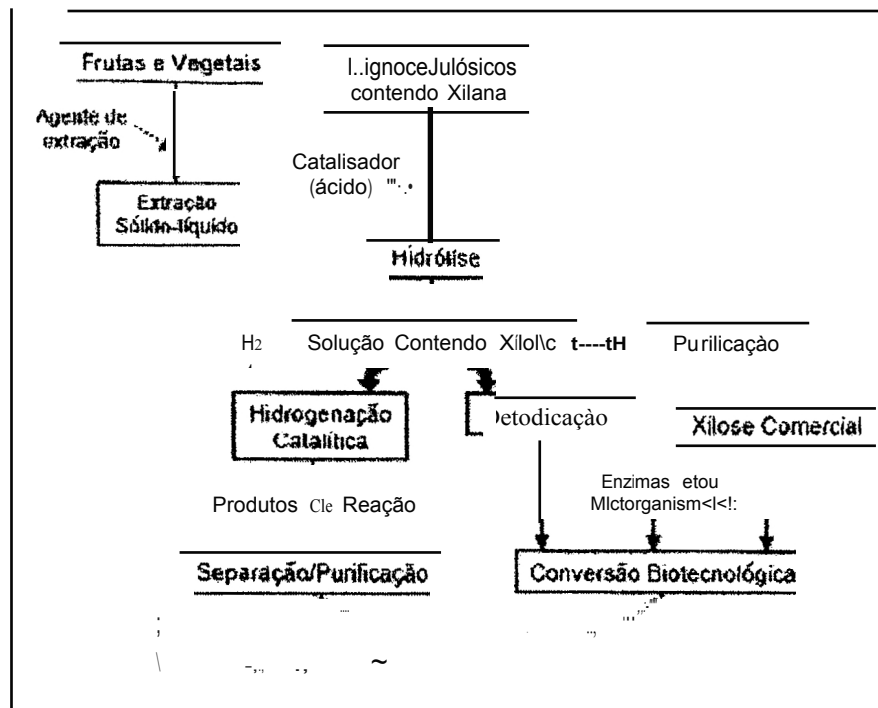


FIGURA 4: Tecnologias disponíveis para produção de xilitol (adaptado de PARAJÓ et al., 1998).

2.2.4. Extração sólido-líquido

O xilitol é encontrado naturalmente em frutas e vegetais, bem como em leveduras, líquens, algas e fungos e pode ser recuperado a partir destas fontes por extração sólido-líquido, mas devido às baixas concentrações (menos que 900 mg/100g) encontradas nestas fontes é economicamente inviável tal

extração (HYVONEN et al., 1982, apud PARAJO et al., 1998a; PEPPER; OLINGER, 1988, apud PARAJO et al., 1998a).

2.2.5. Conversão da xilose por via química

Em larga escala, este poliálcool é produzido por redução química de xilose derivada principalmente de hidrolisados de madeira, processo que apresenta inúmeras desvantagens, as quais encarecem o produto final, destacando-se o uso de altas pressões e temperaturas, e a necessidade de etapas de purificação tanto no "upstream" quanto no "downstream" (SILVA et al., 1994; WINKELHAUSEN e KUSMANOVA, 1998). A solução produzida por este processo requer, portanto, etapas de separação e purificação de alto custo econômico para finalmente obter xilitol puro (FAVERI et al., 2002).

Para a produção por via química (FIGURA 5), são necessárias extensivas operações de troca iônica e fracionamento cromatográfico para a obtenção da xilose de elevada pureza. A etapa de hidrogenação ocorre em reatores descontínuos a pressões elevadas (50 atm) e temperatura na faixa de 80-140 °C, na presença de catalisador níquel de Raney. Após a remoção do catalisador por filtração e troca iônica, a solução hidrogenada contendo o xilitol é concentrada, sofre fracionamento cromatográfico utilizando resinas catiônicas e é cristalizada para a obtenção do xilitol puro (MELAJA; HAMALAINEN, 1977, apud SILVA et al., 1994; MIKKOLA et al., 2000).

A etapa crítica desta rota de produção é a purificação da xilose a partir do hidrolisado hemicelulósico. Apesar da utilização de técnicas de troca iônica e fracionamento cromatográfico, os diversos açúcares presentes no hidrolisado não são totalmente separados ou removidos, e apreciáveis quantidades de galactose, manose e arabinose presentes podem dificultar a etapa de cristalização e purificação da xilose (WINKELHAUSEN e KUSMANOVA, 1998). A etapa de hidrogenação é dificultada pela geração de pequenas quantidades de subprodutos, como a formação de xilulose por isomerização, a qual pode ser hidrogenada a arabitol (MIKKOLA et al., 2000).

A via química é utilizada para produção comercial de xilitol pela Finnsugar Ltd., empresa finlandesa cujo controle acionário passou a ser, desde 1999, do grupo dinamarquês Danisco A/S (DANISCOSUGAR, 2002). Nesta empresa, a matéria prima utilizada é a xilose pura obtida de xilana

proveniente da hidrólise da fração hemicelulósica de bétulas (AGUIAR et al., 1999).

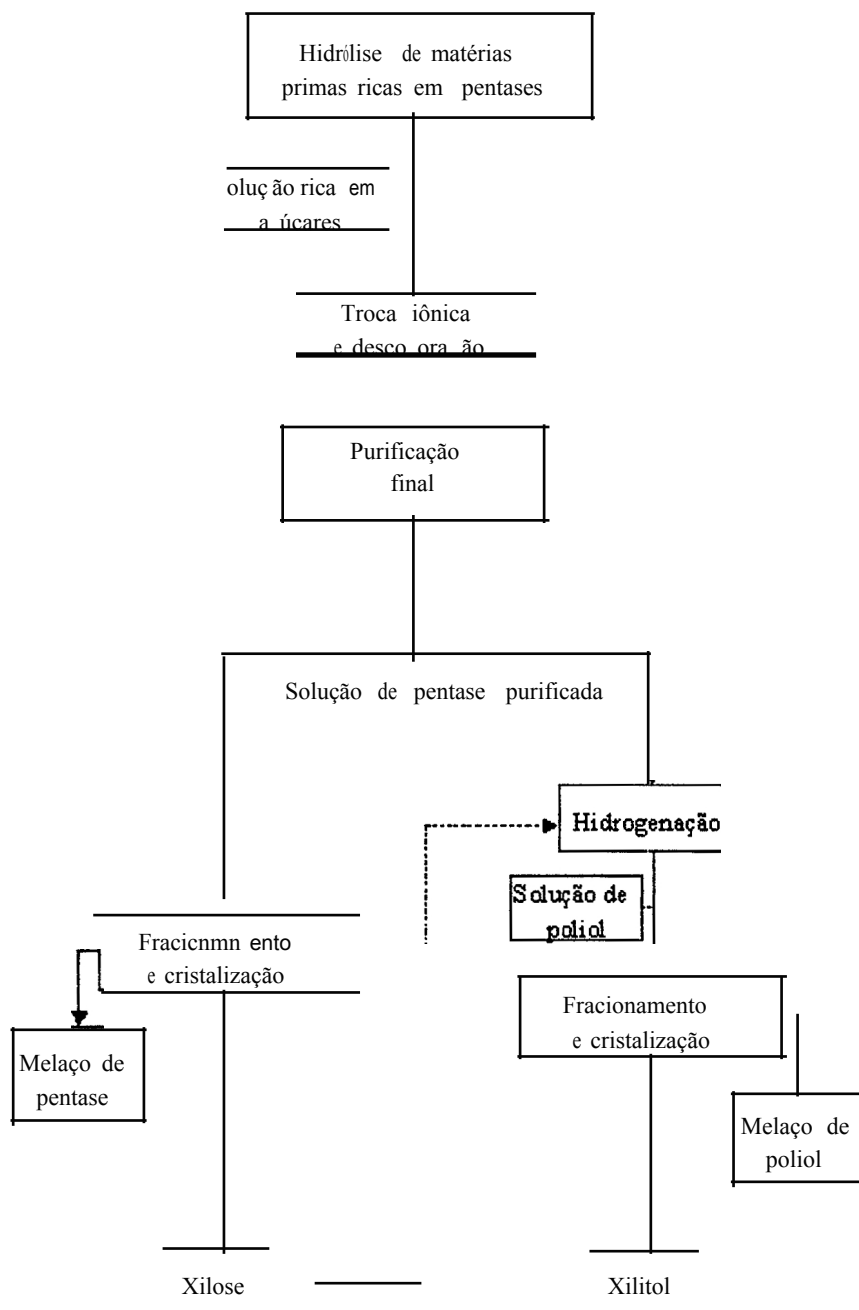


FIGURA 5: Produção de xilitol por via química (HYVÖNEM et al., 1982, apud SILVA et al., 1994).

2.2.6. Conversão microbiológica da xilose

A existência de desvantagens no processo convencional de produção de xilitol tem motivado os pesquisadores a buscarem vias alternativas. Outra motivação certamente é o alto nível de poluição e a necessidade de tratamento dos resíduos inerentes à rota química (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). Um dos processos mais atrativos, atualmente, é a via biotecnológica (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998), a qual apresenta vantagens como o uso de condições mais brandas de pressão e temperatura (SILVA et al., 1997), o baixo custo do hidrolisado hemicelulósico utilizado como substrato para a fermentação (KIM, 1999; WHISTLEIT, 1993; KIM, 2000a) e a não necessidade de utilização de xilose pura, uma vez que os microrganismos são capazes de converter xilose em xilitol diretamente a partir do hidrolisado (ROSEIRO et al., 1991; MUSSATO et al., 2004), além do fato da via biológica não levar à formação de resíduos tóxicos que precisariam ser removidos nas etapas de purificação (OJAMO, 1988).

A produção microbiológica de xilitol ocorre durante o metabolismo de xilose por algumas espécies de leveduras. Dentre os microorganismos capazes de produzir xilitol utilizando xilose, as leveduras estão se mostrando as melhores produtoras (CONVERTI et al., 2002). Nos trabalhos desenvolvidos pelo GMBio/DEBIQ é utilizada a levedura *Candi. daquilliermandii* FTI 20037, linhagem selecionada por BARBOSA et al. (1988), seja para uso em meios sintéticos ou hidrolisados hemicelulósicos contendo xilose (SILVA et al., 1996; FELIPE et al., 1996a; ROBERTO et al., 1996; SILVA et al., 1997; CONVERTI et al., 1999).

O metabolismo de xilose inicia-se, segundo KILIAN, van UDEN (1988), com o transporte pela membrana celular por diferentes mecanismos. Após a xilose entrar na célula, 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 al., 2000). Em *Candi. daquilliennoni* FTI 20037 foi observado que esta enzima catalisa a redução da xilose em xilitol na presença do cofator NADPH (SILVA et al., 1996). Posteriormente, o xilitol é excretado para fora da célula ou oxidado em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, que utiliza NAD⁺ ou NAD(P)⁺ como cofator (SLININGER et al., 1987). A xilulose é então fosforilada a xilulose-5-fosfato, que pode, na via das

fosfopentoses, ser utilizada para formação de biomassa, ou pode ser convertida em piruvato através do complexo transcetolase-transaldolase, que faz a conexão entre via das fosfopentoses e via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (KIM et al., 1999). Na FIGURA 6 apresentam-se os passos iniciais do metabolismo da xilose.

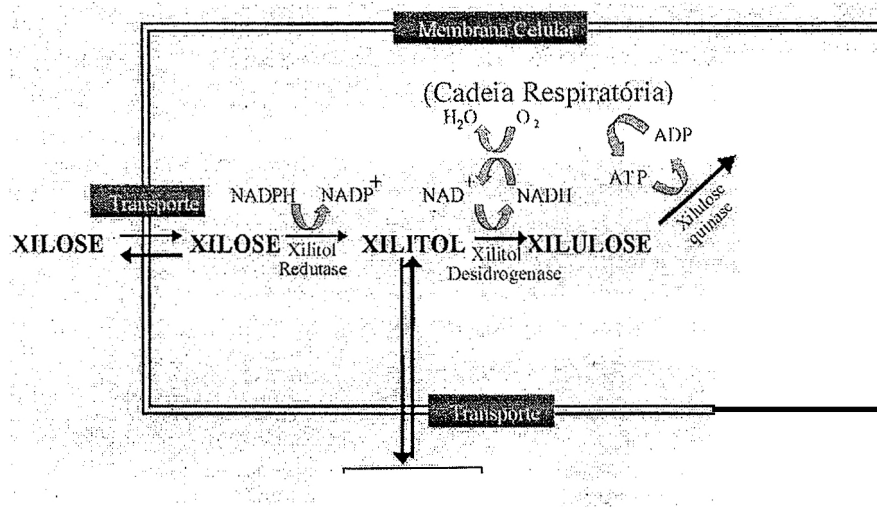


FIGURA 6: Esquema simplificado do metabolismo de xilose em levedura (adaptado de SIRISANSANEYAKUL et al., 1995).

A capacidade de indução do microorganismo, na presença de xilose, das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, para a obtenção de xilitol a partir da conversão biotecnológica da xilose é dependente da disponibilidade dos cofatores NADH₂ e NAD⁺ nas suas formas fosfatadas ou não. Dependendo da vazão de ar e do coeficiente de transferência de oxigênio, o NADH₂ (fosfatado ou não) pode ser utilizado na cadeia respiratória para a fosforilação oxidativa (desvio para biomassa) ou pode ser utilizado como cofator pela enzima XR (para a formação de xilitol). A FIGURA 7 apresenta um esquema do metabolismo citado. Além do microorganismo, diversos são os fatores que influenciam no processo fermentativo de obtenção de xilitol, entre os quais podem ser citados a presença de inibidores, a temperatura, a concentração inicial de células, a concentração inicial de xilose, a agitação, o pH, a aeração, o fator de concentração do hidrolisado e o modo de condução do processo (RAO et al., 2004).

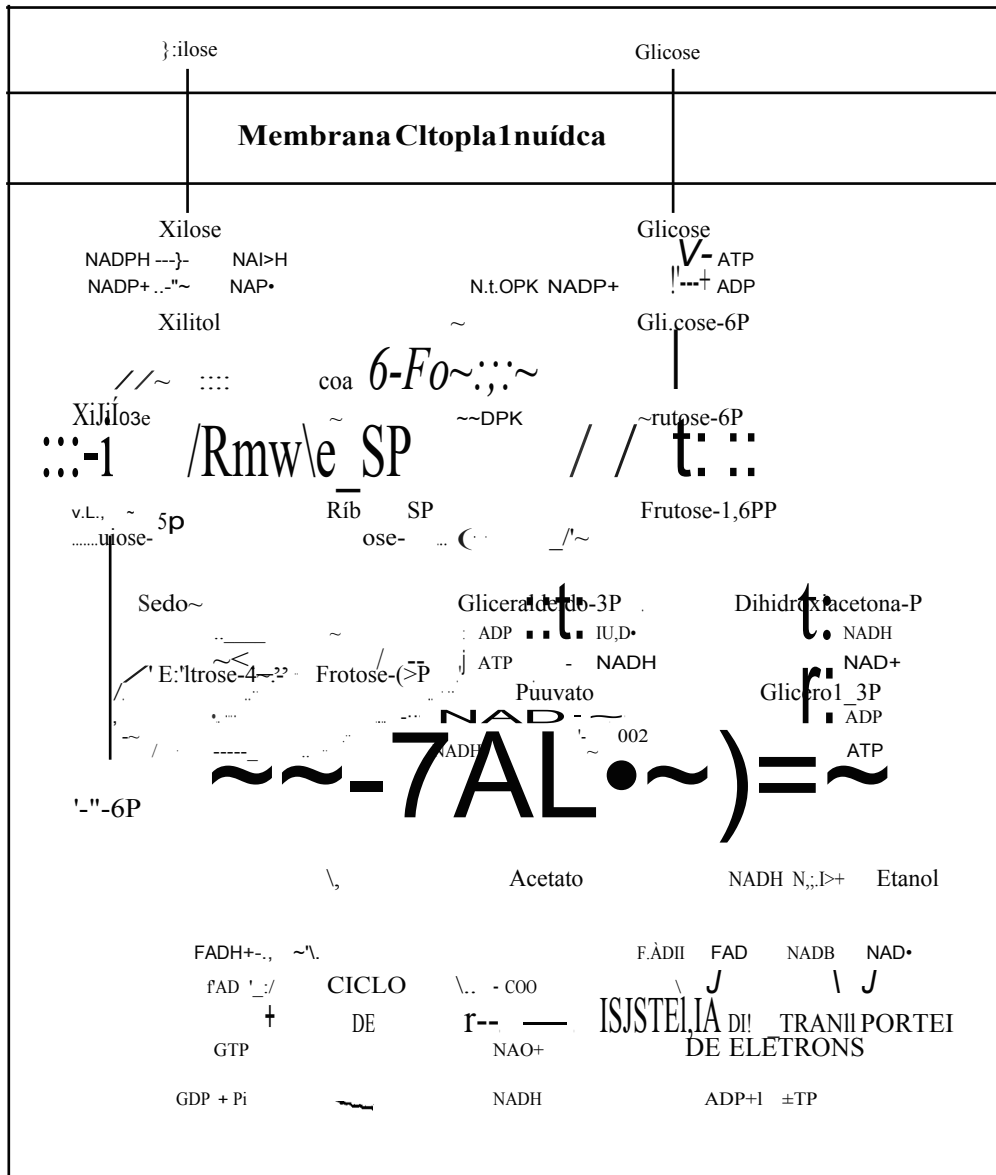


FIGURA7: Via Metabólica utilizada na fermentação de D-xilose por leveduras.

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

A presença de determinados compostos em hidrolisados hemicelulósicos pode inibir o crescimento do microorganismo, diminuindo também sua capacidade de aproveitamento da fonte de carbono para a produção de xilitol. Entre esses, encontram-se o furfural, o hidroximetil-

furfural e o ácido acético, produzidos durante a decomposição da fração hemicelulósica (LEE; McCASKEY, 1983; JEFFRIES, 1985; PALMQVIST 2000; PARAJÓ et al., 1998b; PARAJÓ et al., 1998c; CONVERTI et al., 2000b), além de compostos fenólicos originados da lignina e íons metálicos oriundos da corrosão de equipamentos (CHUNG; LEE, 1985; PARAJÓ et al., 1998b; PARAJÓ et al., 1998c; CONVERTI et al., 2000b). O limite máximo da concentração de cada inibidor no hidrolisado varia de acordo com diferentes fatores, tais como: a espécie do microorganismo, o grau de adaptação do microorganismo ao meio, o tipo de processo fermentativo e a possibilidade do efeito sinérgico de todos os inibidores presentes no meio (PARAJÓ, 1998b). Estratégias para redução dos efeitos negativos dos inibidores em processos fermentativos incluem tratamento do hidrolisado por métodos físicos, químicos e biológicos (PALMQVIST 2000), evaporação de compostos voláteis (CONVERTI et al., 2000a; RODRIGUES et al., 2001), adsorção em resinas de troca iônica (van ZYL et al., 1991; LEE et al., 1999) ou em carvão ativado (SILVA et al., 1998; MUSSATO et al., 2001) e adaptação do microorganismo ao hidrolisado (FELIPE et al., 1996b; SILVA et al., 2001a; SENE et al., 2001). A combinação destes tratamentos também é relatada na literatura (ALVES et al., 1998; CONVERTI et al., 1999; RODRIGUES et al., 2001).

O pH inicial de fermentação é uma variável bastante importante no processo de bioconversão de xilose em xilitol e, quando se utilizam hidrolisados hemicelulósicos, está intimamente ligado à presença de ácido acético. O pH ótimo para a fermentação varia de acordo com o meio utilizado e o microorganismo empregado (FERRARI et al., 1992; SILVA, 1994; NOLLEAU et al., 1995). Para o caso da produção de xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, FELIPE et al. (1997b) observaram que a formação de xilitol foi fortemente inibida em pH inicial inferior a 4,5, sendo que o processo foi favorecido em pH próximo a 6,5. Resultados semelhantes foram encontrados por SENE et al. (2000).

O suprimento de oxigênio é um outro fator que exerce grande influência na produção de xilitol por fermentação, afetando a produção de ATP e a regeneração de coenzimas (BRUINENBERG et al., 1984; ROSEIRO et al., 1991; NOLLEAU et al., 1993; NOLLEAU et al., 1995; MOLWITZ et al., 1996; KIM et

al., 1997). A bioconversão xilose-xilitol é regulada principalmente pela quantidade de oxigênio dissolvido disponível no meio de fermentação. Quando condições anaeróbias são utilizadas no processo, ocorre um desequilíbrio no potencial redox da célula, devido à elevação na concentração de NADH, o que força a paralisação do metabolismo celular. Por outro lado, condições de elevada aeração, desviam o metabolismo microbiano para a produção de células, diminuindo a produção de xilitol (FARIA et al., 2002). Desta forma, deve-se trabalhar sob condições de limitação de oxigênio, nas quais observa-se acúmulo de xilitol, graças à limitação da quantidade de cofator oxidado necessário a atividade da xilitol desidrogenase (ROSEIRO et al., 1991; NOLLEAU et al. 1995). A velocidade de transferência de oxigênio adequada é essencial para obter alta eficiência no processo fermentativo (MUSSATO et al., 2004). No caso de *Candida guilliermondii*, baixa disponibilidade de oxigênio favorece o acúmulo de xilitol, devido à supressão da via das fosfopentoses (BARBOSA et al., 1988; GRANSTROM et al., 2001). MOLWITZ et al. (1996), trabalhando com *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, observaram que a maior concentração de biomassa (24,4 g/l após 65h de fermentação) foi obtida quando foram utilizados altos valores de vazão de ar (1,0 vvm), entretanto, nessas condições não foi detectada a formação de xilitol. Nesse trabalho, o mais alto fator de conversão em xilitol (0,46 g xilitol/ g xilose) foi obtido quando a aeração foi modificada, após 14h, de 0,5 para 0,05 vvm. Considerando que a produção de xilitol por leveduras é muito sensível à concentração de substrato, é recomendado que ambas as variáveis (vazão de ar e fator de concentração do hidrolisado) sejam estudadas simultaneamente para a otimização da produção de xilitol (PARAJÓ et al., 1998a; WINKELHAUSEN e UZMANOVA, 1998).

2.3. BIORREATORES

Encontram-se indicadas na literatura várias formas possíveis de classificar os biorreatores, como por exemplo:

quanto ao tipo de biocatalisador (células ou enzimas);

quanto à configuração do biocatalisador (células/enzimas livres ou imobilizadas) e

quanto à forma de se agitar o líquido no reator.

Dentre as várias classificações encontradas nos livros textos que abordam o tema biorreatores, uma das mais abrangentes é a de KLEINSTREUER (1987), que apresenta uma classificação mista, com base no tipo de biocatalisador empregado (enzima, microorganismo aeróbio ou anaeróbico) e na configuração deste (livre, imobilizado ou confinado entre membranas).

Considerando-se, pois, as várias propostas usualmente encontradas, propõe-se a classificação mista, a qual pretende ser mais abrangente, como vemos a seguir:

(I) Reatores em fase aquosa (fermentação submersa)

(I.1) Células ou enzimas livres

reatores agitados mecanicamente (STR: "stirred tank reactor")

reatores agitados pneumaticamente

o reatores "air lift"

o coluna de bolhas ("bubble column")

(I.2) Células ou enzimas imobilizadas em suportes

reatores com leito fixo

reatores com leito fluidizado

outras concepções

(I.3) Células ou enzimas confinadas entre membranas

reatores com membranas planas

reatores de fibra oca ("hollow-fiber")

(II) Reatores em fase não-aquosa (fermentação semi-sólida)

reatores estáticos (reatores com bandejas)

reatores com agitação (tambor rotativo)

reatores com leito fixo

reatores com leito fluidizado gás-sólido

A partir da classificação proposta (SHMIDELL; FACCIOTI, 2001) há uma grande variedade de configurações possíveis para os biorreatores mas, no

entanto, pode-se afirmar que os mais amplamente empregados são os reatores agitados mecanicamente (STR), conhecidos também como reatores de mistura.

Segundo DORAN (1991), os reatores agitados pneumaticamente se caracterizam basicamente pela ausência do agitador mecânico, sendo a agitação do líquido efetuada apenas pelo borbulhamento de um gás (normalmente ar) no reator. Como consequência da ausência do agitador mecânico, resultam, nesse tipo de reator, menores tensões de cisalhamento, o que os torna atraentes para o cultivo de microorganismos ou células sensíveis.

Há na literatura uma considerável diversidade de nomenclaturas para designar os reatores agitados pneumaticamente, não havendo uma clara diferenciação entre eles. Segundo MERCHUK et al. (1988), a diferenciação básica entre os reatores de coluna de bolhas ("bubble column") e os reatores "air lift", é que nestes últimos tem-se uma movimentação cíclica do fluido, bem definida, através de dispositivos e arranjos internos construídos especialmente para este propósito, enquanto que na coluna de bolhas tem-se um movimento aleatório do líquido no interior do reator.

O uso de biorreatores de coluna de bolhas é uma opção que permite obter melhores velocidades de transferência de massa quando comparado a outros sistemas, além de não apresentar os inconvenientes de elevadas tensões de cisalhamento impostas ao meio em reatores de tanque agitado. Estes reatores podem ser operados em sistemas bifásicos (sólido/líquido) ou trifásicos (sólido/gás/líquido), sendo que, neste último caso, o contato gás-líquido e a remoção de gases são mais eficientes quando comparados a reatores de leito fixo (NIGAM et al., apud CHUN-CHONG 2003).

2.3.1. Biorreatores com células livres

Embora para cada sistema com células livres uma variedade de tipos de reatores possa ser selecionada, o processo só será otimizado caso seja feita uma cuidadosa escolha do biorreator para o sistema em uso. Esta escolha depende de fatores como facilidade de operação, características de mistura e homogeneização, transferência de oxigênio, distribuição de células viáveis, facilidade de "scale-up", cinética de reação, necessidade de controle do processo e custo do biorreator (KARKARE, 1991).

A maioria destes biorreatores contém três fases: sólida (biomassa), líquida (solução de nutrientes e produtos) e gasosa (ar ou gás, produtos gasosos - CO_2 , N_2 , CH_4). O projeto e a operação de sistemas com duas fases (sólido/líquido ou até mesmo gás/ sólido) é consideravelmente mais fácil que para sistemas trifásicos. Muitas operações aproximam-se do comportamento de um sistema bifásico, como as que são efetuadas com aeração externa, processos anaeróbios ou quando os gases formados podem ser eficientemente removidos. Caso seja necessária alimentação do reator com nutrientes gasosos (como o oxigênio), ou ainda quando produtos gasosos são formados em grande quantidade, sistemas sólido/gás/líquido são inevitáveis (KAREL et al., 1985; BARON et al., 1996).

Biorreatores do tipo tanque com agitação (FIGURA8) são os mais comuns para uso com suspensões de células livres. Permitem fácil controle de temperatura e pH, uma vez que misturas bastante homogêneas podem ser facilmente obtidas (FUKUDA,1995).

Como estes reatores são os mais amplamente utilizados, é interessante avaliar outros reatores, tais como o reator de coluna de bolhas, para a bioconversão de xilose em xilitol, com o objetivo de melhorar os resultados da fermentação.

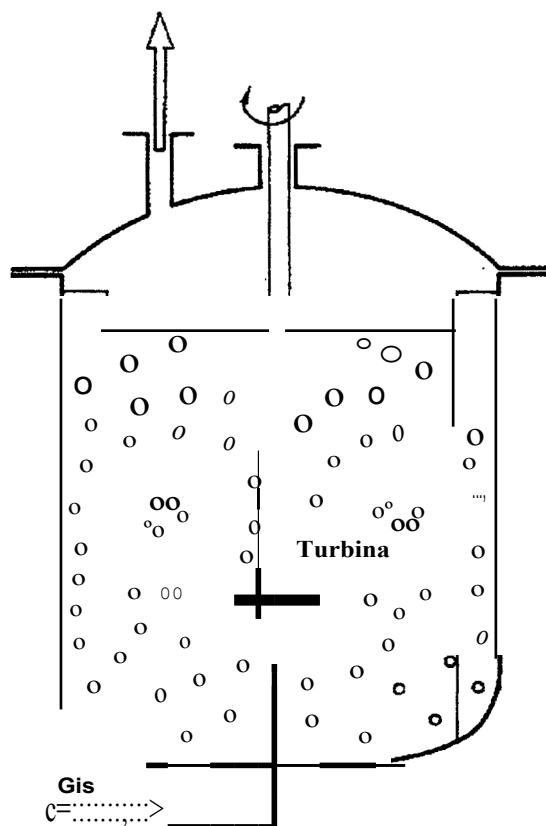


FIGURA 8: Biorreatores do tipo tanque com agitação: reator convencional (BRAUER, 1985; BARONet al., 1996).

2.3.2. Biorreatores de coluna de bolhas

Biorreatores do tipo coluna de bolhas (FIGURA9 a, b, e, e d) são reatores nos quais a agitação do meio reacional é totalmente realizada por um gás sob pressão que é forçado a borbulhar através do líquido. Podem ser utilizados em processos contínuos ou descontínuos com fluxos de gás e líquido concorrentes ou contracorrentes. Em alguns projetos mais recentes, os quais são chamados "air líft" ou "pressure cycle reactors", um "loop" é usado para a circulação do fluido, permitindo alta eficiência na transferência de calor e melhorando as propriedades de fluxo e mistura no interior do reator - Figura 9 b (DECKWER,1985; BAILEY,OLLIS,1986).

Dentre os reatores normalmente utilizados em aplicações industriais, estão o reator de coluna de bolhas convencional e o de coluna de bolhas modificado (por exemplo, "air lift"]. Para comparar e avaliar cada tipo de biorreator, devem ser considerados critérios básicos tais como: transferência de massa gás-líquido, mistura do líquido no interior do reator, dinâmica do fluido e tensão de cisalhamento. Por exemplo, uma fermentação aeróbica apresenta freqüentemente altas velocidades de consumo de oxigênio, sendo a transferência de massa importante neste caso. Para fermentações em larga escala, a mistura ineficiente no reator poderá provocar uma variação local de substratos ou de produtos residuais que podem ser nocivos ao microorganismo. Alguns microorganismos são sensíveis à tensão de cisalhamento, sendo adequada a utilização do biorreator coluna de bolhas por apresentar baixas tensões de cisalhamento (CHUN-CHONG et al., 2003).

A principal característica do reator de coluna de bolhas é o suprimento de gás na parte inferior do reator. O fluxo de gás proporciona um modelo particular de mistura do líquido. Como resultado, este movimento auxilia na mistura do meio reacional e na transferência de massa. Entretanto, em comparação à agitação mecânica, os reatores de coluna de bolhas usualmente apresentam menores capacidades de mistura e de transferência de massa (NIGAM et al., apud CHUN-CHONG,2003).

Diversas configurações têm sido propostas para evitar problemas como separação de partículas na saída do reator - FIGURA9 c e d (BARON et al., 1996).

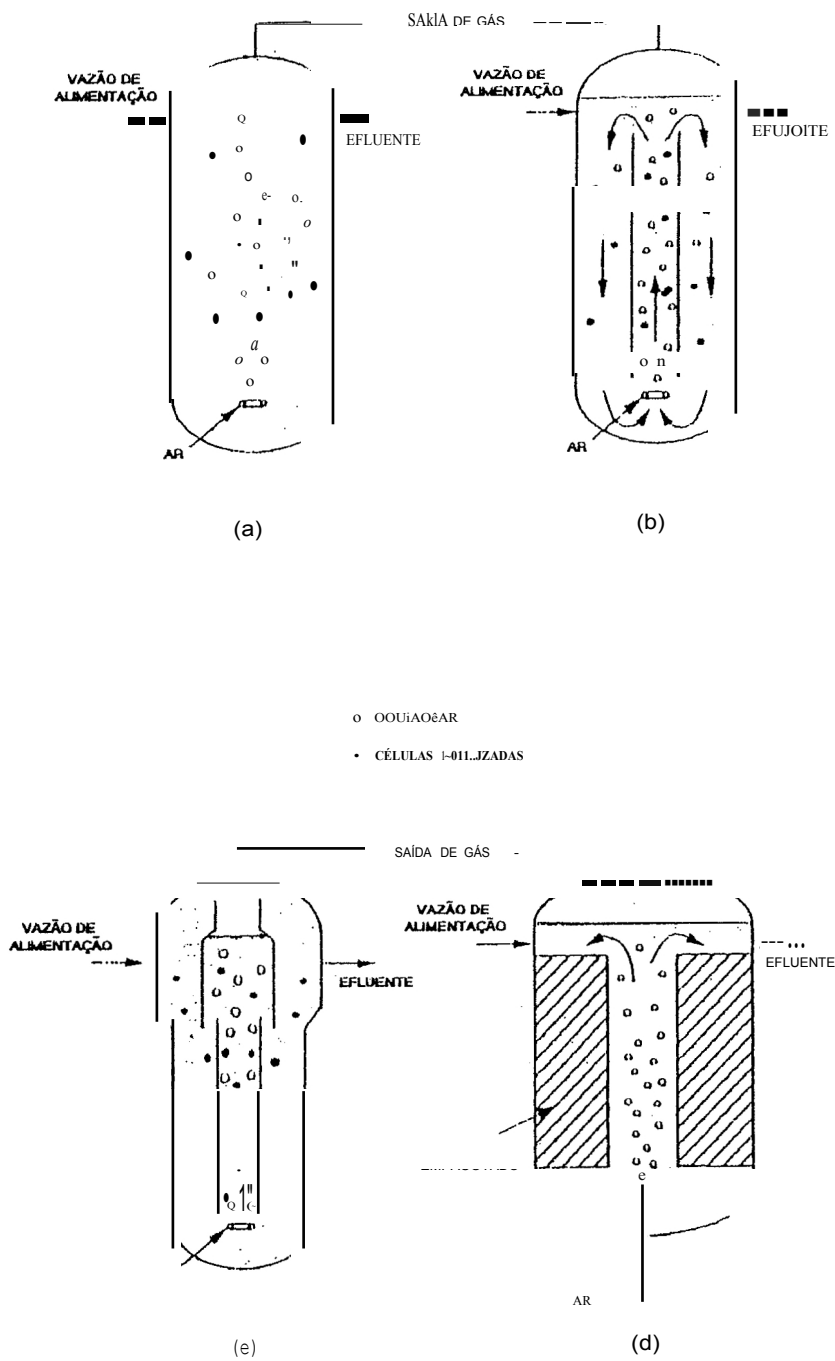


FIGURA9: Reator de coluna de bolhas: a) convencional, b) contendo "loop" externo para recirculação de fluxo ("air lift"), c) "air lift" com separador de partículas e d) "air lift com leito empacotado" (BARON et al., 1996).

2.4. MODO DE CONDUÇÃO DO PROCESSO

Outro fator importante a ser considerado é o modo de condução do processo. Segundo WINKELHAUSEN e KUSMANOVA (1998), a maioria dos artigos publicados sobre produção de xilitol por leveduras referem-se a métodos de cultivo em batelada. Ainda de acordo com estes autores, culturas em batelada são caracterizadas por altas concentrações iniciais de substrato e altas concentrações de produto ao final do processo fermentativo, além de produtividades relativamente baixas. Com relação a processos contínuos, estes autores afirmam serem os mesmos bastante adequados para a obtenção de dados sobre fisiologia de leveduras, pois informações bastante acuradas podem ser obtidas. Outro modo de condução, o sistema de batelada alimentada, tem sido sugerido por alguns pesquisadores para aumentar o fator de conversão de xilose em xilitol através da alimentação com glicose (YAHASHI et al., 1996).

SENE et al. (1998), trabalhando com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, utilizaram reciclo de células em bateladas repetidas e observaram pouca variação com relação ao fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade, o que representaria uma vantagem importante para a utilização deste processo em escala industrial, com substanciais reduções no tempo global de operação.

3.0. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- / Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia economicamente viável para a obtenção de xilitol por via fermentativa a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

3.2. ESPECÍFICOS

-); Avaliar o biorreator de coluna de bolhas para a produção de xilitol pela via biotecnológica a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.
 -); Determinar por planejamento fatorial, a influência das variáveis, vazão de ar e fator de concentração do hidrolisado na produção de xilitol em bateladas simples num reator de coluna de bolhas, usando células livres de *Candida quilliermondii* FII 20037.
- Y Elaborar modelo estatístico que expresse a produtividade empírica de xilitol, a eficiência de conversão de xilose em xilitol, o fator de conversão de xilose em xilitol, o fator de conversão de xilose em células e a concentração de xilitol em função das variáveis estudados na execução do planejamento estatístico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.1.1. Matéria prima

Neste trabalho foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina de açúcar e álcool Costa Pinto, do Grupo Cosan, localizada na cidade de Piracicaba-SP. O bagaço foi exposto ao sol por 1 dia para secagem e após esta etapa calculou-se o teor de umidade do mesmo como descrito no item 4.6.1.

4.1.2. Hidrólise ácida do bagaço de cana de açúcar

A hidrólise ácida foi realizada na planta piloto do Departamento de Engenharia Química (DEQU1) da FAENQUI em reator aço inox AISI316 com capacidade total de 250 litros, equipado com camisa de óleo térmico para aquecimento indireto por resistência elétrica (FIGURA10). A hidrólise foi realizada conforme metodologia estabelecida por PESSOA Jr. et al. (1997), porém utilizando reator de maior escala (250 litros) de acordo com as seguintes condições: temperatura de 121 °C, por 10 minutos, empregando 100 mg H₂SO₄/g de matéria seca e uma relação final de 1/10 entre matéria seca de bagaço e volume da solução de H₂SO₄.

Após resfriado, o hidrolisado foi centrifugado e estocado em câmara fria à 4 °C.

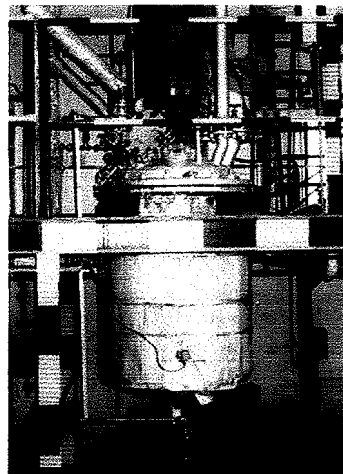


FIGURA10: Reator de hidrólise do bagaço de cana (250 litros) utilizado no presente trabalho.

4.2. CONCENTRAÇÃO E TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

O hidrolisado foi concentrado sob pressão reduzida em um concentrador com capacidade volumétrica de 32 litros a 70 °C (FIGURA11), a fim de se obter concentração de xilose adequada. Após a etapa de concentração o hidrolisado foi caracterizado quimicamente através da determinação de seus açúcares componentes, e tratado conforme metodologia estabelecida por ALVES et al. (1998). Este tratamento consistiu nas seguintes etapas: 1. adição de óxido de cálcio até pH 7,0; 2. adição de H₃P₄ até pH 5,5; 3. adição de carvão ativo 2,5% massa de carvão/volume de hidrolisado, e manutenção sob agitação em incubadora de movimento rotatório por uma hora sob 200 rpm e 30 °C. Entre as etapas o hidrolisado foi filtrado sob vácuo, sendo ao final do tratamento autoclavado sob 111 °C durante 15 min.

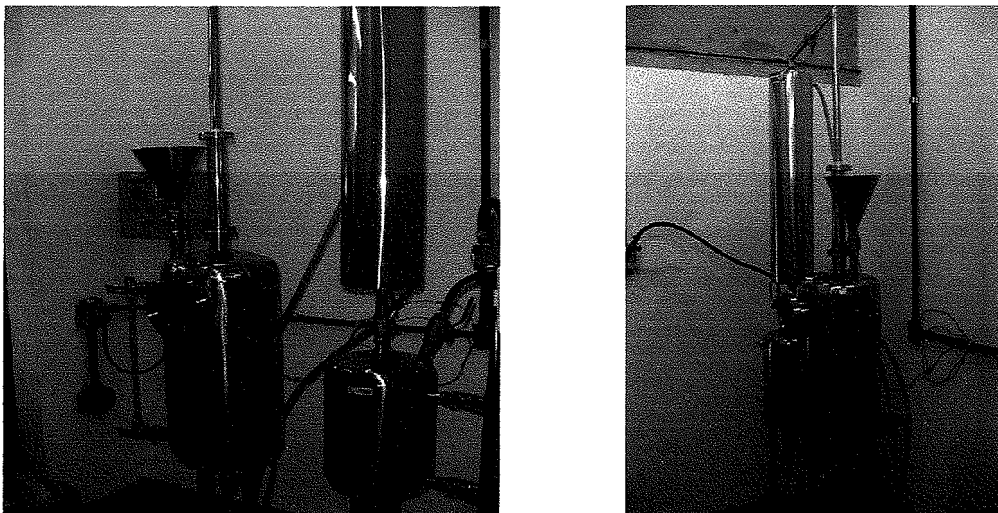


FIGURA 11: Concentrador a vácuo utilizado no presente trabalho.

4.3. MICROORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO

Os experimentos foram conduzidos com a levedura *Candida guilliermondii* FfI 20037, proveniente da coleção de culturas do DEBIQ e mantida em meio ágar extrato de malte a 4 °C.

O inóculo foi preparado por cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio sintético composto de 30 g/l de xilose, 3 g/l de sulfato de amônio, 0,1 g/l de cloreto de cálcio e 10% (v/v) de extrato de farelo de arroz. As células cultivadas em incubadora com movimento

rotatório com agitação de 200 rpm, à temperatura de 30 °C por 24 horas, foram recuperadas por centrifugação a 2000 X g por 20 min, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Volumes adequados desta solução foram utilizados como inóculo de forma a se obter uma concentração celular inicial de aproximadamente 1 g/l no reator. As soluções estoque de xilose, sulfato de amônio, cloreto de cálcio <li-hidratado foram preparadas separadamente nas concentrações de 500, 250 e 50 g/L respectivamente. A solução de xilose foi autoclavada por 15 min a 110 °C, e as demais foram esterilizadas a 121 °C por 20 minutos.

O preparo do farelo de arroz citado no parágrafo anterior ocorreu conforme explicado a seguir: foi preparada uma suspensão de farelo de arroz na proporção de 200 g de farelo para cada litro de água, suspensão esta que foi autoclavada por 15 min a 110 °C. Após o resfriamento, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 2000 X g por 30min e utilizado no cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer e nos ensaios fermentativos.

4.4. PREPARO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

Os meios foram formulados a partir dos hidrolisados concentrados e tratados conforme metodologia estabelecida por ALVES et al. (1998) e foram esterilizados e suplementados com 3g/l de sulfato de amônia, 10% (v/v) farelo de arroz e 0,1 g/l de cloreto de cálcio, conforme descrito no item 4.3.

4.5. BIORREATOR DE COLUNA DE BOLHAS E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

O processo de bioconversão foi conduzido em um reator tipo coluna de bolhas adquirido da Bioengineering (Wald, Suíça), marca PID Fermenter AWS, com capacidade nominal de 1,7 litros. Na FIGURA 12 e 13 é apresentado o reator de coluna de bolhas.

Utilizou-se 1,68 litros de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 3,50, 4,25 ou 5,00 vezes concentrado, tratado, autoclavado e suplementado da mesma forma que no preparo do inóculo, exceto em relação à xilose, e nas mesmas concentrações citadas no item 4.3. As fermentações foram realizadas em sistema descontinuo, à 30 °C, vazão de ar de 20,0, 40,0 ou 60,0 ml/min e sem controle de pH. A fermentação foi controlada utilizando

sensores apropriados no recipiente principal do reator para monitorar às variáveis: temperatura, pH, vazão de recirculação do meio no reator e vazão de ar.

O processo foi iniciado com o enchimento do reator com o meio de fermentação adicionando-se ao mesmo, volume adequado da suspensão de células livres ativas da levedura, 1,5 ml de anti-espumante e 2,0 ml de penicilina (2.106u). Em seguida, as variáveis operacionais foram ajustadas para uma temperatura de 30 °C, vazão de ar de 20,0, 40,0 ou 60,0 ml/min. Durante o processo em batelada foram retiradas amostras a cada 24 h para quantificação das variáveis do processo.

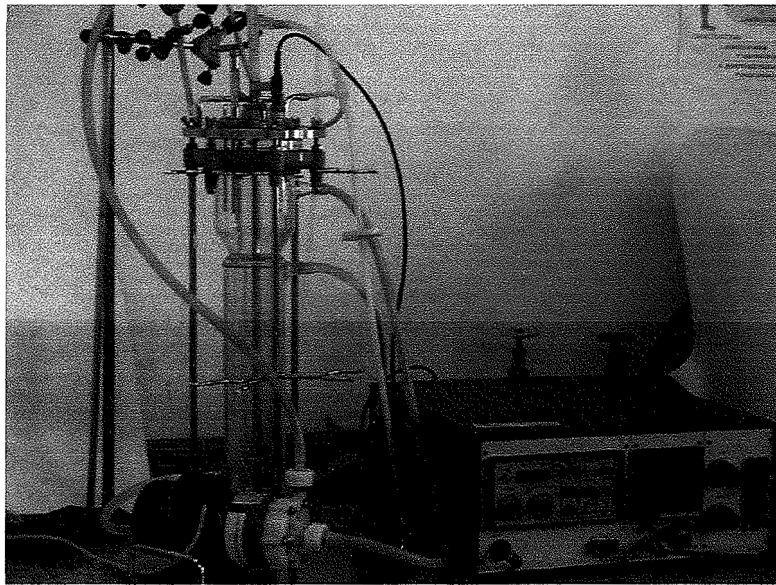


FIGURA 2: Biorreator de coluna de bolhas utilizado no presente trabalho.

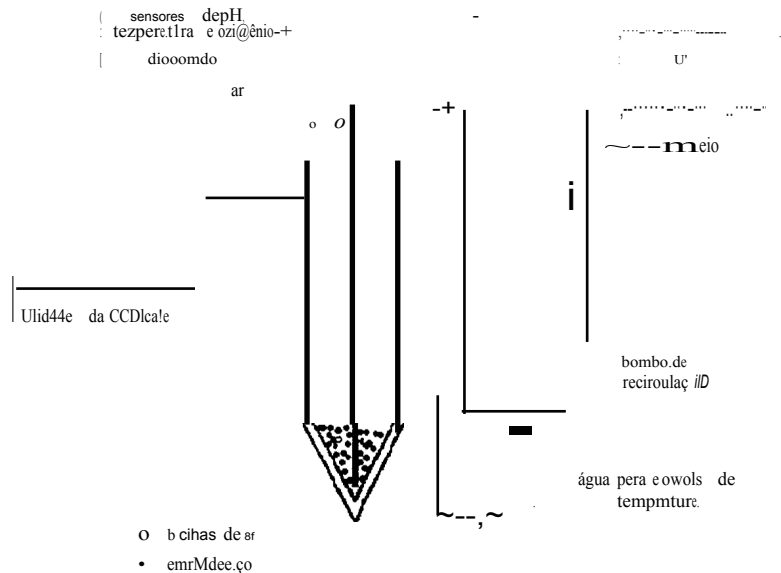


FIGURA 13: Representação esquemática do biorreator de coluna de bolhas utilizado no presente trabalho.

4.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As variáveis selecionadas foram: vazão de ar e fator de concentração do hidrolisado. Na TABELA3 estão apresentados os níveis escolhidos para cada variável. O sinal (+) representa o nível máximo; o sinal (-) o nível mínimo e o sinal (0) o ponto central. Utilizou-se um planejamento fatorial completo 2², conforme mostrado na TABELA4.

TABELA3. Codificação dos níveis para as variáveis avaliadas.

| Variáveis | Níveis | | |
|---|-----------------|--------------|-----------------|
| | Inferior (-) | Médio (0) | Superior (+) |
| X1 (vazão de ar, ml/min) | 20,0 | 40,0 | 60,0 |
| X2 (Fator de concentração do hidrolisado) | 3,50 vezes | 4,25 vezes | 5,00 vezes |

TABELA 4. Matriz do planejamento fatorial 2² para o estudo da influência das variáveis: vazão de ar e fator de concentração de hidrolisado.

| Experimentos | X1 | X2 | X1 (ml/min) | X2 |
|--------------|----|----|----------------|------|
| 1 | | | 20,0 | 3,50 |
| 2 | | + | 20,0 | 5,00 |
| 3 | + | | 60,0 | 3,50 |
| 4 | + | + | 60,0 | 5,00 |
| 5 | 0 | 0 | 40,0 | 4,25 |
| 6 | 0 | 0 | 40,0 | 4,25 |
| 7 | 0 | 0 | 40,0 | 4,25 |

Os resultados obtidos foram analisados por testes estatísticos utilizando-se o programa STATISTICA versão 5.0.

4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

A caracterização dos hidrolisados, após o procedimento de hidrólise, concentração e tratamento, foi realizada por análises de pH, graus Brix, concentração de xilose, glicose, arabinose, xilitol, etanol e compostos tóxicos como ácido acético, furfural e hidroximetil-furfural.

O acompanhamento das fermentações foi realizado por observações da viabilidade e pureza da cultura, do consumo dos açúcares glicose, xilose e arabinose e da produção de xilitol.

4.7.1. Determinação do teor de umidade do bagaço de cana de açúcar

A determinação do teor de umidade do bagaço foi realizada pela secagem de amostras em balança Mettler, com infravermelho, a 100 °C até massa constante. Calculou-se a massa de matéria seca em 20 Kg de bagaço, por ser esta a quantidade utilizada para a hidrólise no reator de 250 litros.

4.7.2. Viabilidade e pureza da cultura

A viabilidade da cultura foi verificada por visualizações microscópicas de lâminas preparadas à fresco onde as células foram coradas pela adição de igual volume de uma solução 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v), enquanto a pureza foi verificada pela coloração de Oram de acordo com PELKZAR et al. (1996). As observações de viabilidade e

pureza foram realizadas ao início e término das fermentações, em microscópio óptico Leitz.

4.7.3 Determinação da concentração celular

A concentração de células no meio de fermentação foi determinada pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B e correlacionada com a massa seca de células (g/l) por meio de uma curva de calibração previamente construída. A pesagem foi feita após secagem em estufa a 100 °C até massa constante.

4.7.4. Determinação do pH, teor de açúcares, xilitol, ácido acético

O pH foi medido no próprio fermentador e anotado a cada 24 horas. Às concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético e etanol foram determinadas por HPLC em cromatógrafo WATERS410. Para a análise do teor de açúcares, xilitol, ácido acético e etanol, as amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro *Sep Pak*: C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RADAMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µl; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel H₂SÖ40,01 N e fluxo de 0,6 ml/min.

4.7.5. Determinação da concentração de furfural e hidroxi-metil-furfural

As concentrações de furfural e hidroxi-metil-furfural foram determinadas por HPLC em cromatógrafo WATERS410. Para a análise do teor de furfural e hidroxi-metil-furfural, as amostras foram previamente diluídas e filtradas em membrana *Minisart* e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna RP 18 (200 X 4,6mm) mantida à temperatura de 25°C; volume de injeção de 20 µl; detector de ultravioleta SPD-10 UV-VIS(276 nm.); fase móvel acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético e fluxo de 0,8 ml/min.

4. 7.6. Determinação das variáveis de fermentação

a) Fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$, g xilitol/ g xilose)

$$Y_{p/s} = LW/iS = (P_f - P_i)/(S_i - S_f)$$

onde:

P_f = concentração final de xilitol,

P_i = concentração inicial de xilitol,

S_f = concentração final de xilose e

S_i = concentração inicial de xilose.

b) Eficiência de conversão de xilose em xilitol (E)

$$E(\%) = (Y_{p/s} \text{ obtido} / Y_{p/s} \text{ teórico}) \times 100\%$$

onde:

$Y_{p/s} \text{ teórico} = 0,917 \text{ g xilitol/g xilose}$ (BARBOSA et al., 1988).

c) Produtividade volumétrica em xilitol (Q_p , g xilitol/1 h)

$$Q_p = (P_r - P_i) / t$$

onde:

t = tempo de fermentação.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado como matéria prima na obtenção do hidrolisado hemicelulósico, apresentou um teor médio de 14,40% de umidade, sendo submetido posteriormente à hidrólise ácida e concentrado em rotava por.

5.1.1. Caracterização parcial do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar antes e após a etapa de concentração

Os hidrolisados, não concentrado (original) e concentrados com o fator de concentração (FC) de 3,50 (FC3,50), 4,25 (FC4,25) e 5,00 (FC5,00), foram caracterizados físico-quimicamente (TABELA 5).

TABELA 5: Caracterização físico-química dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar não tratados.

| Variáveis | ORIGINAL | FC 3,50 | FC 4,25 | FC 5,00 |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>pH</i> | 1,05 | 0,70 | 0,60 | 0,45 |
| <i>vBrix</i> | 3,60 | 12,0 | 14,7 | 16,8 |
| <i>Glicose</i> " | 0,520 | 2,60 | 2,91 | 4,28 |
| <i>Xilose</i> " | 17,0 | 58,4 | 65,5 | 85,8 |
| <i>Arabinose</i> " | 0,74 | 2,12 | 3,25 | 4,66 |
| <i>Ácido acético</i> " | 0,87 | 1,96 | 2,66 | 2,80 |
| <i>Furfural</i> <i>r</i> | 0,93.10 ⁻¹ | 0,32.10 ⁻¹ | 0,18.10 ⁻¹ | 0,11.10 ⁻¹ |
| <i>Hidroxi-metilfurfural</i> <i>r</i> | 0,06 | 0,14. 10 ⁻¹ | 0,22.10 ⁻¹ | 0,26.10 ⁻¹ |

*g/L

Os hidrolisados hemicelulósicos tem uma mistura complexa de açúcares que inclui xilose, arabinose, glicose, galactose e manose (PEREGO et al., 1990; ROBERTO et al., 1995; HESPELL et al., 1997). Estes açúcares podem influenciar o rendimento e a produtividade de xilitol durante a fermentação da xilose (WALTHER et al., 2001).

Observa-se na TABELA 5, que o açúcar predominante no hidrolisado é a xilose, independente do fator de concentração do hidrolisado, seguido de arabinose e glicose que estão em menor quantidade, conforme já constatado (FELIPE et al., 1993; ALVES et al., 1997). Isto ocorre devido às condições de hidrólise empregadas, que permitem o fracionamento seletivo dos açúcares presentes na fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que a concentração de xilose foi significativamente superior à concentração de glicose. De acordo com PARA. JÁ et al. (1998b) a hidrólise ácida branda (pré-hidrólise) possibilita o fracionamento seletivo dos açúcares presentes na fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos, permitindo a obtenção de um hidrolisado rico em xilose e de um resíduo sólido contendo celulose e lignina. A formação de xilitol a partir do cultivo da levedura no hidrolisado é favorecida pela presença de elevadas concentrações de xilose em relação à glicose, uma vez que enzimas envolvidas nesta bioconversão são induzidas em presença de xilose ou arabinose e podem ser reprimidas em presença de glicose (KERN et al., 1997; SILVA et al., 2004).

Encontram-se no hidrolisado arabinose e ácido acético, compostos naturalmente presentes, na fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos, além de compostos derivados da degradação parcial de açúcares, como furfural e hidroximetilfurfural (RODRIGUES et al., 1998).

O maior problema em relação à hidrólise de materiais lignocelulósicos é a formação de subprodutos que inibem a fermentação do hidrolisado, afetando a bioconversão de açúcares em produtos de interesse (PALMKVIST, HAHN-HAGERDAL, 2000). Os compostos tóxicos nos hidrolisados hemicelulósicos identificados foram ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. Dentre estes compostos, o ácido acético apresentou maior concentração, apesar de não ter sua concentração aumentada proporcionalmente em relação ao fator de concentração do hidrolisado. Segundo SILVA et al. (1998) a concentração dos compostos tóxicos nos hidrolisados hemicelulósicos varia em função do tipo de material lignocelulósico e das condições hidrolíticas empregadas para a obtenção do mesmo. Observa-se que o hidroximetilfurfural teve sua concentração aumentada, de acordo com o fator de concentração do hidrolisado, enquanto o mesmo não ocorreu com o furfural. A característica volátil deste composto, os quais tem suas concentrações reduzidas durante o

processo de concentração a 70 °C, foi também uma característica observada e relatada por SILVA et al. (2000) e RODRIGUES et al. (2001). O baixo pH (pH=1) pode contribuir para a volatilização parcial do ácido acético durante o processo de concentração a vácuo, já que nestas condições este está 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 à condição de pressão reduzida e temperatura acima de 55 °C, pois o seu ponto de ebulição é de 54-55 °C (PERRY, 1997).

5.1.2. Caracterização parcial do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar após a etapa de tratamento

Os hidrolisados concentrados com o fator de concentração (FC) de 3,50 (FC3,50), 4,25 (FC4,25) e 5,00 (FC5,00) vezes, foram tratados e caracterizados físico-quimicamente (TABELA 6).

TABELA 6: Caracterização físico-química dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar tratados.

| Variáveis | FC 3,50 | FC 4,25 | FC 5,00 |
|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>pH</i> | 4,52 | 4,88 | 4,95 |
| <i>oBrix</i> | 8,0 | 8,8 | 10,2 |
| <i>Glicose"</i> | 2,393 | 2,56 | 4,084 |
| <i>Xilose"</i> | 53,40 | 58,86 | 76,11 |
| <i>Arabinose"</i> | 1,763 | 2,628 | 4,481 |
| <i>Ácido acético:</i> | 1,743 | 2,159 | 2,300 |
| <i>Furfuralr</i> | nd | 0,00564 | 0,00222 |
| <i>Hidroxi- metilfurfural"</i> | nd | nd | nd |

*g/L; nd - não detectável

Diferentes estratégias tem sido desenvolvidas para reduzir a concentração de compostos inibitórios no hidrolisado, incluindo alteração de pH e adição de carvão ativo (ALVES et al., 1998), os quais foram utilizados neste trabalho. Na TABELA 6 estão apresentados os resultados da

caracterização dos hidrolisados, após o tratamento com óxido de cálcio, ajuste de pH com ácido fosfórico e adsorção em carvão ativo. Observa-se que ocorreu redução na concentração de açúcares após o tratamento dos hidrolisados (TABELA 6), sendo esta redução mais acentuada no hidrolisado com maior fator de concentração (FC 5,00). Neste caso, observa-se uma variação do valor inicial de xilose de 85,88 para 76,11 g/L, ou seja, perda de aproximadamente 11% no teor desta pentose, semelhante ao observado por MARTON et al. (2003). Segundo ROSA et al. (1998) a concentração de xilose é um dos principais fatores que influenciam na produtividade volumétrica em 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.

Conforme os resultados obtidos foi possível verificar que o tratamento foi capaz de promover uma redução da concentração de compostos inibitórios, tais como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. Não foi detectada a presença de hidroximetilfurfural após o tratamento dos hidrolisados, semelhante ao observado por RODRIGUES et al. (2001), que observou também que a concentração de furfural diminuiu após o tratamento já mencionado.

5.2. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Com o objetivo de verificar a influência da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado na produção de xilitol pela levedura *Candida quilliermondii* em reator de coluna de bolhas, o tempo final de fermentação foi determinado quando foram obtidos os valores máximos de concentração final de xilitol sem que houvesse consumo do mesmo. Quando o xilitol foi consumido como fonte de carbono e energia, ocorreu a diminuição dos valores de produtividade volumétrica e do fator de conversão de xilose em xilitol, o que não é interessante para o processo.

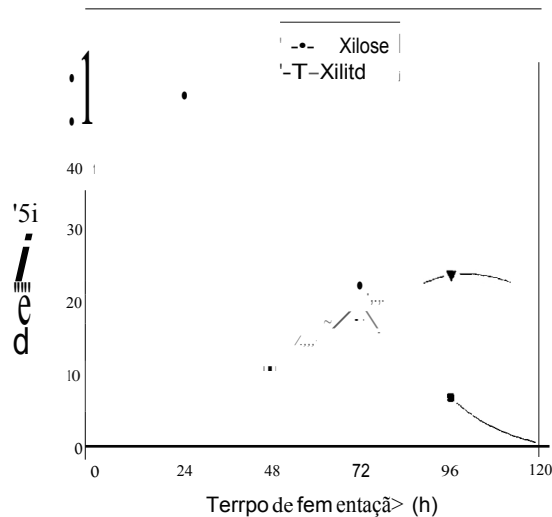


FIGURA 14: Variação das concentrações de xilose e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60,0 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes).

O experimento 4 (FIGURA 14) apresentou os melhores resultados e o tempo final de fermentação ocorreu em 96 horas, uma vez que na análise realizada após este intervalo de tempo constatou-se que ocorreu consumo do xilitol presente no meio fermentativo.

Na TABELA 7 estão relatados os resultados obtidos em todos os experimentos realizados.

O processo fermentativo no qual ocorre a bioconversão de xilose em xilitol é realizado em condições de limitação de oxigênio. Sob estas condições, observa-se acúmulo de xilitol, graças à limitação da quantidade de cofatores oxidados (NAD⁺ ou NAD(P)⁺) necessários à atividade da enzima xilitol desidrogenase (XD) e a elevação da concentração de cofator reduzido (NADPH₂) (ROSEIRO et al., 1991; NOLLEAU et al. 1995). A velocidade de transferência de oxigênio adequada é essencial para obter alta eficiência no processo fermentativo (MUSSATO et al., 2004). No caso de *Candida guillienondii*, baixa disponibilidade de oxigênio favorece o acúmulo de xilitol, devido à supressão da via das fosfopentoses (BARBOSA et al., 1988; GRANSTROM et al., 2001). Quando condições anaeróbias são utilizadas no processo, ocorre um desequilíbrio no potencial redox da célula, devido à elevação na concentração

de NADPH₂, o que leva a diminuição da formação de biomassa. Desta forma a célula utiliza o NADPH₂, que é tóxico em altas concentrações, como cofator da enzima XR aumentando a produção e a produtividade de xilitol e recuperando o cofator oxidado. Por outro lado, condições de elevada aeração, desviam o metabolismo microbiano para a produção de células, diminuindo a produção de xilitol (FARIA et al., 2002).

Como este é um trabalho inicial, na tentativa de encontrar uma faixa de valores que conduzisse a condições de limitação de oxigênio no biorreator utilizado, e objetivando aumentar a produção e a produtividade de xilitol, optou-se pela seleção das vazões de ar baseando-se nos valores utilizados pelo Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos da FAENQUIL. Um dos trabalhos deste grupo realizado em condições experimentais semelhantes, entretanto utilizando o sistema de células imobilizadas ao invés de células livres, utilizou as vazões de ar: 20,0, 40,0 e 60,0 ml/min (SANTOS, 2005). A diferença entre células livres e o sistema com células imobilizadas é que o suporte utilizado para imobilização celular (zeólita, $d = 1,91\text{g/ml}$) no trabalho citado, promoveu uma quebra efetiva das bolhas de ar, ocorrendo um aumento da área interfacial de contato entre as bolhas e o meio fermentativo, diminuindo portanto o tamanho das bolhas e melhorando assim a transferência de oxigênio do ar para o meio. As propriedades das partículas com células imobilizadas utilizadas em biorreatores influenciam a transferência de oxigênio e também a transferência de substratos dentro do reator. PAZ et al. (1993), estudando a produção de ácido acético por células de *Acetobacter sp.* FIPT 2026 imobilizadas em alginato de cálcio (com e sem a adição de alumina) num biorreator, observaram que a adição de alumina na solução aquosa de alginato de sódio utilizada para a imobilização das células, acarretou na formação de partículas mais densas. Tais partículas (alginato + alumina) permitiram melhores taxas de transferência de oxigênio, que resultou no aumento da produtividade volumétrica de ácido acético quando comparado ao sistema com células livres ou imobilizadas em alginato sem a adição de alumina.

Apesar das observações realizadas acima, optou-se por utilizar as vazões de ar de 20,0, 40,0 e 60,0 m.l/min, e analisar os resultados experimentais, os quais estão descritos abaixo.

1. **Objetivo:** Avaliar o efeito da concentração de X_1 e X_2 na produção de Y .
 2. **Justificativa:** A otimização dos processos de produção é essencial para a competitividade das indústrias.
 3. **Metodologia:** Utilização do planejamento fatorial para a análise dos efeitos das variáveis independentes.
 4. **Resultados Esperados:** Identificação das condições ideais de produção para maximizar a eficiência.

| N.º Exp. | X_1 | X_2 | Y | X_1 | X_2 | Y | X_1 | X_2 | Y | X_1 | X_2 | Y |
|----------|-------|-------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-----|
| 1 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 2 | 20 | 30 | 30 | 20 | 30 | 30 | 20 | 30 | 30 | 20 | 30 | 30 |
| 3 | 30 | 20 | 20 | 30 | 20 | 20 | 30 | 20 | 20 | 30 | 20 | 20 |
| 4 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| 5 | 40 | 20 | 20 | 40 | 20 | 20 | 40 | 20 | 20 | 40 | 20 | 20 |
| 6 | 40 | 30 | 30 | 40 | 30 | 30 | 40 | 30 | 30 | 40 | 30 | 30 |
| 7 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |

* Número do experimento : Vazão de aeração e X_2 : Fator de concentração do hidrolisado

De acordo com os resultados obtidos em todos os experimentos (TABELA), observa-se que o consumo de xilose apresentou uma variação de 56,22% a 97,96%. Nos experimentos 1 e 2, utilizou-se o fator de concentração do hidrolisado de 3,50 e 5,00 vezes, respectivamente, e a vazão de ar de 20,0 ml/min, obtendo-se consumos de 66,86% a 56,22% de xilose, respectivamente, e produtividades volumétricas em xilitol de 0,09 g/1.h a 0,12 g/1.h, respectivamente. Enquanto nos experimentos 3 e 4, utilizando o fator de concentração do hidrolisado de 3,50 e 5,00 vezes, respectivamente, e a vazão de ar de 60 ml/min, obteve-se consumos de xilose de 84,79% a 88,66%, respectivamente, e as produtividades volumétricas em xilitol de 0,23 g/1.h a 0,25 g/1.h, respectivamente. Analisando estes resultados, pode-se dizer que as produtividades volumétricas em xilitol (Q_p) aumentaram quando a vazão de ar aumentou, o que sugere que ocorreu maior desvio do metabolismo de xilose para a produção de xilitol em relação à biomassa no decorrer do tempo de fermentação. Portanto, na vazão de ar de 60 ml/min a transferência de oxigênio do meio para o interior das leveduras não ocorreu de forma eficiente.

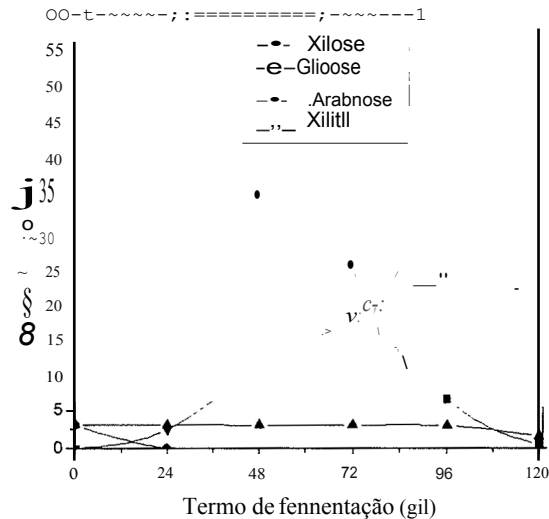


FIGURA 15: Variação das concentrações de xilose, glicose, arabinose e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes).

De acordo com a FIGURA 15 observa-se que ocorreu uma diminuição da concentração de xilose até 120 horas de fermentação, enquanto o aumento da concentração de xilitol ocorreu até 96 horas. A levedura *Candida guilliermondii* consumiu 88,66% de xilose em 96 horas, porém a bioconversão esperada não ocorreu de forma eficiente pois o maior valor de Y_p/s obtido foi 0,46 g xilitol/ g xilose (TABELA 7) na vazão de ar de 0,036 vvm (60 ml/min). Resultados semelhantes foram encontrados por MOLWITZ et al. (1996), que, trabalhando com células livres de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, observaram que o mais alto fator de conversão em xilitol (0,46 g xilitol/g xilose) foi obtido quando a vazão de ar foi de 0,05 vvm em reator de mistura.

Na FIGURA 15 e na TABELA 8 observou-se a variação da concentração de glicose no experimento 4. De acordo com os resultados (não apresentados), observa-se que o consumo total de glicose ocorreu nas primeiras 24 horas em todos os ensaios fermentativos, inclusive no experimento 4. Este fato também foi observado em fermentações realizadas com hidrolisados de bagaço de cana de açúcar por RODRIGUES (1999), quando utilizou a levedura *Candida guilliermondii*.

De acordo com a FIGURA 15 e com a TABELA8 (experimento 4); observou-se uma assimilação lenta de arabinose em 96 horas de fermentação, apresentando um consumo de 6,703% (TABELA7). Resultados semelhantes foram obtidos em todos os experimentos. Na FIGURA15 observa-se que em 120 horas de fermentação, quando a concentração de xilose se aproximou de zero, a levedura consumiu 50,32% de arabinose. Estes resultados indicam uma inibição do consumo de arabinose quando o cultivo de *Candida guilliermondii* é realizado na presença de xilose. De acordo com MEYRIAlet al. (1991), *Candi.da guilliermondii* é capaz de converter arabinose em arabitól assim como diversas leveduras do gênero *Candida* (DIENet al., 1996).

TABELA8: Variação da concentração da glicose e da arabinose em função do tempo no experimento 4.

| Tempo de fermentação (h) | Concentração da glicose (g/l) | Concentração da arabinose (g/l) |
|---------------------------------|--------------------------------------|--|
| 0 | 3,128 | 3,237 |
| 24 | 0 | 3,155 |
| 48 | | 3,121 |
| 72 | | 3,085 |
| 96 | | 3,020 |
| 120 | | 1,608 |

O metabolismo de arabinose e xilose em meio semi-definido utilizando a levedura *Candi.da guilliermondi.i* foi observado por LIMA(2002), apresentando comportamento semelhante ao observado neste trabalho.

A TABELA7 apresenta o consumo de arabinose, na qual observa-se que a levedura assimilou de 6,703% a 32,95% nos experimentos 4 e 5, respectivamente.

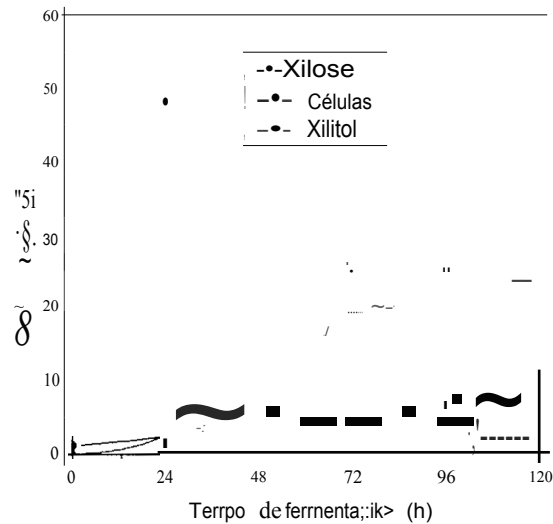


FIGURA 16: Variação das concentrações de xilose, células e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes).

De acordo com a FIGURA 16 (experimento 4) observamos a diminuição da concentração da xilose e um aumento na concentração de xilitol nas primeiras 96 horas de fermentação, enquanto a concentração celular chega ao máximo neste intervalo de tempo.

Na FIGURA 16, observa-se que após 96 horas de fermentação ocorreu a redução da concentração do xilitol, que foi utilizado pela levedura como fonte de carbono e energia. RODRIGUES et al. (2003) observaram a capacidade de *Candi.daquilliermondii* em assimilar o xilitol formado, e isto ocorre quando a xilose está em baixas concentrações no meio fermentativo. Apesar desta levedura ter consumido quantidades superiores a 80% de xilose nos ensaios fermentativos 3, 4, 5 e 6, o maior valor de $Y_{p/s}$ obtido no trabalho foi de 0,46 gxilitol/gxilose no experimento 4 (TABELA 7), enquanto o $Y_{p/s}$ teórico calculado é de 0,917 gxilitol/gxilose (BARBOSA et al., 1988).

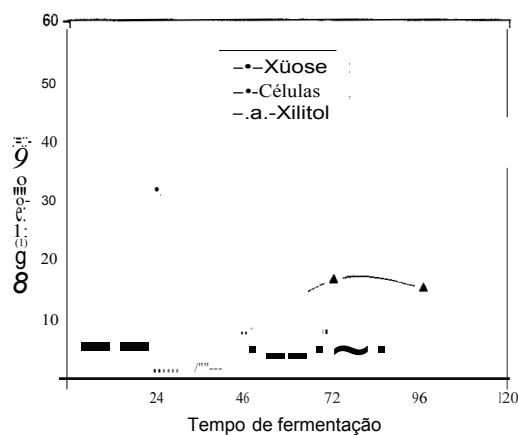


FIGURA 17: Variação das concentrações de xilose, células e xilitol no experimento 3 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 3,50 vezes).

De acordo com as FIGURAS 16 e 17 (experimento 3 e 4, respectivamente) observa-se que ocorreu um consumo de parte do xilitol (diminuição da concentração) produzido em diferentes intervalos de tempo de fermentação. No experimento 3, o consumo ocorreu após 72 horas de fermentação, enquanto no experimento 4 ocorreu somente após 96 horas.

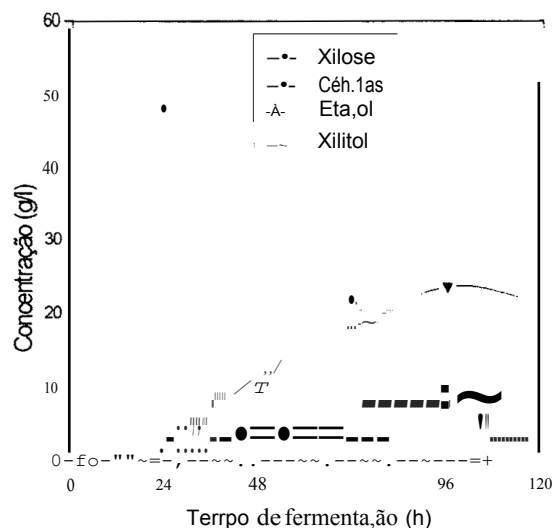


FIGURA18: Variação das concentrações de xilose, células, etanol e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes).

De acordo com a TABELA 7, os valores de eficiência de conversão calculados foram inferiores a 50%, sendo de 26,86% e 49,80% nos ensaios 1 e 4, respectivamente. De forma análoga, os valores da concentração de xilitol foram inferiores a 24,00 g/l, variando entre 7,860 g/l e 23,57 g/l nos ensaios 1 e 4, respectivamente. Estes resultados sugerem que uma parte da xilose consumida foi desviada para a formação de etanol e outros subprodutos da via fermentativa, além de biomassa. Esta suposição baseia-se na comparação entre produção de biomassa e etanol em 96 horas de fermentação no experimento 4, onde se obteve 4,71 g/l e 6,76 g/l, respectivamente (FIGURA 18).

Observa-se que a levedura produziu etanol como subproduto em todos os ensaios fermentativos, sendo a concentração máxima de 6,76g/l em 96 horas de fermentação no experimento 4 (FIGURA18), havendo o consumo do mesmo após este intervalo de tempo, possivelmente devido à baixa concentração de xilose no meio. Em condições semelhantes RODRIGUES (1999) cultivou células livres de *Candida quilliermondii*, relatando a produção de 5,5 g/l de etanol após 60 horas de fermentação.

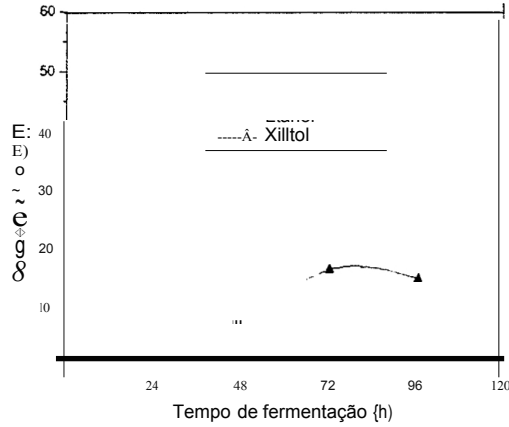


FIGURA 19: Variação das concentrações de ácido acético, etanol e xilitol no experimento 3 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 3,50 vezes).

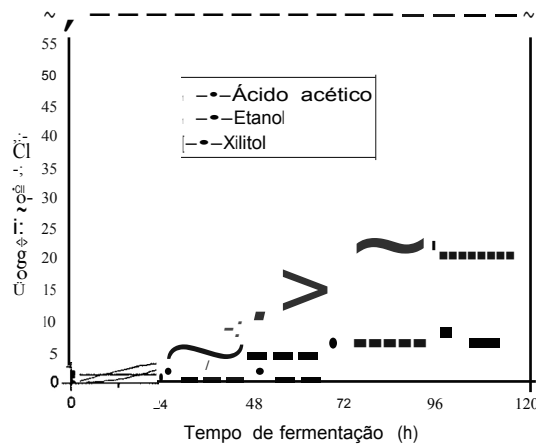


FIGURA 20: Variação das concentrações de ácido acético, etanol e xilitol no experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes).

Nas FIGURAS 19 e 20, observa-se a variação das concentrações de ácido acético, etanol e xilose nos experimentos 3 e 4, respectivamente. FELIPE et al. (1996a) verificaram a assimilação deste ácido por *Candida quilliermondii* em fermentações com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Constatou-se

neste trabalho, que o ácido acético foi absorvido pela levedura e utilizado como fonte de carbono e energia em todos os experimentos realizados.

De acordo com van zyL et al. (1988) este ácido apresenta um efeito inibidor, dependendo principalmente da sua concentração no hidrolisado e aeração utilizada no processo. O efeito inibidor está relacionado ao pH (PARAJÓ et al., 1998c), uma vez que, em meios mais ácidos, a forma não dissociada deste ácido está presente em maiores concentrações. Nesta forma, o ácido pode difundir-se através da membrana celular, atingindo o citoplasma e, dissociar-se, diminuindo o pH intracelular a valores abaixo dos limites fisiológicos (HERRERO et al., 1985; LOHMEIER-VOGE et al., 1998; PARAJÓ et al., 1998c). Observou-se neste trabalho que o ácido acético começou a ser absorvido em todos os experimentos em 24 horas de fermentação, porém o consumo total deste ácido ocorreu apenas nos experimentos 3 e 4. Como estes experimentos apresentaram os melhores resultados, pode-se concluir que concentrações deste ácido no hidrolisado não apresentaram um efeito inibitório efetivo na aeração de 60 ml/min.

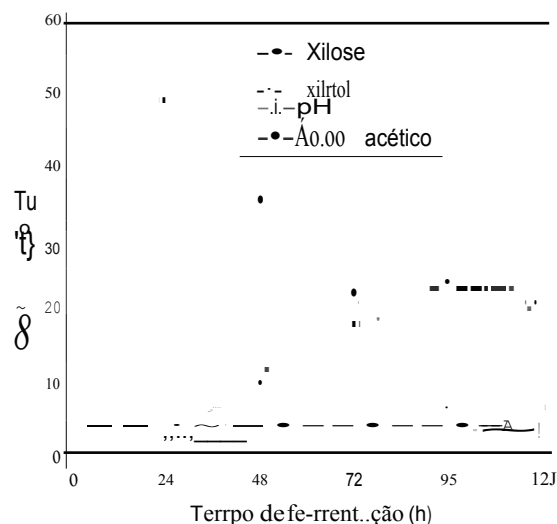


FIGURA21: Variação das concentrações de xilose, xilitol, pH e ácido acético no experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes).

Em todos os experimentos realizados não ocorreram grandes variações de pH nos intervalos de tempo avaliados. De acordo com a TABELA7, o pH final dos experimentos de 1 a 7 permaneceu entre 4,2 e 4,65. Nos experimentos 3 e 4 onde foram observadas as maiores produtividades, os valores de pH foram 4,65 e 4,63, respectivamente. FELIPE et al. (1997b) também observaram que em pH acima de 4,5 a levedura apresentou melhores resultados. Na FIGURA21 observa-se que praticamente não ocorreu variação de pH no experimento 4, e, pela análise da diminuição da concentração de ácido acético, sugere-se que o mesmo foi absorvido e utilizado pela levedura como fonte de carbono, sem causar um efeito inibitório significativo.

5.3. AVALIAÇÃO CINÉTICA

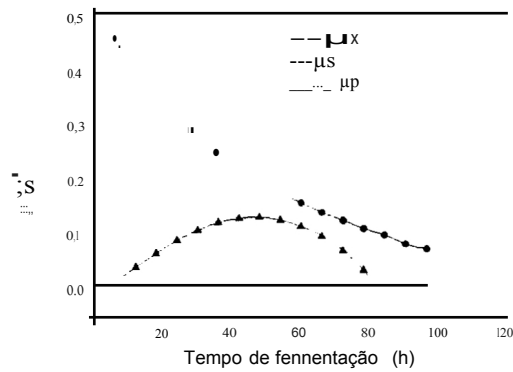


FIGURA 22: Velocidades específicas do experimento 3 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 3,50 vezes).

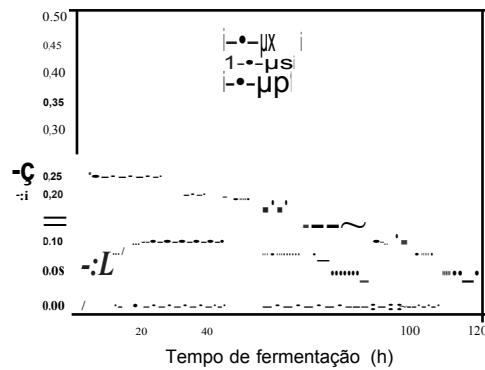


FIGURA 23: Velocidades específicas do experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes).

Visando uma melhor compreensão do processo em estudo, realizou-se uma avaliação cinética. De acordo com a FIGURA 22, observa-se o decréscimo acentuado da velocidade específica de consumo de xilose ao longo do processo, acompanhado do aumento da velocidade específica de formação de xilitol, que tem seu máximo em 48 horas de fermentação (aproximadamente 0,13 h⁻¹). A velocidade específica de crescimento celular, tem seu máximo em 24 horas de fermentação, decrescendo até o final da mesma. Observa-se que a curva da velocidade específica de consumo de xilose neste experimento apresentou uma

queda mais acentuada, o que pode ser explicado pela menor concentração de inibidores e de xilose do que no experimento 4 (TABELA 6).

Na FIGURA 23, o experimento foi realizado com o fator de concentração do hidrolisado de 5,00 vezes, e nas primeiras 6 horas de fermentação observa-se um perfil das curvas diferentes do experimento 3 neste intervalo de tempo, e a partir do mesmo o perfil das curvas torna-se semelhante. Sugere-se que a maior concentração de glicose no experimento 4 seja a responsável pela alteração do perfil das curvas, pois a mesma interfere na absorção e utilização da xilose e na formação de xilitol e biomassa. Observa-se também que a velocidade específica de consumo de substrato inicia com $0,28 \text{ h}^{-1}$, sendo pouco mais da metade da encontrada no experimento 3, o que pode ser explicado pela maior concentração de xilose e de inibidores quando comparado àquele experimento. Observa-se na FIGURA 25 que a velocidade específica de formação de xilitol teve seu máximo em aproximadamente 38 horas de fermentação, e isto ocorreu devido a maior velocidade específica de crescimento celular que no início do processo apresentava um valor maior ($0,05 \text{ h}^{-1}$) quando comparado ao experimento 3 ($0,015 \text{ h}^{-1}$), o que justifica em 42 horas de fermentação a velocidade específica de formação de xilitol atingir seu máximo.

Nas FIGURAS 24 e 25 observa-se a relação entre a velocidade específica de crescimento celular e a velocidade específica de formação de xilitol, nos experimentos 3 e 4, respectivamente, sendo avaliados os pontos finais da fermentação (de 66 a 84 horas no experimento 3, e de 72 a 96 horas no experimento 4). Estes pontos foram selecionados para estabelecer uma relação entre a produção de xilitol e o crescimento celular, pois pode-se afirmar que nestes pontos somente a fonte de carbono xilose está sendo consumida.

De acordo com KONO; ASAI, apud FELIPE et al. (1996), se a produção de xilitol e o crescimento celular ocorrem simultaneamente, conforme podemos verificar no ajuste linear mostrado na FIGURA 24 e FIGURA 25, dos experimentos 3 e 4, respectivamente, a conversão xilose-xilitol por *Candida guilliermondii* pode ser considerada um processo de formação de produto associado ao crescimento.

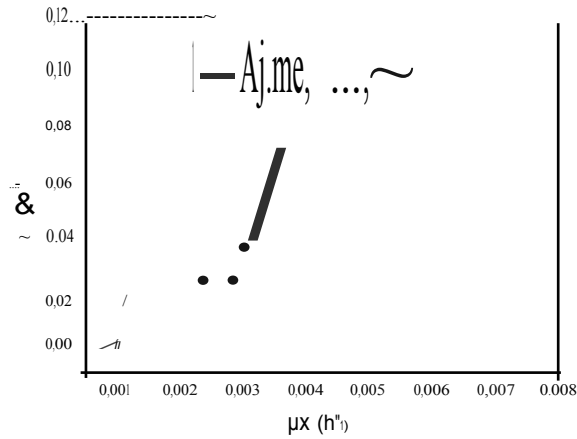


FIGURA24: Velocidade específica de crescimento celular em função da velocidade específica de formação de xilitol e ajuste linear do experimento 3 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 3,50 vezes). Equação da reta: $y = 16,45x$; $R^2 = 0,99699$.

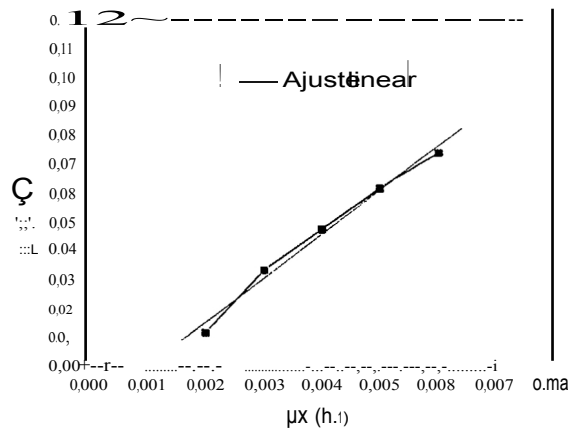


FIGURA25: Velocidade específica de crescimento celular em função da velocidade específica de formação de xilitol e ajuste linear do experimento 4 (vazão de ar de 60 ml/min e fator de concentração de hidrolisado de 5,00 vezes). Equação da reta: $y = 15,06x$; $R^2 = 0,99372$.

5.4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS VAZÃO DE AR E FATOR DE CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO NAS RESPOSTAS Y_p/s , Q_p , E , Y_x/s , P E CONCENTRAÇÃO CELULAR

Os efeitos principais, bem como aqueles devidos às interações entre as variáveis, vazão de ar (X_1) e fator de concentração do hidrolisado (X_2), foram avaliados considerando como variáveis respostas, o fator de conversão de xilose em xilitol (Y_p/s , $gxilitol/gxilose$), a produtividade volumétrica em xilitol (Q_p , $gxilitol/l.h$), o fator de conversão de xilose em células (Y_x/s , $gxilitol/g$ células), a concentração final de xilitol (P , g/l) e a concentração celular final (g/l), as quais foram determinadas através de um planejamento fatorial completo do tipo 2² com três ensaios no ponto central, de acordo com metodologia proposta por BOX et al. (1978). Na TABELA 7 são apresentados os resultados do planejamento fatorial utilizados para realização da análise estatística.

A análise dos testes estatísticos foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA versão 5.0.

5.4.1. Análise estatística do fator de conversão de xilose em xilitol

Com relação ao fator de conversão de xilose em xilito, a TABELA 9 apresenta a estimativa entre os efeitos principais, bem como aqueles devidos às interações entre as variáveis, vazão de ar (X_1) e fator de concentração do hidrolisado (X_2), os erros-padrão e o teste t de "Student". A TABELA 10 apresenta a análise de variância correspondente.

TABELA 9: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para o fator de conversão em xilitol segundo o planejamento fatorial 2².

| Variáveis Interações | Estimativas dos efeitos | Erros-padrão | t calculado |
|-------------------------|----------------------------|--------------|-------------|
| Média | 0,377* | ± 0,015* | 25,51* |
| X_2 | 0,112* | ± 0,039* | 2,869* |
| X_1 | 0,098* | ± 0,039* | 2,520* |
| $X_2 \cdot X_1$ | - 0,056 | ± 0,039 | - 1,424 |

* Significativo ao nível de 90% de confiança

De acordo com a TABELA9, observou-se que o fator de concentração do hidrolisado (X2) e a vazão de ar (Xi) foram significativos ao nível de 90% de confiança, não sendo significativa a interação entre estas variáveis. O aumento tanto no fator de concentração do hidrolisado, quanto na vazão de ar utilizada influenciaram positivamente o fator de conversão de xilose em xilitol dentro da faixa estudada, sendo o maior valor de Yp/s (0,46 g/g) - TABELA7 - obtido quando foram utilizados os níveis máximos de aeração e concentração do hidrolisado (TABELA 7). Portanto, em média, o aumento do fator de concentração do hidrolisado e da vazão de ar de seus níveis inferiores para os superiores, resultou em um aumento de 0,112 e 0,098 no valor de Yp/s, respectivamente.

TABELA10: Análise de variância do planejamento fatorial 22 para o fator de conversão em xilitol.

| Variáveis | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | p |
|-----------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------|--------|
| X2 | 0,012* | 1* | 0,012* | 8,229* | 0,064* |
| X1 | 0,010* | 1* | 0,010* | 6,348* | 0,086* |
| X2. X1 | 0,003 | 1 | 0,003 | 2,028 | 0,249 |
| Curvatura | 0,007.10 ⁻² | 1 | 0,007.10 ⁻² | 0,031 | 0,877 |
| Falta de ajuste | 0,007.10 ⁻² | 1 | 0,007.10 ⁻² | 0,031 | 0,877 |
| Erro puro | 0,004 | 2 | 0,002 | | |
| Total (corr.) | 0,030 | 6 | | | |

R2 = 0,85; *significativo ao nível de 90% de confiança

Verifica-se que a falta de ajuste não foi significativa ao nível de 85% de confiança (TABELA10), indicando que o modelo matemático descrito na EQUAÇÃO 1 ajustou adequadamente os dados experimentais. Nesta EQUAÇÃO é apresentado o modelo linear, com termo de interação, para Yp/s = f (X1, X2):

$$\text{EQUAÇÃO: } Y_{p/s} = 0,377 + 0,049 \cdot X_1 + 0,056 \cdot X_2 - 0,028 \cdot X_1 \cdot X_2$$

A análise da curvatura dentro da região estudada (TABELA 10), mostrou que esta não foi significativa ao nível de 85% de confiança para o fator de conversão de xilose em xilitol.

Observou-se que o modelo linear com termo de interação (descrito na EQUAÇÃO 1) explicou cerca de 85% da variabilidade da resposta $Y_{p/s}$ em função das variáveis estudadas (R_2 de 0,85, TABELA 10). Este percentual de variação explicada é considerado satisfatório em experimentos que utilizam sistemas biológicos em função da complexidade destes processos. Conforme os resultados obtidos e de acordo com a análise realizada, provavelmente um modelo de ordem superior ou quadrático não explicaria nem representaria melhor a variabilidade dos resultados experimentais, considerando a faixa de valores estudados.

A FIGURA 26 apresenta a superfície de resposta para o fator de conversão de xilose em xilitol, em função das variáveis, fator de concentração do hidrolisado e vazão de ar. Pode-se observar que a região otimizada que provavelmente proporcionaria um aumento de $Y_{p/s}$ ocorreria com o aumento dos valores tanto de X_1 quanto de X_2 . Considerando a proposta inicial do presente trabalho e os objetivos propostos, não foi realizado o passo ascendente, o que provavelmente proporcionaria um maior fator de conversão de xilose em xilitol como previsto pela análise estatística realizada.

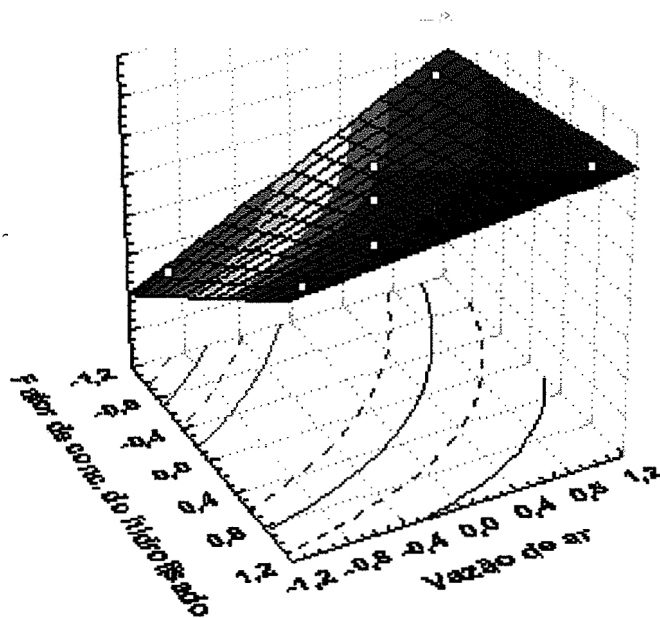


FIGURA26: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para o fator de conversão de xilose em xilitol utilizando a levedura *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.4.2. Análise estatística da produtividade volumétrica em xilitol

Com relação à produtividade volumétrica em xilitol, a TABELA 11 apresenta a estimativa entre os efeitos principais, bem como aqueles devidos às interações entre as variáveis, vazão de ar [X1] e fator de concentração do hidrolisado (X2), os erros-padrão e o teste t de "Student". A TABELA 12 apresenta a análise de variância correspondente.

TABELA11: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para a produtividade volumétrica em xilitol segundo o planejamento fatorial 2².

| Variáveis Interações | Estimativas dos efeitos | Erros-padrão | t:calculado |
|-------------------------|----------------------------|--------------|-------------|
| Média | 0,165* | ± 0,138* | 11,93* |
| X2 | 0,027 | ± 0,037 | 0,736 |
| X1 | 0,130* | ± 0,037* | 3,557* |
| X2. X1 | - 0,007 | ± 0,037 | - 0,195 |

* Significativo ao nível de 90% de confiança

De acordo com a TABELA 11, observa-se que a vazão de ar (X1) foi significativa ao nível de 90% de confiança, não sendo significativos à interação entre as variáveis X1 e X2. O aumento na vazão de ar utilizada influenciou positivamente a produtividade volumétrica em xilitol dentro da faixa estudada, sendo o maior valor de Qp (0,25 gxilitol/1.h) - TABELA 7 - obtido quando foram utilizados os níveis máximos de aeração e concentração do hidrolisado (TABELA 7). Portanto, em média, o aumento da vazão de ar de seus níveis inferiores para os superiores, resultou em um aumento de 0,130 no valor de Qp respectivamente.

TABELA 12: Análise de variância do planejamento fatorial 2² para a produtividade volumétrica em xilitol.

| Variáveis | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | p |
|-----------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------|--------|
| X2 | 0,007.10 ⁻¹ | 1 | 0,007.10 ⁻¹ | 0,542 | 0,515 |
| X1 | 0,017* | 1* | 0,017* | 12,65* | 0,038* |
| X2. X1 | 0,005.10 ⁻² | 1 | 0,005.10 ⁻² | 0,038 | 0,858 |
| Curvatura | 0,002.10 ⁻¹ | 1 | 0,002.10 ⁻¹ | 0,143 | 0,742 |
| Falta de ajuste | 0,002.10 ⁻¹ | 1 | 0,002.10 ⁻¹ | 0,143 | 0,742 |
| Erro puro | 0,003 | 2 | 0,001 | | |
| Total (corr.) | 0,022 | 6 | | | |

R₂ = 0,82; *significativo ao nível de 90% de confiança

Verifica-se que a falta de ajuste não foi significativa ao nível de 75% de confiança (TABELA12), indicando que o modelo matemático descrito na EQUAÇÃO 2 ajustou adequadamente os dados experimentais. Nesta EQUAÇÃO é apresentado o modelo linear com termo de interação para Q_p = f (X₁, X₂):

$$\text{EQUAÇÃO 2: } Q_p = 0,165 + 0,065 \cdot X_1 + 0,013 \cdot X_2 - 0,003 \cdot X_1 \cdot X_2$$

A análise da curvatura dentro da região estudada (TABELA 12), mostrou que esta não foi significativa ao nível de 75% de confiança para a produtividade volumétrica em xilitol.

Observou-se que o modelo linear com termo de interação (descrito na EQUAÇÃO 2) explicou cerca de 82% da variabilidade da resposta Q_p em função das variáveis estudadas (R₂ de 0,82, TABELA12).

A FIGURA 27 apresenta a superfície de resposta para a produtividade volumétrica em xilitol, em função das variáveis: fator de concentração do hidrolisado e vazão de ar. Pode-se observar que a região otimizada que provavelmente proporcionaria um aumento de Q_p ocorreria com o aumento

dos valores tanto de X_1 quanto de X_2 . Considerando a proposta inicial do presente trabalho e os objetivos propostos, não foi realizado o passo ascendente, o que provavelmente proporcionaria um aumento na Q_p como previsto pela análise estatística realizada.

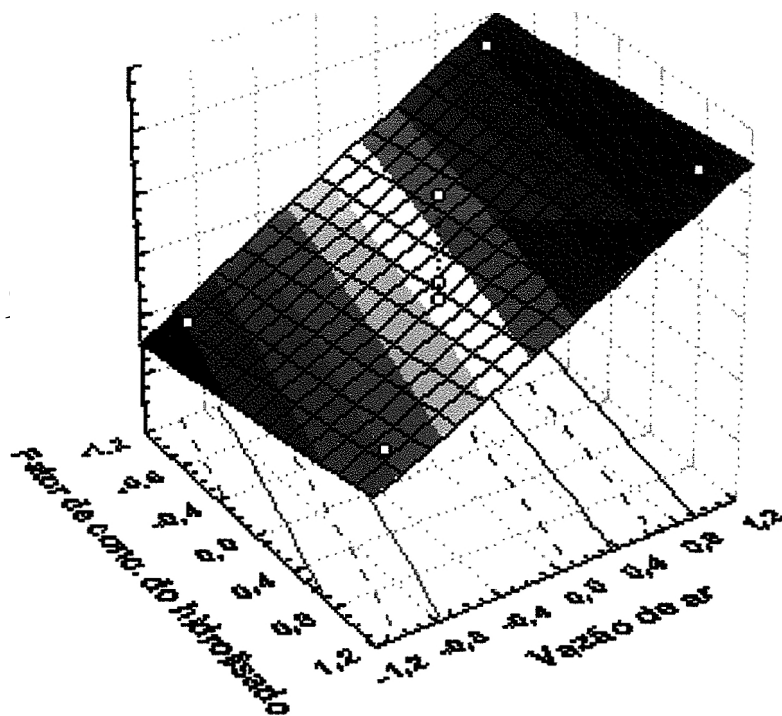


FIGURA27: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para a produtividade volumétrica em xilitol utilizando a levedura *Candiã quilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.4.3. Análise estatística do fator de conversão de xilose em células

Com relação ao fator de conversão de xilose em células, a TABELA13 apresenta a estimativa entre os efeitos principais, bem como aqueles devidos às interações entre as variáveis, vazão de ar (X_1) e fator de concentração do hidrolisado (X_2), os erros-padrão e o teste t de "Student". A TABELA 14 apresenta a análise de variância correspondente.

TABELA13: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para o fator de conversão de xilose em células segundo o planejamento fatorial 2².

| Variáveis Interações | Estimativas dos efeitos | Erros-padrão | t _{calculado} |
|-------------------------|----------------------------|--------------|------------------------|
| Média | 0,040* | ± 0,005* | 7,506* |
| | 0,003 | ± 0,014 | 0,227 |
| | 0,040* | ± 0,014* | 2,829* |
| $X_2 \cdot X_1$ | 0,013 | ± 0,014 | 0,938 |

* Significativo ao nível de 90% de confiança

De acordo com a TABELA13, observou-se que a vazão de ar (X_1) foi significativa ao nível de 90% de confiança, não sendo significativos o fator de concentração do hidrolisado (X_2) e a interação entre as variáveis X_1 e X_2 . O aumento na vazão de ar utilizada influenciou positivamente o fator de conversão de xilose em células dentro da faixa estudada, sendo o maior valor de $Y_{x/s}$ (0,07 gxilitol/gcélulas) - TABELA7 - obtido quando foram utilizados os níveis máximos de aeração e concentração do hidrolisado (TABELA7). Portanto, em média, o aumento do fator de concentração do hidrolisado e da vazão de ar de seus níveis inferiores para os superiores, resultou em um aumento de 0,040 no valor de $Y_{x/s}$ respectivamente.

TABELA14: Análise de variância do planejamento fatorial 2² para o fator de conversão de xilose em células.

| Variáveis | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | p |
|-----------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------|--------|
| X2 | 0,001.10 ⁻² | 1 | 0,001.10 ⁻² | 0,051 | 0,834 |
| X1 | 0,001 * | 1* | 0,001 * | 8,005* | 0,066* |
| X2. X1 | 0,001.10 ⁻¹ | 1 | 0,001.10 ⁻¹ | 0,879 | 0,417 |
| Curvatura | 0,009.10 ⁻² | 1 | 0,009.10 ⁻² | 0,364 | 0,607 |
| Falta de ajuste | 0,009.10 ⁻² | 1 | 0,009.10 ⁻² | 0,364 | 0,607 |
| Erro puro | 0,005.10 ⁻¹ | 2 | 0,002.10 ⁻¹ | | |
| Total (corr.) | 0,002 | 6 | | | |

R² = 0,75; *significativo ao nível de 90% de confiança

Verifica-se que a falta de ajuste não foi significativa ao nível de 61% de confiança (TABELA14), indicando que o modelo matemático descrito na EQUAÇÃO 3 ajustou adequadamente os dados experimentais. Nesta EQUAÇÃO é apresentado o modelo linear com termo de interação para $Y_{x/s} = f(X1, X2)$:

$$\text{EQUAÇÃO3: } Y_{x/s} = 0,040 + 0,020 \cdot X1 + 0,001 \cdot X2 + 0,006 \cdot X1 \cdot X2$$

A análise da curvatura dentro da região estudada (TABELA 14), mostrou que esta não foi significativa ao nível de 61% de confiança para o fator de conversão de xilose em células.

Observou-se que o modelo linear com termo de interação descrito na EQUAÇÃO3 explicou cerca de 75% da variabilidade da resposta $Y_{x/s}$ em função das variáveis estudadas (R² de 0,75, TABELA14).

A FIGURA 28 apresenta a superfície de resposta para o fator de conversão de xilose em células, em função das variáveis, fator de concentração do hidrolisado e vazão de ar. Pode-se observar que a região otimizada que provavelmente proporcionaria um aumento de $Y_{x/s}$ ocorreria com o aumento

dos valores tanto de X_1 quanto de X_2 . Considerando a proposta inicial do presente trabalho e os objetivos propostos, não foi realizado o passo ascendente, o que provavelmente proporcionaria um maior fator de conversão de xilose em xilitol como previsto pela análise estatística realizada.

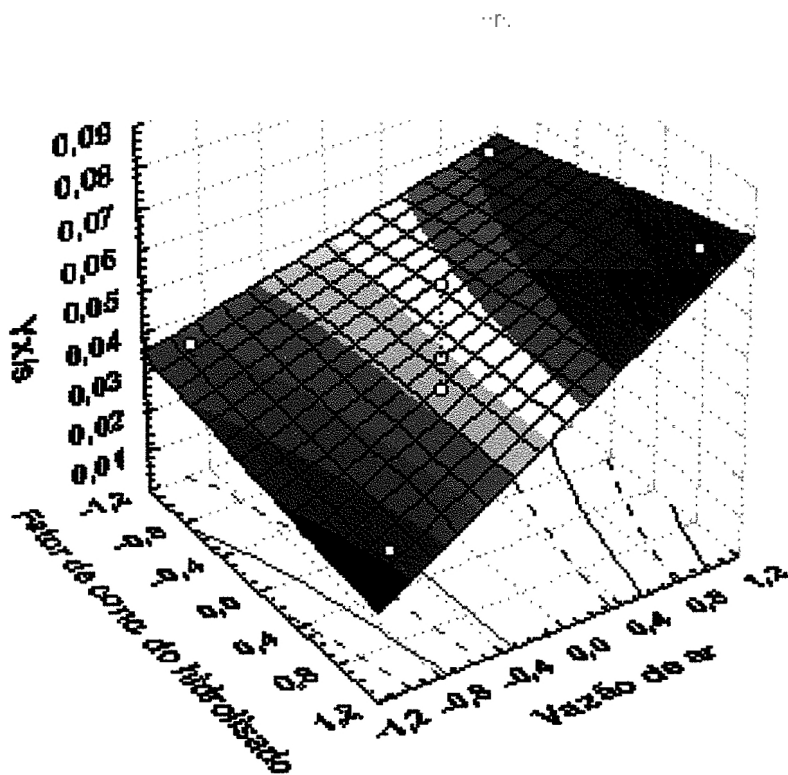


FIGURA28: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para o fator de conversão de xilose em células utilizando a levedura *Candida guillienndii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONCENTRAÇÃO FINAL DE XILITOL

Com relação à concentração de xilitol, a TABELA 15 apresenta a estimativa entre os efeitos principais, bem como aqueles devidos às interações entre as variáveis, vazão de ar (X1) e fator de concentração do hidrolisado (X2), os erros-padrão e o teste t de "Student". A TABELA 16 apresenta a análise de variância correspondente.

TABELA 15: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para a concentração de xilitol segundo o planejamento fatorial 2².

| Variáveis Interações | Estimativas dos efeitos | Erros-padrão | t calculado |
|-------------------------|----------------------------|--------------|-------------|
| Média | 15,41 * | ± 1,289* | 11,95* |
| X2 | 7,074 | ± 3,411 | 2,074 |
| X1 | 8,634* | ± 3,411* | 2,531* |
| X2. X1 | 0,245 | ± 3,411 | 0,072 |

* Significativo ao nível de 90% de confiança

De acordo com a TABELA 15, observou-se que a vazão de ar (X1) foi significativa ao nível de 90% de confiança, não sendo significativos o fator de concentração do hidrolisado (X2) e a interação entre as variáveis X1 e X2. O aumento na vazão de ar utilizada influenciou positivamente a concentração de xilitol dentro da faixa estudada, sendo o maior valor da concentração de xilitol (23,57g/l) - TABELA 7 - obtido quando foram utilizados os níveis máximos de aeração e concentração do hidrolisado (TABELA 7). Portanto, em média, o aumento do fator de concentração do hidrolisado e da vazão de ar de seus níveis inferiores para os superiores, resultou em um aumento de 8,634 no valor da concentração de xilitol, respectivamente.

TABELA 16: Análise de variância do planejamento fatorial ²² para a concentração de xilitol.

| Variáveis | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | p |
|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|--------|--------|
| X2 | 50,05 | 1 | 50,05 | 4,302 | 0,129 |
| X1 | 74,55* | 1* | 74,55* | 6,409* | 0,085* |
| X2. X1 | 0,060 | 1 | 0,060 | 0,005 | 0,947 |
| Curvatura | 0,311 | 1 | 0,311 | 0,018 | 0,905 |
| Falta de ajuste | 0,311 | 1 | 0,311 | 0,018 | 0,905 |
| Erro puro | 34,58 | 2 | 17,29 | | |
| Total (corr.) | 159,5 | 6 | | | |

R² = 0,78; *significativo ao nível de 90% de confiança

Verifica-se que a falta de ajuste não foi significativa ao nível de 90% de confiança (TABELA16), indicando que o modelo matemático descrito na EQUAÇÃO 4 ajustou adequadamente os dados experimentais. Nesta EQUAÇÃO é apresentado o modelo linear com termo de interação para $P = f(X1, X2)$:

$$\text{EQUAÇÃO4: [xilitol]} = 15,41 + 4,317 \cdot X1 + 3,537 \cdot X2 + 0,122 \cdot X1 \cdot X2$$

A análise da curvatura dentro da região estudada (TABELA 16), mostrou que esta não foi significativa ao nível de 90% de confiança para a concentração de xilitol.

Observou-se que o modelo linear com termo de interação (descrito na EQUAÇÃO 4) explicou cerca de 78% da variabilidade da resposta da concentração de xilitol em função das variáveis estudadas (R² de 0,78, TABELA16).

A FIGURA29 apresenta a superfície de resposta para a concentração de xilitol, em função das variáveis: fator de concentração do hidrolisado e vazão de ar. Pode-se observar que a região otimizada que provavelmente proporcionaria um aumento da concentração de xilitol ocorreria com o

aumento dos valores tanto de X_1 quanto de X_2 . Considerando a proposta inicial do presente trabalho e os objetivos propostos, não foi realizado o passo ascendente, o que provavelmente proporcionaria um aumento na concentração em xilitol como previsto pela análise estatística realizada.

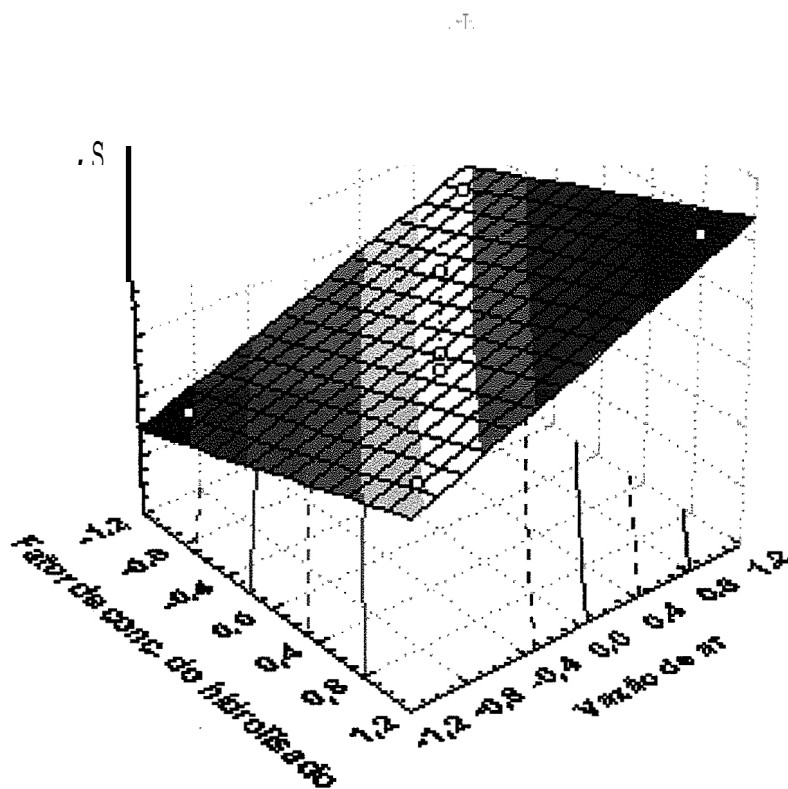


FIGURA 29: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para a concentração de xilitol utilizando a levedura *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.4.5. Análise estatística da eficiência de conversão de xilose em xilitol

Com relação à eficiência de conversão de xilose em xilitol, a TABELA17 apresenta a estimativa entre os efeitos principais, bem como aqueles devidos às interações entre as variáveis, vazão de ar (X1) e fator de concentração do hidrolisado (X2), os erros-padrão e o teste t de "Student". A TABELA 18 apresenta a análise de variância correspondente.

TABELA17: Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para a eficiência de conversão de xilose em xilitol segundo o planejamento fatorial 22.

| Variáveis Interações | Estimativas dos efeitos | Erros-padrão | t:calculado |
|-------------------------|----------------------------|--------------|-------------|
| Média | 41,06* | ± 1,609* | 25,51 * |
| X2 | 12,21 * | ± 4,258* | 2,868* |
| X1 | 10,73* | ± 4,258* | 2,519* |
| X2. X1 | - 6,065* | ± 4,258 | - 1,424 |

* Significativo ao nível de 90 % de confiança

De acordo com a TABELA17, observou-se que a vazão de ar (X1) e o fator de concentração do hidrolisado (X2) foram significativas ao nível de 90% de confiança, não sendo significativa a interação entre as variáveis X1 e X2. O aumento tanto no fator de concentração do hidrolisado, quanto na vazão de ar utilizada influenciaram positivamente a eficiência de conversão de xilose em xilitol dentro da faixa estudada, sendo o maior valor da concentração de xilitol (49,80%) - TABELA7 - obtido quando foram utilizados os níveis máximos de aeração e concentração do hidrolisado (TABELA7). Portanto, em média, o aumento do fator de concentração do hidrolisado e da vazão de ar de seus níveis inferiores para os superiores, resultou em um aumento de 12,21 e 10,73 no valor da eficiência de conversão de xilose em xilitol, respectivamente.

TABELA18: Análise de variância do planejamento fatorial 2² para a eficiência de conversão de xilose em xilitol.

| Variáveis | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F | p |
|-----------------|-----------------|--------------------|------------------|-------|-------|
| X2 | 149,2 | 1 | 149,2 | 5,570 | 0,877 |
| X1 | 115,1 | 1 | 115,1 | 4,296 | 0,173 |
| X2. X1 | 36,78 | 1 | 36,78 | 1,372 | 0,362 |
| Curvatura | 0,818 | 1 | 0,818 | 0,305 | 0,877 |
| Falta de ajuste | 0,818 | 1 | 0,818 | 0,305 | 0,877 |
| Erro puro | 53,53 | 2 | 26,79 | | |
| Total (corr.) | 355,6 | 6 | | | |

R² = 0,85 ; *significativo ao nível de 90% de confiança

Verifica-se que a falta de ajuste não foi significativa ao nível de 85% de confiança (TABELA18), indicando que o modelo matemático descrito na EQUAÇÃO 5 ajustou adequadamente os dados experimentais. Nesta EQUAÇÃO é apresentado o modelo linear com termo de interação para E= f (X1, X2):

$$\text{EQUAÇÃO5: } E = 41,06 + 5,365 \cdot X1 + 6,108 \cdot X2 - 3,032 \cdot X1 \cdot X2$$

A análise da curvatura dentro da região estudada (TABELA 18), mostrou que esta não foi significativa ao nível de 85% de confiança para eficiência de conversão de xilose em xilitol.

Observou-se que o modelo linear com termo de interação (descrito na EQUAÇÃO5) explicou cerca de 85% da variabilidade da resposta da eficiência de conversão de xilose em xilitol em função das variáveis estudadas (R² de 0,85, TABELA18).

A FIGURA30 apresenta a superfície de resposta para a eficiência de conversão de xilose em xilitol, em função das variáveis, fator de concentração do hidrolisado e vazão de ar. Pode-se observar que a região otimizada que provavelmente proporcionaria um aumento da concentração de xilitol

ocorreria com o aumento dos valores tanto de X1 quanto de X2. Considerando a proposta inicial do presente trabalho e os objetivos propostos, não foi realizado o passo ascendente, o que provavelmente proporcionaria um aumento na eficiência de conversão de xilose em xilitol como previsto pela análise estatística realizada.

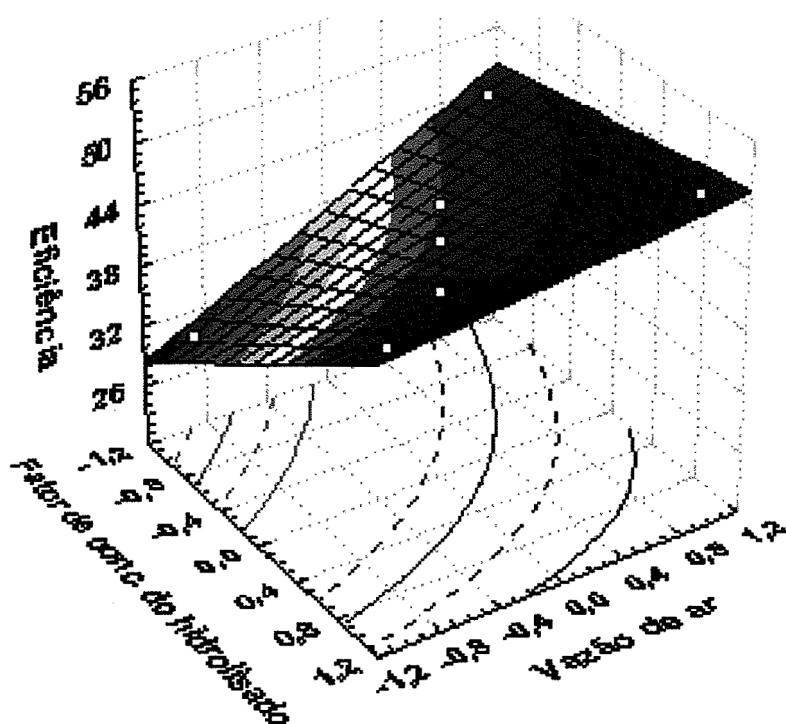


FIGURA30: Superfície de resposta e curvas de nível, em função da vazão de ar e do fator de concentração do hidrolisado, do modelo linear proposto para a eficiência de conversão de xilose em xilitol utilizando a levedura *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

6 . CONCLUSÕES

- O reator de coluna de bolhas apresenta potencial de uso em estudos de produção de xilitol.
- Dentro dos níveis das variáveis estudadas, a melhor condição para a produção de xilitol em reator de coluna de bolhas ocorreu quando à vazão de ar de 60 ml/min e o fator de concentração do hidrolisado de 5,00 vezes (o que corresponde a aproximadamente 58,20 g/l de xilose no início da fermentação) foram utilizados. Nestas condições, obteve-se os melhores resultados: 23,57 g/l de xilitol, 0,25 g/l.h de Q_p , 0,46 g/g de Y_p/s e 49,80% de E.
- Com o uso da metodologia de superfície de resposta, a partir dos dados experimentais, pode-se observar que a realização do passo ascendente conduziria a região ótima.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Objetivando o aumento da produtividade volumétrica e da concentração de xilitol, sugere-se a realização de experimentos com vazões de ar maiores que 60ml/min e com o fator de concentração do hidrolisado de 5 vezes.
- Utilizar células imobilizadas no suporte α -alumina para aumentar a concentração celular no reator e promover uma quebra efetiva das bolhas de ar, aumentando a área interfacial de contato das bolhas com o meio fermentativo, proporcionando melhores transferências de oxigênio para o interior das leveduras.
- Avaliar o desempenho do sistema utilizando além de maiores vazões de ar, maiores fatores de concentração do hidrolisado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. L., OEITERER, M., MENEZES, T. J. B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. Boletim SBCTA, v. 33, n. 2, p. 184-93, 1999.

AGUIRRE-ZERO, O., ZERO, D. T., PROSKIN, H. M. Effect of chewing xylitol chewing gum on salivary flow rate and the acidogenic potential of dental plaque. Caries Research, v. 27, p. 55-9, 1993.

AKIN, C. Bio-catalysis with immobilized cells. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 5, p. 319-67, 1987.

ALANEN, P., HOLSTI, M. L., PIENIHAKKINEN, K. Sealants and xylitol chewing gum are equal in caries prevention. Acta Odontologica Scandinavica, v. 58, p. 279-84, 2000.

ALVES, L. A. Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaco de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol. Lorena: FAENQUIL/Departamento de Biotecnologia, 1997. 92p. (Dissertação de Mestrado).

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

ANFPC. Associação Nacional dos Fabricantes de Papel e Celulose. Relatório Estatístico, v. 12, p. 201-246, 1995.

ARAÚJO, A. A. Preparação e caracterização de biocatalisadores constituídos de células aeróbicas viáveis imobilizadas em partículas de alginato de densidade variada. Campinas: Unicamp / Faculdade de Engenharia Química, 1995. 97 p. (Dissertação de Mestrado).

BAILEY, E., OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. New York, 1986. 984p.

BAKR, A. A. Application potential for some sugar substitutes in some low energy and diabetic foods. Nahrung Food, v. 41, p. 170-175, 1997.

BÄR, A. Xylitol. In: O'BREEN NABORS, L., GELARDI, R. C. Alternative sweeteners. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 349-79.

BÄR, A. Xylitol. In: O'BREEN NABORS, L., GELARDI, R. C. Alternative sweeteners. New York: Marcel Dekker, 1986, p. 241-251.

BARBOSA, M. F. S., de MEDEIROS, M. B., MANCILHA, M., SCHENEIDER, H., LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology, v. 3, p. 241-51, 1988.

BARON, G. V., WILLAERT, R. G., BACKER, L. Immobilised cell reactors. In: BARON, G. V., WILLAERT, R. G., BACKER, L. Immobilised living cell systems: modelling and experimental methods. John Wiley & Sons Ltda., 1996, p. 67-95.

BELIK, W., SILVA, J. G. Energia não é Pipoca. Folha de São Paulo, São Paulo, 04 set. 1999, p. 1-3.

BOX, G. E., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. Statistics for Experiments: an Introduction to design, data analysis and model building. New York: John Wiley & Sons, 1978. 653 p.

BRAUER, H., Stirred Vessel Reactors. In: REHM, H. J., REED, G. Biotechnology: A Comprehensive treatise in 8 volumes, BRAUER, H. Fundamentals of Biochemical Engineering, Weinheim: VHC, 1985. p. 445-64, v. 2.

BRUINENBERG, P. M., de BOT, P. H. M., van DIJKEN, J. P., SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 19, p. 256-60, 1984.

BUCHERT, J., PULS, J., POUTANEN, K. The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 20/21, p. 309-18, 1989.

CARVALHO, W., SILVA, S. S., SANTOS, J. C., CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. Enzyme and Microbial Technology, v. 32, p. 553-9, 2003.

CHUNG, I. S., LEE, Y. Y. Ethanol fermentation of crude acid hydrolysate of cellulose using high-level yeast inocula. Biotechnology and Bioengineering, v. 27, p. 308-15, 1985.

CHUN-CHONG, F., WEN-TENG, W., SHIN-YUAN, L. Performance of airlift bioreactors with net draft tube. Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 332-342, 2003.

CONVERTI, A., DOMINGUEZ, J. M., PEREGO, P., SILVA, S. S., ZILLI, M. Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. Chemistry Engineering Technology, v. 23, p. 1013-20, 2000a.

CONVERTI, A., PEREGO, P., DOMINGUEZ, J. M. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 82, p. 141-51, 1999.

CONVERTI, A., PEREGO, P., SORDI, A., e TORRE, P. Effect of starting xilose concentration on the microaerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. The

use of carbon material balances. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 101, n. 1, p. 15-29, 2002.

CONVERTI, A., PEREGO, P., TORRE, P., SILVA, S. S. Mixed inhibitions by methanol, furfural and acetic acid on xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters*, p. 1861-1865, 2000b.

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: *Celulose e Papel - Tecnologia de Fabricação da pasta Celulósica*. São Paulo: SENAI/IPT, 1988. v. 2, p. 45-106.

DANISCO SUGAR. Finland - sugar production in Finland. Disponível em: www.daniscosugar.com. Acesso em: 10 nov. 2002.

DECKWER, W. D. Bubble column reactors. In: REHM, H. J., REED, G. *Biotechnology: A Comprehensive treatise in 8 volumes*, BRAUER, H. In: *Fundamentals of Biochemical Engineering*. Weinheim: VHC, 1985, p. 395-444, v. 2.

DIEN, B. S., KURTZMAN, C. P., SAHA, B. C., BOTHAST, R. J. Screening for L-arabinose fermenting yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57/58, p. 233-42, 1996.

DOMÍNGUEZ, J. M., CHENG, S. G., TSAO, G. T. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Applied Biochemistry and biotechnology*, v. 57/58, p. 49-56, 1996.

DORAN, P. M. Design of reactors for plant cells and organs. *Advances in Biochemistry Engineering Biotechnology*, v.48, p.117-63, 1991.

EMODI, A. Xylitol, its properties and food applications. *Food Technology*. January, v. 32, p. 20-32, 1978.

FAIRBANKS, M. Gás natural: Oferta cresce, mas indústria acha caro. *Química e Derivados*. Ano 34, n. 369, p. 16-23, 1999.

FARIA, L. F. F., GIMENES, M. A. P., NOBREGA, R., PEREIRA Jr., N. Influence of oxygen availability on cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, p. 449-58, 2002.

FAVERI, D. D., PEREGO, P., CONVERTI, A., DEL BORGHI, M. Xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions and fermented hemicellulose hydrolyzates. *Chemical Engineering Journal*, v. 90, p. 291-298, 2002.

FELIPE, M. G. A., ALVES, L. A., SILVA, S. S., ROBERTO, I. C., MANCILHA, J. M., SILVA, J. B. A. Fermentation of Eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Bioresource Technology*, v. 56, p. 281-3, 1996a.

FELIPE, M. G. A., MANCILHA, I. M., VITOLO, M., ROBERTO, I. C., SILVA, S. S., ROSA, S. A. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 36, n.1, p. 103-14, 1993.

FELIPE, M. G. A., VITOLO, 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*, v. 16, n. 1, p. 73-9, 1996b.

FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., MANCILHA, I. M., SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*: *Journal of Industrial Microbiology*, v. 18, p. 251-4, 1997a.

FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., MANCILHA, I. M., SILVA, S. S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for xylitol production: effect of pH. *Biomass and Bioenergy*, v. 13, p. 11-14, 1997b.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERRARI, M. D., NEIROTTI, E., ALBORNOZ, C., SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, p. 753-9, 1992.

FERRAZ, A. *Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos*, São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001. p. 465-484.

FRAZER, F. R., McCASKEY, T. A. Wood hydrolysate treatments for improved fermentation of sugars to 2,3 butanediol. *Biomass*, v. 18, p. 31-42, 1989.

FUKUDA, H. Immobilized microorganism Bioreactors. In: ASENJO, J. A. *Bioreactor System Design*. New York: Marcel Decker, Inc., 1995, p. 339-75.

GRANASTROM, T., OJAMO, H., LEISOLA, M. Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 55(1), p. 36-42, 2001.

HEIKKILÄ, H., HYÖKY, G., RAHKILA, L., SARKKI, M. L., VIWAVA, T. A. Process for the simultaneous production of xylitol and ethanol. FI patent WO 91/10740, 25/7/1991.

HEIKKILÄ, H., NURMI, J., RAHKILA, L., TOYRYLA, M. Method for Production of Xylitol. Patent, 081.026, 14/01/1992.

HESPELL, R. B., O'BRYAN, P. J., MONIRUZZAMAN, M., BOTHAST, R. J. Hydrolysis by commercial enzyme mixtures of AFEX-treated com fiber and isolated xylans. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 62, p. 87-96, 1997.

HYVONEN, L., KOIVISTOINEN, P., VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. *Advances in Food Research*, New York, v. 27, p. 373-403, 1982.

IWATA, C. et al. Dayle use of dentrifice with and whitout xylitol and fluoride: effect in glucose retention in humans in vivo. *Archives of Oral Biology*, v. 48, p. 389-395, 2003.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xilose by bacteria, yeasts and fungi. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 27, p. 1-32, 1983.

JEFRIES, T. W. Emerging technology for fermenting D-xylose. *Trends in Biotechnology*, v. 3, n. 8, 1985.

KADAM, K. L., FORREST, L. H., JACOBSON, W. A. Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass and Bioenergy*, v. 18, p. 369-389, 2000.

KAREL, S. F., LIBICKI, S. B., ROBERTSON, C. R. Review: The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, v. 40, p. 1321-54, 1985.

KARKAREŞ, B. Immobilized microbial and animal cell as enzyme reactors. In: TAYLOR, R. F. *Protein Immobilization: Fundamentals and applications*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991, p. 319-38.

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

KILIAN, S. G., van UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose fermenting yeast *Pichi.a stiptis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 545-8, 1988.

KIM, J. H., RYU, V. W., SEO, J. H. Analysis and optimization of a two substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 181-6, 1999.

KIM, M. S., KIM, C., SEO, J. H., RYU, Y. W. Enhancement of xylitol yields by xylitol dehydrogenase defective mutant of *Pichi.a stiptis*. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*, v. 15, p. 113-9, 2000a.

KIM, S. B., YUM, D. M., PARK, S. C. Step-change variation of acid concentration in a percolation reactor for hydrolysis of hardwood hemicellulose. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 289-294, 2000b.

KIM, S. Y., KIM, J. H., OH, D. K. Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 83, p. 267-70, 1997.

KLEINSTREUR, C. Analysis of biological reactors. In: BUNGAY, H. R., BELFORT, G. Advanced Biochemical Engineering, New York, John Wiley e Sons, Inc., 1987. p. 33-78. cap. 3

KLEMM, D., PHILIPP, B., HEINZE, T., HEINZE, U., WAGENKNECHT, W. Comprehensive Cellulose Chemistry, Weinheim: Wiley-VCH, 1998, v.1, p. 1-22.

LACÔRTE, M. C. G., BURGE, R., LACÔRTE, A. J. F. Bagaço de cana hidrolisado já utilizado em larga escala em confinamento. STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 5, n. 2, p. 43-52, 1986.

LATIF, F., RAJOKA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. Bioresource Technology, v. 77, p. 57-63, 2001.

LAVARAKIS, P., GRIFFIN, G. J., RODMAN, D. Measured kinetics of acid-catalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse to produce xylose. Catalyze Today, v. 63, p. 257-265, 2000.

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to value-added co-products using yeast-like fungi. FEMS Yeast Research, v. 3, p. 133-40, 2003.

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, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEE, W. G., LEE, J. S., SHIN, S. PARK, S. CHANG, H. N., CHANG, Y. K. Ethanol production using concentrated wood hydrolysates and methods to detoxify. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77/79, p. 547-59, 1999.

LEE, Y. Y., McCASKEY, T. A. Hemicellulose hydrolysis and fermentation of resulting pentoses to ethanol. Tappi Journal, v. 66, p. 102-7, 1983.

LOUWRIER, A. Review: Industrial products - the return to carbohydrate-based industries. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 27, p. 1-8, 1998.

MAGEE, R. J., KOSARIC, N. Bioconversion of hemicelluloses. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, v. 32, p. 60-63, 1985.

MÄKINEN, K. K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? Medicine Hypothesis, v. 54, p. 603-13, 2000a.

MÄKINEN, K. K. The rocky road of xylitol to its clinical application. Journal of Dental Research, v. 79, p. 1352-5, 2000b.

- MÄKINEN, K. K. Xylitol: the sugar that prevents tooth decay. *The Futurist*, p. 135-9, 1976.
- MÄKINEN, K. K., ISOKANGAS, D. D. S. Relationship between carbohydrate sweeteners and oral diseases. *Progress in Food and Nutrition Science*, v. 12, p. 73-109, 1988.
- MANS, V., VANNINEN, E., VOIROL, F. Xylitol - its properties and use as a sugar substitute in foods. In: *FOOD R. A. Symposium Sugar and Sugar Replacements*, London, 10 oct 1973, p. 21-38.
- MARTINEZ, E. A., VILLARREAL, M. L. M., ALMEIDA E SILVA, J. B., SOLENZAL, A. I. N., CANILHA, L., MUSSATO, S. I. Use of different raw materials for biotechnological xylitol production. *Ciência y Tecnología Alimentaria*, v. 3, n. 5, p. 295-301, 2002.
- MARTON, J. M.; et al. 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.
- McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E., BAKER, J. O., OVEREND, R. P. (eds.). *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production (Symposium, Series 566)*. American Chemical Society, 1994, p. 293-324, USA.
- MELAJAR, A. J., HÄMALÄINEN, L. Process for Making Xylitol. U. S Patent. 4.008.285. Dep. 18 jun. 1975. Publ. 15/02/ 1977.
- MERCHUK, J. C.; SIEGEL, M. H. Air-lift reactors in chemical and biological technology. *Journal of Chemistry Technology Biotechnology*, v.41, p.105-120, 1988
- MEYER, P., du PREEZ, J. C., KILIAN, S. G. Isolation and evaluation of yeasts for biomass production from bagasse hemicellulose hydrolysate. *Applied Microbiology*, v. 15, p. 161-5, 1992.
- MEYRIAL, V., DELGENES, J. P., MOLE'ITA, R., NAVARRO, J. M. Xylitol production from D-xylose by *Candi. da guilliermondi. t* Fermentation behaviour. *Biotechnology Letters*, v. 13, p. 113-18, 1991.
- MICHELE, V., HEMPEL, D. C. Liquid flow and phase holdup-measurement and CFD modeling for two and three phase bubble columns. *Chemical Engineering Science*, v. 57, p. 1899-1908, 2002.
- MIKKOLA, J., VAINIO, H., SALMI, T., SJOHOLM, R., OLLONQVIST, T., VAYRINEM, J. Deactivation kinetics of Mo-supported Raney Ni catalyst in the hydrogenation of xylose to xylitol. *Applied Catalysis A: General*, v. 196, n. 1, p. 143-55, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Lavouras - desempenho da produção. Disponível em: [www.agricultura.gov.br / spa/pagespa/ ch02 /22xls](http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/ch02/22xls), 20 nov. 2004.

MOLWITZ, M., SILVA, S. S., RIBEIRO, J. D., ROBERTO, I. C., FELIPE, M. G. A., PRATA, A. M. R., MANCILHA, I. M. Aspects of the cell growth of *Candida guillienondii* in sugar cane bagasse hydrolysate. *Journal of Biosciences*, v. 51, p. 404-8, 1996.

MOO-YOUNG, M., LAMPTEY, J., GIRARD, P. Bioconversion of cellulosic waste into protein and fuel products: a case study of technoeconomical potentials. In: ALANI, D. I., MOO-YOUNG, M. *Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, p. 183-201.

MUSSATO, S. I., ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guillienondii*. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 1681-4, 2001.

MUSSATO, S. I., ROBERTO, I. C. Kinetic behavior of *Candida guillienondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1433-1439, 2004.

NEUREITER, M., DANNER, H., THOMASSER, C., SAIDI, B., BRAUN, R. Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, p. 49-58, 2002.

NGYUEN, Q. A., TUCKER, M. P., KELLER, F. A., BEATY, D. A., CONNORS, K. M., EEDY, F. P. Dilute acid hydrolysis of softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77/79, p. 133-142, 1999.

NGYUEN, Q. A., TUCKER, M. P., KELLER, F. A., EEDY, F. P. Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84/86, p. 561-576, 2000.

NOLLEAU, V., PREZIOSI-BELLOY, L., DELGENES, J. P., DELGENES, J. M. Xylitol production from xylose by two yeasts strains: sugar tolerance. *Current Microbiology*, v. 27, p. 191-7, 1993.

NOLLEAU, V., PREZIOSI-BELLOY, L., NAVARRO, J. M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsi.lopis*: incidence of oxygen and pH. *Biotechnology Letters*, v. 117, p. 417-22, 1995.

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

ORLANDO, U. S., BAES, A. U., NISHIJIMA, W., OKADA, M. A new procedure to produce lignocellulosic anion exchangers from agricultural waste materials. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 195-8, 2002.

PALMIQVIST, E., HAHN-HÅGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. In: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17-24, 2000.

PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., KRIEGER, N., SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied and Biochemistry*, v. 29, p. 119-131, 1999a.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, V. T., KRIEGER, N., FONTANA, J. D. Recent developments in microbial inulinase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 81, p. 1-18, 1999b.

PANDEY, A. (eds.). *Solid-state Fermentation*. New Delhi, Wiley, 1994, p. 3-10.

PANDEY, A. Recent developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A., AZMI, W., SINGH, J., BANERJEE, U. C. In: JOSHI, V. K., PANDEY, A. (eds.). *Biotechnology: Food Fermentation*, New Delhi: Educational Publishers & Distributors. 1999c. p. 383-426. v. 1.

PANDEY, A., NIGAM, P., VOLGEL, M. Simultaneous saccharification and protein enrichment fermentation of sugar beet pulp. *Biotechnology Letters*, v. 10, p. 67-72, 1988.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., BRAND, D., MOHAN, R., ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemistry Engineer Journal*, v. 6, p. 153-162, 2000b.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. In: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000a.

PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology*, v. 65, p. 203-212, 1998c.

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

PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J. M. Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: effect of the initial cell concentration. *Biotechnology Letters*, v. 18, p. 593-598, 1996.

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

- PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J. M. Improved xylitol production with *Debaromyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 18-24, 1997.
- PAZ, E. D. D., SANTANA, M. H. A. S., EGUCHI, S. Y. Enhancement of the oxygen transfer in a circulating three-phase fluidized bed bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 39/40, p. 455-466, 1993.
- PELKZAR, M. J., CHAN, E. C. S., DRIEG, N. R. *Microbiologia*, São Paulo: Editora McGraw-Hill, 2ª edição, 1996. p. 77-99., v. 1, cap. 3.
- PEPPER, T., OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technology*, v. 42, p. 98-106, 1988.
- PEREGO, P., CONVERTIA, A., PALAZZINI, E., DEL BORGHI, M., FERRAIOLO, G. Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolyzate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, and *Pi.chia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 6, p. 157-164, 1990.
- PERRY, R. H., GREEN, D. W. *Perry's chemical engineering handbook*. 7. ed., New York: McGraw-Hill, 1997.
- PESSOA Jr., A. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 14, n.3, p. 291-297, 1997.
- PESSOA Jr., A. Produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1991. 187p. (Dissertação de Mestrado).
- PESSOA, A. Jr, MANCILHA, J., SATO, S. Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulose hydrolysate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology*, v. 51, p. 83-88, 1996.
- PROCKNOR, C. Subprodutos; o bagaço. *STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v. 18, n. 4, p. 14, 2000.
- PURI, V. P., PEARCE, G. R. Alkali-explosion pretreatment of straw and bagasse for enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.28, p. 480-5, 1986.
- RANGASWAMI, S.; AGBLEVOR, F. A. Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p. 88, 2002.
- RAO, R. S., PRAKASHAM, R. S., PRASAD, K. K., RAJESHAM, S., SARMA, P. N., RAO, L. V. Xylitol production by *Candida sp.*: parameter optimization using Taguchi approach. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 951-956, 2004.
- RIPOLI, T. C. C., MOLINA Jr., W. F., RIPOLI, M. L. C. Energy Potential of Sugar Cane Biomass in Brazil. *Scientia Agricola*, v. 57, n. 4, p. 677-681, 2000.

ROBERTO, I. C., FELIPE, M. G. A., MANCILHA, J. M., VITOLO, M., SATO, S., SILVA, S. S. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. *Bioresource Technology*, v. 51, p. 255-257, 1995.

ROBERTO, I. C., MANCILHA, J. M., SATO, S. Influence of K_La on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. *Bioprocess Engineering*, v. 21, p. 505-8, 1999.

ROBERTO, I. C., SATO, S., MANCILHA, J. M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 16, p. 348-50, 1996.

RODRIGUES, D. C. G. A., SILVA, S. S., PRATA, A. M. R., FELIPE, M. G. A. Biotechnological production of xylitol from agro-industrial residues. Evaluation of bioprocesses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p. 869-75, 1998.

RODRIGUES, R. C. L. B. Avaliação das condições de concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para a produção do xilitol. Lorena: FAENQUIL/Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 1999, 109p, (Dissertação de Mestrado).

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

RODRIGUES, R. C. L. B., FELIPE, M. G. A., ALMEIDA e SILVA, J. B., VITOLO, M., GÓMEZ, P. V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and non-volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Brazilian Journal of Chemistry Engineering*, v. 18, p. 299-311, 2001.

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., PEITO, M. A., GÍRIO, F. M., AMARAL-COLLAÇOM, T. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaromyces hansenii*. *Archives of Microbiology*, v. 156, p. 484-90, 1991.

SANTOS, J. C. Processo fermentativo de obtenção de xilitol de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: avaliação das condições operacionais. Lorena: FAENQUIL, 2005. 171p. (Tese de Doutorado).

SCHINIM, A., MÄKINEN, K. K., YLITALO, K. Turku sugar studies V - Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 33, 67-104, 1975.

SENE L., CONVERTIA., ZILLI, M., FELIPE, M. G. A., SILVA, S. S. Metabolic study of the adaptation of the yeast *Candida guilliermondii* to sugar cane bagasse hydrolysate. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 57, p. 738-43, 2001.

SENE, L., FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., SILVA, S. S., MANCILHA, J. M. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in bagasse hydrolysate. Journal of Basic Microbiology, v. 38, p. 61-9, 1998.

SENE, L., VITOLO, M., FELIPE, M. G. A., SILVA, S. S. Effect of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*: Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84/86, p. 371-80, 2000.

SHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biotecnologia Industrial, São Paulo, Edgard Blucher, 2001, v. 2, p. 180-181.

SILVA, C. J. S. M., ROBERTO, I. C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. Letters in Applied Microbiology, v. 32, p. 248-52, 2001a.

SILVA, C. J. S. M., ROBERTO, I. C. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. Process Biochemistry, v. 36, p. 1119-24, 2001b.

SILVA, D. D. V. et al. Xylitol: alternative sweetener obtained by biotechnological process from sugarcane hydrolysate. IN: BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES - Campinas, 2000. Book of Abstracts.

SILVA, D. D. V., FELIPE, M. G. A., RODRIGUES, R. E. L. B. 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: 6 CONGRESSO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA - ENZITEC, 2004, Rio de Janeiro. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004, p. 155.

SILVA, S. S. Avaliação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de ácido láctico. Viçosa: Universidade federal de Viçosa, 1989. 67p. (Dissertação de Mestrado).

SILVA, S. S. Produção de xilitol por via biotecnológica: Estudo de sistemas de biorreatores e parâmetros fermentativos. São Paulo: USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1994. 219p. (Dissertação de Doutorado).

SILVA, S. S., AFSHAR, A. S. Microbial production of xylitol from D-xylose using *Candida tropicalis*. Bioprocess Engineering, v. 11, p. 129-34, 1994.

- SILVA, S. S., FELIPE, M. G. A., MANCILHA, I. M. Factor that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 70-72, p. 331-339, 1998b.
- SILVA, S. S., FELIPE, M. G. A., VITOLO, M. Xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI20037 grown in pretreated sugar cane bagasse hydrolysate. *Sustain Agriculture Food Energy Industry*, p. 1116-9, 1998a.
- SILVA, S. S., RIBEIRO, J. D., FELIPE, M. G. A., VITOLO, M. Maximizing the xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 63/64, p. 557-63, 1997.
- SILVA, S. S., ROBERTO, I. C., FELIPE, M. G. A., MANCILHA, I. M. Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 31, n. 6, p. 549-53, 1996.
- SILVA, S. S., SANTOS, J. C., CARVALHO, W., ARACAVA, K. K., VITOLO, M. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* 220 immobilized on porous glass. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 903-907, 2003.
- SILVA, S. S., VITOLO, M., MANCILHA, I. M., ROBERTO, I. C., FELIPE, M. G. A. Xilitol, um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v. 5, p. 109-17, 1993.
- SIRISANSANEYAKULS., STANISZEWSKI, M., RIZZI, M. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 80, p. 565-570, 1995.
- SLININGER, P. J., BOLEN, P. L., KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: Properties and process consideration for ethanol production from D-xylose. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 9, p. 5-15, 1987.
- SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.
- SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.
- TOIVARI, M. H., ARISTIDOU, A., RUOHONEN, L., PENTTILA, M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. *Metabolic Engineering*, v. 3, p. 236-149, 2001.
- TSAO, G. T. Conversion of cellulose. In: ALANI, D. I., MOO-YOUNG, M. *Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology*. London: Elsevier Applied Science Publishers, p. 203-22, 1986.

U. S. DEPARTMENT OF ENERGY. Bio-power - renewable electricity from plant material: agricultural residues. Disponível em: www.eren.doe.gov/biopower/feedstocks/fe_agric.htm. Acesso em: 15 nov. 2004.

UHARI, M. T., APIAINEN, T., KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. *Vaccine*, v. 19, n.1, p. 144-7, 2000.

van zyL, C., PRIOR, B. A., du PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitiis*. *Erizvme Microbial and Technology*, v. 13, p. 82-6, 1991.

van zyL, C., PRIOR, B. A., dU PREEZ, J. C. Production of ethanol from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitiis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 17, p. 357-69, 1988.

VANDENBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R., PANDEY, A., LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 175-178, 2000.

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

WHISTLETT, R. L. In: WHISTLER, R. T., BEMILLER, J. N., eds. Hemicelluloses in Industrial Gums. Poly Sacchanides and their Derivates. San Diego: Academic Press, 1993, p. 295-308.

WINKELHAUSEN, E., KUSMANOVA, S. Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. *Advances in Food Research*. New York, v. 25, p. 159-80, 1979.